



**Implementación del ensayo de  
2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la  
evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos *in  
vitro* de cáncer colorrectal y seno**

**Diana Valentina Ortiz Machuca  
David Felipe Ramirez Montenegro**

**Universidad El Bosque  
Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica  
Bogotá DC. – Octubre, 2022**

**Implementación del ensayo de  
2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la  
evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos *in  
vitro* de cáncer colorrectal y seno**

**Diana Valentina Ortiz Machuca  
David Felipe Ramirez Montenegro**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:**

**Químico Farmacéutico**

**Modalidad de trabajo de grado**

**Sandra Johanna Morantes Medina  
Félix Giovanni Delgado Tiria**

**Bioprospección y Biotecnología Farmacéutica**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. – Octubre, 2022**

## Hoja de identificación

<b>Título:</b>	Implementación del ensayo de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos <i>in vitro</i> de cáncer colorrectal y seno.
<b>Grupo de investigación:</b>	Grupo de Investigación en Química Aplicada -INQA. Grupo de Virología.
<b>Línea de Investigación:</b>	Bioprospección y Biotecnología Farmacéutica. Patogénesis viral.
<b>Institución (es) Participante (s):</b>	Universidad El Bosque
<b>Tipo de Investigación:</b>	Básica - Experimental
<b>Estudiantes:</b>	Diana Valentina Ortiz Machuca David Felipe Ramírez Montenegro
<b>Director:</b>	Sandra Johanna Morantes Medina
<b>Codirector:</b>	Félix Giovanni Delgado Tiria

## **Dedicatoria o lema**

Dedicamos este trabajo principalmente a nuestras familias por brindarnos la oportunidad de estudiar y brindarnos su apoyo incondicional, además un reconocimiento especial a los docentes Sandra Johanna Morantes Medina y Félix Giovanni Delgado Tiria por su tiempo y dedicación.

## **Agradecimientos**

Nuestro más sincero agradecimiento a los docentes Sandra Johanna Morantes Medina y Felix Giovanni Delgado por la atención prestada, dedicación y los recursos puestos a nuestra disposición. Asimismo, a la Universidad El Bosque por las instalaciones brindadas y a todos los docentes que estuvieron involucrados en nuestra formación estudiantil. Finalmente, a nuestras familias por apoyarnos tanto económica como emocionalmente.

# Tabla de contenido

<b>Resumen</b>	<b>11</b>
<b>Abstract</b>	<b>12</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>2</b>
2.1. Cáncer	2
2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo	2
2.3. Regulación y modulación redox	5
2.4. Mecanismo de generación de estrés oxidativo por fármacos antitumorales	5
2.5. Ensayo DCFH-DA.	7
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>9</b>
<b>4. Pregunta de investigación</b>	<b>10</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>11</b>
5.1. Objetivo general	11
5.2. Objetivos específicos	11
<b>6. Metodología</b>	<b>12</b>
6.1. Cultivo de células MCF-7 y HT-29	12
6.2. Ensayos de viabilidad	12
6.3. Producción de ROS intracelulares	13
6.4. Medición de especies reactivas de oxígeno totales	13
6.4.1. Preparación de la solución de DCFH-DA	13
6.4.2. Marcación con DCFH-DA	13
6.4.3. Cuantificación de proteínas con BCA	13
6.4.4. Tratamiento de datos	14
<b>7. Resultados y Discusión</b>	<b>15</b>
7.1. Ensayos de viabilidad celular	15
7.2. Influencia del medio de disolución en la transformación del DCFH-DA	19
7.3. Influencia del tiempo de incubación del reactivo y concentración del DCFH-DA.	21
7.4. Producción de ROS intracelular	22

<b>8. Consideraciones éticas</b>	<b>27</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>28</b>
<b>10. Recomendaciones</b>	<b>29</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>30</b>
11.1. Protocolo para la cuantificación de DFCH-DA en HT-29 y MCF-7	30
<b>12. Referencias bibliográficas</b>	<b>32</b>

## Listado de tablas

Tabla	Nombre	Pág.
Tabla 1	Fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno	4

## Listado de figuras

<b>Figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1	Química de las especies reactivas de oxígeno	3
Figura 2	Mecanismo de producción de ROS a partir de la Doxorubicina	7
Figura 3	Ensayo del DCFH-DA en la célula	8
Figura 4	Viabilidad celular para la línea HT-29 tratada con doxorubicina por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 20.000 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).	16
Figura 5	Viabilidad celular para la línea HT-29 tratada con peróxido de hidrógeno por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 20.000 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).	17
Figura 6	Viabilidad celular para la línea MCF-7 tratada con doxorubicina por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 7.500 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).	18
Figura 7	Viabilidad celular para la línea MCF-7 tratada con peróxido de hidrógeno por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 7.500 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).	19
Figura 8	Influencia del medio de disolución usando DCFH-DA 10 $\mu$ M en la línea celular HT-29 en un tiempo de incubación de 30 minutos.	20
Figura 9	Evaluación del tiempo de incubación en medios de disolución con DCFH-DA 10 $\mu$ M a 30 y 40 minutos en la línea celular HT-29.	22
Figura 10	Evaluación de la fluorescencia en células MCF-7 usando DOXO con DCFH-DA.	23
Figura 11	Evaluación de la fluorescencia en células HT-29 usando DOXO con DCFH-DA.	24
Figura 12	Evaluación de la fluorescencia en células MCF-7 usando DOXO y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con DCFH-DA.	25
Figura 13	Evaluación de la fluorescencia en células HT-29 usando DOXO y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> con DCFH-DA.	25

## Lista de Símbolos y abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

BCA - Ácido Bicinconínico

DCF - 2',7'-Diclorofluoresceína

DCFH-DA - 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato

DOXO - Doxorrubicina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrógeno

HT-29 - La línea celular de adenocarcinoma de colon humano

MCF-7 - La línea celular epitelial de cáncer de mama

ROS - Especies Reactivas de Oxígeno

OMS - Organización Mundial de la Salud

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

GSH - Glutación Peroxidasa

IC<sub>50</sub> - Concentración media inhibitoria

URF- Unidades relativas de fluorescencia

## Resumen

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos naturales del metabolismo oxidativo, y juegan un papel importante a nivel celular en la modulación de la homeostasis redox. El ensayo de 2'-7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) es empleado con frecuencia para cuantificar la producción de ROS intracelular, por ser económico, sencillo y reproducible. El reactivo se encuentra en forma de éster, un compuesto relativamente polar y permeable a la membrana, que se hidroliza por las esterasas celulares para ser convertido en diclorodihidrofluoresceína (DCFH), un compuesto no fluorescente y polar, que será oxidado en presencia de las ROS, convirtiéndose a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), un producto altamente fluorescente que se acumula en la célula. Pese al amplio uso de este ensayo para determinar estrés oxidativo, se han reportado diferentes condiciones experimentales que condicionan una correcta cuantificación de ROS intracelular. Teniendo en cuenta esto, en este trabajo se establecieron las condiciones óptimas para inducir y cuantificar estrés oxidativo empleando el ensayo DCFH-DA. Como modelo de estudio se emplearon las líneas celulares MCF-7 y HT-29, evaluando el efecto de dos inductores de ROS ( $H_2O_2$  y doxorubicina). Por medio de fluorimetría se evaluó el efecto de la concentración del inductor, el tiempo de reacción y el medio de disolución del ensayo. Los resultados obtenidos sugieren que el  $H_2O_2$  es un mayor inductor de ROS en MCF-7, aumentando la producción de ROS 1,96 veces respecto al control después de 24 horas a 0,04 %v/v. Este mismo incremento se observó en HT-29 pero usando  $H_2O_2$  a 0,16 %v/v, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control (Kruskal-Wallis post-hoc mann Whitney con un  $P < 0,05$ ). Adicionalmente, se demostró que la cuantificación de ROS se ve afectada por la exposición a la luz, se debe usar PBS como medio de disolución y tiempos de reacción no mayores a 30 minutos. El ensayo se estandarizó para medir estrés oxidativo intracelular en ambas líneas celulares, obteniendo resultados reproducibles basados en la normalización por concentración de proteína. Finalmente, se estructuró un protocolo que será de gran utilidad para evaluar la actividad oxidante o prooxidante de sustancias exógenas en investigaciones que lo requieran, este protocolo también podrá ser empleado para el tamizaje *in vitro* de sustancias antioxidantes.

**Palabras Clave:** Estrés oxidativo, cáncer, ROS, DCFH-DA, fármacos antitumorales, HT-29, MCF-7.

## Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are natural by-products of oxidative metabolism, and play an important role at the cellular level in modulating redox homeostasis. The 2'-7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay is frequently employed to quantify intracellular ROS production because it is inexpensive, simple and reproducible. The reagent is in the form of an ester, a relatively polar and membrane-permeable compound, which is hydrolyzed by cellular esterases to dichlorodihydrofluorescein (DCFH), a non-fluorescent and polar compound, which will be oxidized in the presence of ROS, converting to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), a highly fluorescent product that accumulates in the cell. Despite the wide use of this assay to determine oxidative stress, different experimental conditions have been reported that condition a correct quantification of intracellular ROS. Taking this into account, in this work we established the optimal conditions to induce and quantify oxidative stress using the DCFH-DA assay. MCF-7 and HT-29 cell lines were used as a study model, evaluating the effect of two ROS inducers (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and doxorubicin). By means of fluorometry, the effect of the concentration of the inducer, the reaction time and the dissolution medium of the assay were evaluated. The results obtained suggest that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a major inducer of ROS in MCF-7, increasing ROS production 1.96-fold with respect to the control after 24 hours at 0.04 %v/v. This same increase was observed in HT-29 but using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 0.16 %v/v, showing statistically significant differences with respect to the control (Kruskal-Wallis post-hoc mann Whitney with a  $P < 0.05$ ). Additionally, it was demonstrated that ROS quantification is affected by exposure to light, PBS should be used as dissolution medium and reaction times no longer than 30 minutes. The assay was standardized to measure intracellular oxidative stress in both cell lines, obtaining reproducible results based on normalization by protein concentration. Finally, a protocol was structured that will be very useful to evaluate the oxidant or prooxidant activity of exogenous substances in investigations that require it; this protocol can also be used for in vitro screening of antioxidant substances.

**Keywords:** Oxidative stress, cancer, ROS, DCFH-DA, antitumor drugs, HT-29, MCF-7.

# 1. Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, su alta prevalencia está relacionada en parte con el incremento de la resistencia a la quimioterapia convencional, por lo que las nuevas investigaciones están enfocadas a potenciar el efecto terapéutico de fármacos antitumorales. Debido a esto, surge el interés de estudiar el estrés oxidativo como alternativa, identificando la capacidad prooxidante de diversos agentes xenobióticos que producen ROS, teniendo en cuenta que las ROS provocan la activación de rutas apoptóticas (Ortega-Villasante et al., 2016). Por lo tanto, se hace necesario evaluar la actividad prooxidante mediante ensayos disponibles en el mercado como el ensayo de DCFH-DA con el fin de cuantificar el estrés oxidativo causado por fármacos, compuestos, fracciones y/o extractos de origen natural o sintético, gracias a la fluorescencia que emite el DCF oxidado cuando se acumula en las células tumorales por la presencia de ROS. Sin embargo, pese a que existe evidencia de que el DCFH-DA es capaz de evaluar el estado redox en la mayoría de los sistemas celulares, el ensayo tiene ciertas limitaciones que deben ser consideradas ya que complican la interpretación de los datos y la evaluación precisa de la oxidación intracelular, subestimando los niveles de ROS (Loetchutinat et al., 2005). Algunas de estas limitaciones, incluyen interacciones con algunas hemoproteínas, interferencias con medio de cultivo utilizado, la línea celular a trabajar y diferencias en la actividad peroxidasas, conduciendo a un aumento de las concentraciones de DCF o la formación de radicales superóxidos tras la conversión de DCFH-DA en DCF, ocasionando más imprecisiones en los resultados. De esta manera, el presente trabajo implementó el ensayo de DCFH-DA con las condiciones óptimas de laboratorio, logrando disminuir los factores de variabilidad mencionados, obteniendo datos confiables y reproducibles, sobre la cuantificación del estrés oxidativo en modelos celulares de cáncer de colon y seno. Se identificó que las concentraciones óptimas para inducir estrés oxidativo con doxorubicina y  $H_2O_2$  a evaluar deben ser menores al  $IC_{50}$ , con el fin de mantener el nivel de esterasas intracelulares capaces de transformar el DCFH-DA a su compuesto fluorescente; en segundo lugar, el tiempo de incubación fue definido; ya que superar el tiempo de lectura establecido generaba mayor fluorescencia, y por último, se estableció la influencia del medio de disolución del ensayo, donde el PBS generaba menor interferencia en comparación con el DMEM (Tetz et al., 2013) Finalmente se estructuró un protocolo que será de gran utilidad para evaluar la actividad oxidante o prooxidante de sustancias exógenas en investigaciones que lo requieran, este protocolo también podrá ser empleado para el tamizaje *in vitro* de sustancias antioxidantes.

## 2. Marco teórico

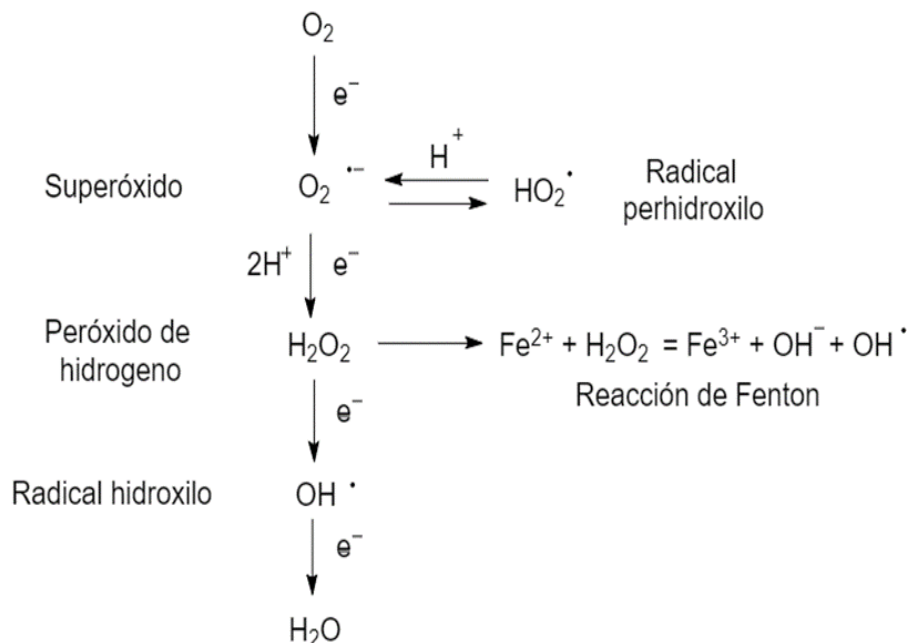
### 2.1. Cáncer

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo, según la (OMS, 2021a) “este se caracteriza por la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, en un proceso que se denomina metástasis”. Esta enfermedad es el resultado de la acumulación de mutaciones en protooncogenes y supresores de tumores, lo que resulta en alteraciones en los procesos de regulación de la división celular, la movilidad celular y la apoptosis. Por otro lado, existen otros riesgos epigenéticos que pueden influir en la progresión de la enfermedad como los factores ambientales, edad, sexo, origen étnico, cambios hormonales, cambios reproductivos, alimentación y antecedentes familiares. En cuanto a los cánceres hereditarios estos se pueden generar por mutaciones compartidas entre los miembros de la familia como el cáncer de mama, el de ovario y el de colon, aumentando la probabilidad si se inhibe un gen supresor de tumores o activa un oncogén por factores genéticos y epigenéticos y al menos dos miembros de una familia tienen el mismo cáncer dando a lugar una característica dominante que desarrolle la aparición de la enfermedad. Aun así existen otros factores que pueden ocasionar esta patología como lo es la comida, el ambiente, las relaciones interpersonales. De ahí que, el cáncer puede verse propiciado por múltiples factores dando a lugar una alta prevalencia convirtiéndolo en un tema de salud pública a abordar (Miller, 2018).

### 2.2. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo

En las células cancerígenas podemos encontrar diferentes tipos de moléculas como el oxígeno que tiene una estructura molecular única y abunda a nivel intracelular participando en procesos de homeostasis redox por lo tanto acepta fácilmente los electrones libres generados por el metabolismo oxidativo normal dentro de la célula, produciendo ROS tales como oxígeno singlete ( $O_2\cdot^-$ ), radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), así como el oxidante  $H_2O_2$  (Li & Trush, 2016). Éstas se producen por la reducción incompleta del oxígeno molecular como se evidencia en la figura 1, de modo que, en presencia de un electrón se generan superóxidos  $O_2\cdot^-$  que a su vez puede causar radicales perhidroxilo. Con dos electrones da lugar a los hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  y se puede obtener radicales hidroxilos ( $OH\cdot$ ) mediado por una

reacción de fenton que en presencia del ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) produce la oxidación de este al ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) que a su vez producen el radical hidroxilo. Por último, a partir de estos hidroxilos se produce agua como la reducción completa del oxígeno molecular.



**Figura 1.** *Química de las especies reactivas de oxígeno.*  
Adaptada de (Benezer-Benezer et al., 2008)

Por consiguiente, también es pertinente reconocer las fuentes de producción de ROS, como lo son de naturaleza endógena o exógena (ver tabla 1) y como estas fuentes cobran importancia en el estrés oxidativo; el cual puede definirse como un desequilibrio entre los prooxidantes y los antioxidantes en el cuerpo, cuando falla los procesos de homeostasis en las células se producen radicales libres que van a causar daño del ADN, peroxidación lipídica, lisis celular y tisular, entre otros (Rahal et al., 2014).

**Tabla 1. Fuentes de producción de especies reactivas de oxígeno**

Fuentes endógenas		Fuentes exógenas	
Origen	¿Por qué se produce?	Origen	¿Por qué se produce?
<b>Mitocondrial</b>	Debido a la cadena transportadora de electrones donde algunos radicales escapan antes de ser reducidos completamente a agua, produciendo ROS.	<b>Fármacos antitumorales</b>	Productos del metabolismo de estos fármacos generan ROS por una vía directa generada por la cadena de electrones o indirectamente en la disminución de enzimas que ayudan a la reducción completa del oxígeno molecular generando agua.
<b>Explosión respiratoria en los fagocitos</b>	Se produce por un mecanismo intrínseco de los fagocitos en respuesta a infecciones, donde actúa un citocromo b, permitiendo la transferencia electrones desde el NADPH al oxígeno, generando un anión superóxido que se convierte en un radical hidroxilo con la capacidad de destruir a las bacterias, para posteriormente fagocitarlas.	<b>Radiaciones ionizantes</b>	Cuando se someten los tejidos a radiación produce especies reactivas de oxígeno como los radicales hidroxilo (OH-) que a su vez genera apoptosis.
<b>Peroxisomas y Microsomas</b>	Se ocasiona por la degradación de los ácidos grasos de cadena larga generando H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Provocado por el metabolismo del citocromo P450 que causa la oxidación de sustratos endógenos (NO y esteroides) y exógenos como xenobióticos.	<b>Shock térmico</b>	Se produce por el calentamiento excesivo de combustibles fósiles, tabaco y la exposición al ozono.
<b>Enzimas oxidativas</b>	Se produce por una fuerte acción oxidante de enzimas como la monoamino oxidasa (MAO), ciclooxigenasa (COX), lisil oxidasa (LOX) generando ROS.		
<b>Ejercicio extenuante</b>	A causa de un mayor flujo de electrones a través de la cadena transportadora de electrones dando como resultado la producción de ROS.		

**Fuente:** Adaptada de (Phaniendra et al., 2015)

### *2.3. Regulación y modulación redox*

Las células han desarrollado un sistema para mantener un equilibrio homeostático entre los procesos de oxidación y reducción evitando el daño celular. Las ROS celulares consisten en especies radicales y no radicales de oxígeno, que se generan principalmente por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC), el complejo proteico de la membrana del retículo endoplásmico (ER) y las sintasas de óxido nítrico (NOX). A su vez, estas se eliminan a través del metabolismo por medio de enzimas que las destruyen, como la superóxido dismutasa (SOD), primer sistema de defensa encargada de captar los radicales libres superóxido convirtiéndolos en una molécula de peróxido de hidrógeno y oxígeno; posteriormente actúa el NADPH, el glutatión (GSH), la catalasa y otras enzimas que convierten este peróxido en agua y oxígeno manteniendo la homeostasis redox y promoviendo la supervivencia celular. En procesos de estrés oxidativo, este equilibrio se ve afectado por la reducción en la concentración de estas enzimas, exposición a fármacos antitumorales y en general por las fuentes endógenas y exógenas mencionadas anteriormente en la tabla 1 (Ye et al., 2015).

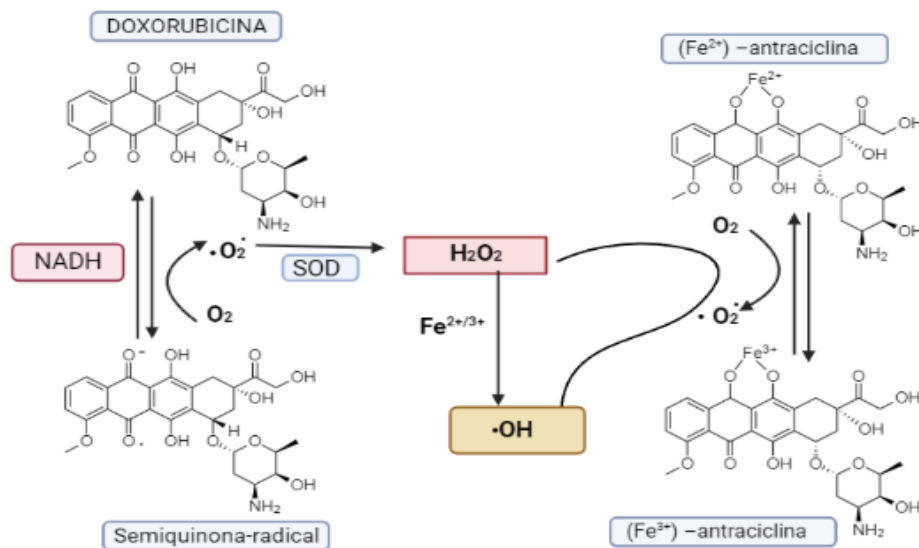
### *2.4. Mecanismo de generación de estrés oxidativo por fármacos antitumorales*

Se han descrito dos mecanismos a través de los cuales los fármacos antitumorales generan ROS: el primero es la generación directa de estas especies y el segundo la inhibición del proceso antioxidante. En cuanto a la primera vía, esta se da tras la alteración en la cadena transportadora de electrones generando un intermediario reactivo que se reduce de manera incompleta produciendo superóxido o peróxido de hidrógeno (Perillo et al., 2020). Por otro lado, la inhibición antioxidante es una manera indirecta de producir estrés oxidativo en el ambiente tumoral, la cual se produce por el agotamiento de la actividad del glutatión (GSH), ya que algunos fármacos tienen la capacidad de unirse al GSH reducido disminuyendo la concentración disponible para realizar la actividad antioxidante; de esta manera, se evita la reducción completa del oxígeno y da lugar a la formación de ROS que posteriormente se acumularán en las células cancerosas. A causa de esto, en los últimos años ha venido creciendo el interés por el estudio de agentes con potencial prooxidante como estrategia contra el cáncer, ya que se ha observado que el uso de fármacos para el tratamiento de esta enfermedad genera peróxido de hidrógeno, permitiendo inducir eficazmente apoptosis en células tumorales, afectando levemente a las células normales. De hecho, se ha demostrado que la formación de ROS contribuye a la actividad antitumoral de varios fármacos

quimioterapéuticos comúnmente utilizados en la práctica clínica, como paclitaxel, cisplatino, doxorubicina, trióxido de arsénico y etopósido, donde este efecto está mediado por la generación de  $H_2O_2$ . En parte, este efecto se produce a través de la activación de NADPH oxidasa, atribuyéndole a la generación de ROS un papel principal en la actividad citotóxica de estas terapias (Kim et al., 2019).

Adicionalmente, es importante resaltar que se ha observado mayor susceptibilidad al  $H_2O_2$  en las células tumorales que en las no tumorales, dejando ver una ventaja importante en el uso de la terapia prooxidante para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, aunque un aumento de los niveles de ROS activa vías de supervivencia en las células cancerosas; regulando al alza la expresión de enzimas antioxidantes e inhibiendo la apoptosis. El uso de agentes prooxidantes parece ser una estrategia terapéutica reciente, al sobrepasar los niveles fisiológicos de ROS o anular las defensas antioxidantes de las células cancerosas para lograr un nivel de ROS con la capacidad de inducir apoptosis, siendo de gran importancia la evaluación de sustancias con esta actividad prooxidante como los fármacos o extractos naturales en el ámbito clínico. Sin embargo, no se comprende totalmente porque ciertos prooxidantes tienen la capacidad de matar células cancerosas de forma selectiva, pero se ha descrito que se le puede atribuir a las diferencias redox que existen entre las células cancerosas y las normales (León-González et al., 2015).

La doxorubicina es un fármaco antitumoral de la familia de las antraciclinas que se usa para el tratamiento de varios tipos de cáncer como mama, tiroides, gástrico, broncogénico, sarcomas óseos. Éste ejerce su efecto citotóxico sobre las células tumorales principalmente a través de tres mecanismos: a) Promoviendo la reacción de fenton, b) Promoviendo ciclos redox e c) Inhibiendo la topoisomerasa II. El primer mecanismo de producción de ROS se genera por una reacción de fenton con el hierro, ya que las antraciclinas como la Doxorubicina pueden formar complejos  $Fe^{3+}$ -antraciclina, que catalizan la conversión de  $H_2O_2$  a varias especies de ROS, como los radicales hidroxilos citotóxicos ( $OH\cdot$ ). Con respecto a la segunda vía, las ROS se generan cuando el fármaco se activa al reducirse a un radical semiquinona, que experimenta un ciclo redox, produciendo así superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Por último, la inhibición de la topoisomerasa II inducida por la Doxorubicina, provoca rupturas de doble cadena del ADN que representan un fuerte estímulo apoptótico si no se reparan (ver Figura 2). Gracias a su capacidad prooxidante y los diferentes mecanismos para la generación de ROS, este fármaco es un buen candidato para su utilización como control positivo en la evaluación del estrés oxidativo intracelular (Henninger & Fritz, 2017).



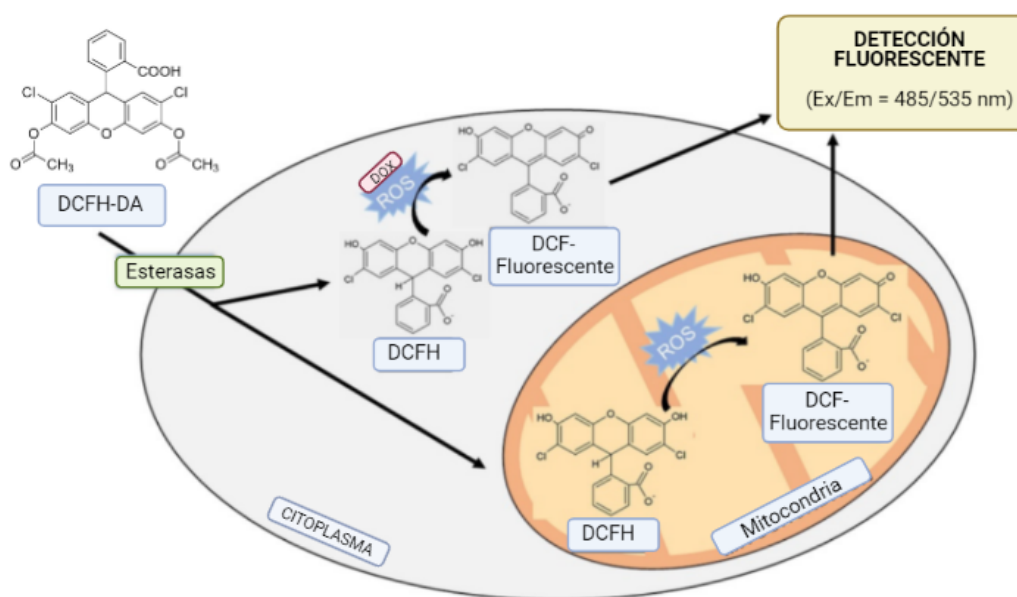
**Figura 2.** Mecanismo de la doxorubicina para producir ROS. Adaptada de (Henninger & Fritz, 2017).

### 2.5. Ensayo DCFH-DA.

El ensayo con DCFH-DA ha sido ampliamente empleado para la detección de  $H_2O_2$  intracelular y estrés oxidativo. Se basa en el empleo del compuesto DCFH-DA en forma de AcO (acetato de metilo), un producto relativamente polar y permeable a la membrana celular que es hidrolizado enzimáticamente por las esterasas intracelulares en medios alcalinos y convertido al anión carboxilato DCFH (Figura 3). Una vez en el citoplasma de las células, es reducido a un compuesto no fluorescente a través de un radical intermedio (DCF $\cdot$ ), que se hidroliza intracelularmente al anión carboxilato DCFH, y este es retenido en la célula. Posteriormente se produce la oxidación de dos electrones de DCFH en presencia de ROS dando como resultado la formación de un producto altamente fluorescente, DCF, que puede ser detectado mediante varias técnicas fluorimétricas (Khan et al., 2018). Esta especie fluorescente a su vez emite una luz de menor energía de una longitud de onda más larga que produce la imagen ampliada en lugar de la fuente de luz original, permitiendo así obtener las imágenes donde se puede calificar visualmente el brillo de las células producido por los fenómenos de fluorescencia del DCF oxidado (Christopoulos & Diamandis, 1986).

Además, es un reactivo de bajo costo, fácil de usar y permite seguir los cambios de ROS intracelular a lo largo del tiempo al ser extremadamente sensible a las alteraciones del estado redox (Yordi et al., 2012). A pesar de que el DCFH-DA es capaz de evaluar el estado redox en

la mayoría de los sistemas celulares, presenta una serie de limitaciones tales como: i) el atrapamiento incompleto de DCF, puesto que al ser permeable a la membrana puede salir de las células con el tiempo; ii) se ha descrito que algunos tipos de células tienen una baja actividad de esterasas; iii) se pueden presentar algunas interacciones con hemoproteínas; iv) interferencias con medios de cultivo durante ensayos *in vitro* y v) diferencias en la actividad de peroxidasas celulares. En consecuencia, estas limitaciones pueden complicar la interpretación de los datos y dificultar la evaluación precisa de la oxidación intracelular. De allí la importancia de establecer cuál es el tiempo de reacción óptimo, el medio de cultivo, la concentración del DCFH-DA y el control positivo, para la cuantificación de ROS en diferentes modelos celulares (Loetchutinat et al., 2005).



**Figura 3.** Ensayo DCFH-DA en la célula. Adaptada de (Čapek & Roušar, 2021).

### 3. Planteamiento del problema

Para el año 2020, el cáncer fue diagnosticado a 19,3 millones de personas y cobró diez millones de vidas, convirtiéndose en la segunda causa de muerte en todo el mundo. Se estima que en las próximas décadas los nuevos casos aumentarán en casi un 50% según lo anunciado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2021b). Ante este panorama y las bajas tasas de respuesta al tratamiento, se hace necesario la búsqueda de sustancias con la capacidad de inducir o inhibir las ROS como estrategia para mejorar la efectividad de las terapias antitumorales actuales. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos naturales del metabolismo oxidativo, y juegan un papel importante a nivel celular en la modulación de la supervivencia, muerte, diferenciación, señalización y producción de factores relacionados con la inflamación (Dayem et al., 2017). Su origen principalmente se da en respuesta a fármacos antitumorales, sustancias naturales y sintéticas con la capacidad de generar la reducción incompleta del oxígeno molecular presente en las células, permitiendo así su cuantificación a través de ensayos como el de DCFH-DA. Este ensayo se basa en la oxidación del reactivo en presencia de las ROS transformándolo en DCF, un producto altamente fluorescente que puede ser cuantificado por fluorimetría, haciendo de este un método sencillo, económico y sensible a los cambios redox al interior de la célula (Yordi et al., 2012). Pese al amplio uso del DCFH-DA en la determinación de estrés oxidativo, se han reportado diferentes condiciones experimentales que pueden determinar la correcta cuantificación de ROS intracelular. Por lo tanto, se hace necesario establecer las condiciones óptimas para cuantificar estrés oxidativo empleando el ensayo DCFH-DA en respuesta a inductores de ROS tales como el  $H_2O_2$  o doxorubicina, dos compuestos que alteran la homeostasis redox en modelos *in vitro* de cáncer de seno y cáncer colorrectal. Teniendo en cuenta lo anterior, este trabajo busca darle respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cómo el tiempo de reacción del DCFH-DA, la concentración y tiempo de exposición a prooxidantes condicionan la inducción y cuantificación de ROS intracelular en las líneas celulares HT-29 y MCF-7?

## **4. Pregunta de investigación**

¿Cómo el tiempo de reacción del DCFH-DA, la concentración y tiempo de exposición a prooxidantes condicionan la inducción y cuantificación de ROS intracelular en las líneas celulares HT-29 y MCF-7?

## 5. Objetivos

### 5.1. *Objetivo general*

Implementar el ensayo de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para la evaluación de estrés oxidativo intracelular en modelos *in vitro* de cáncer colorrectal y seno.

### 5.2. *Objetivos específicos*

5.2.1. Establecer las condiciones experimentales para inducir la producción de ROS en las líneas celulares MCF-7 y HT-29.

5.2.2. Proponer las condiciones experimentales para cuantificar estrés oxidativo intracelular mediante el ensayo de DCFH-DA en las líneas celulares MCF-7 y HT-29.

## 6. Metodología

### 6.1. Cultivo de células MCF-7 y HT-29

La línea celular epitelial MCF-7 de cáncer de mama (ATCC® HTB-22™) fue cultivada en medio DMEM. La línea celular HT-29 de adenocarcinoma de colon humano (ATCC® HTB-38™) se cultivó en el mismo medio. Para ambas líneas el medio usado fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y gentamicina 25 µg/mL. Las células fueron cultivadas en una incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 98 % de humedad relativa. El subcultivo y la criopreservación se realizó cuando la monocapa alcanzó un 80% - 90% de confluencia; para ello, el medio se reemplazó por PBS para lavar la monocapa y luego fue tratada con una solución de tripsina 0,25% - EDTA 0,03 % durante 5 minutos a 37°C buscando separar las células del soporte. La suspensión obtenida se empleó para criopreservar o para realizar las pruebas experimentales de inducción de estrés oxidativo.

### 6.2. Ensayos de viabilidad

Para evaluar la viabilidad de las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Doxorrubicina se empleó un rango de 10 concentraciones en diluciones 1:2 (28 µM - 0,03 µM DOXO y 10%-0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para MCF-7 y (200 µM - 0,2 µM DOXO y 10%-0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para HT-29. El efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de las células se determinó por el ensayo de reducción de resazurina como sigue: las células en fase de crecimiento exponencial fueron sembradas en placas de 96 pozos (MCF-7: 7.500 células por pozo; HT-29: 20.000 células por pozo), luego se realizó el tratamiento con los inductores de ROS por 24 horas y una vez cumplido el tiempo de exposición, se retiró el sobrenadante y se reemplazó por 100 µL de medio con resazurina a una concentración final de 4,4 µM. Las placas se incubaron por 4 horas y se cuantificó la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una de emisión de 595 nm usando un espectrofluorómetro TECAN GENios (O'Brien et al., 2000).

### *6.3. Producción de ROS intracelulares*

Para la inducción de ROS intracelular se usó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Doxorubicina como sigue: las células en fase de crecimiento exponencial se sembraron en placas de 24 pozos (MCF-7, 200.000 células por pozo; HT-29, 350.000 células por pozo) y después de 24 h de adhesión al soporte, las células fueron expuestas a las concentraciones previamente escogidas basadas en los resultados de los ensayos de viabilidad para doxorubicina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando 0,11 µM, 0,05 µM, 0,03 µM DOXO y 0,04 %v/v, 0,02%v/v, 0,01 %v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para MCF-7 y para HT-29 se eligió 6,25 µM, 3,13 µM, 1,56 µM DOXO y 0,31 %v/v, 0,16 %v/v, 0,08 %v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### *6.4. Medición de especies reactivas de oxígeno totales*

#### *6.4.1. Preparación de la solución de DCFH-DA*

Se disolvieron 4,85 mg de DCFH-DA en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar una solución madre de 20 mM la cual fue almacenada a -20°C. La solución madre se diluyó en PBS hasta obtener una solución de trabajo de 10 µM, la cual fue usada hasta máximo 8 días después de preparada.

#### *6.4.2. Marcación con DCFH-DA*

Una vez se cumplió el tiempo de tratamiento a las 24 horas, se retiró el medio que contenía el fármaco o el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la monocapa se lavó dos veces con PBS, ya que el suero contiene esterasas endógenas, que escindirían el grupo éster del DCFH-DA (Thermo Fisher Scientific, 2015). Después, se adicionaron 250 µL de la solución de trabajo de DCFH-DA 10µM en cada pocillo dejando reaccionar por 30 minutos a 37 °C. Transcurrido este tiempo se midió la intensidad de la fluorescencia utilizando un lector de fluorescencia de microplacas a una longitud de onda de Ex/Em = 485/535 nm, y posteriormente se tomaron imágenes representativas de cada pocillo utilizando el canal de la proteína verde fluorescente (GFP) en un microscopio de fluorescencia.

#### *6.4.3. Cuantificación de proteínas con BCA*

Luego de la lectura de la fluorescencia, se retiró el sobrenadante celular y se añadieron 250 µL de buffer RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS) a cada pozo. Después de incubar en hielo durante 30 minutos se recogió el lisado celular en tubos de 1,5 mL, se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos y el sobrenadante fue

recuperado en otro tubo. La cuantificación de proteínas se hizo empleando el BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) usando como estándar BSA (Albúmina sérica bovina) en un rango de concentraciones entre 2 mg/mL y 0,031 mg/mL. La lectura se hizo usando un espectrofotómetro UV/Vis Implen® realizando cada lectura por triplicado con el fin de realizar la normalización de los datos al contenido de proteína total por pozo, esto se realizó ya que la cantidad de DCFH-DA es dependiente de la concentración de esterasas, enzimas presentes en la membrana encargadas de transformar el acetato de metilo al anión carboxilato DCHF, por lo anterior se hace necesario hacer la corrección por pozo llegando a un consenso de tratamiento de datos de la siguiente manera (Santa Cruz Biotechnology, 2010) :

Ecuación 1. Ecuaciones usadas para la normalización de los datos.

$$\begin{aligned}
 &= \text{Concentración de proteína (mg/mL)} \times \text{Volumen final del pozo (mL)} \\
 &= \text{mg de proteína por pozo} \\
 &= \frac{\text{Fluorescencia emitida por pozo tratamiento} - \text{Fluorescencia emitida pozo control}}{\text{mg de proteína por pozo}} \\
 &= \frac{\text{Unidades de fluorescencia (UF)}}{\text{mg de proteína}}
 \end{aligned}$$

#### 6.4.4. Tratamiento de datos

Para el análisis de los datos, se realizó un análisis exploratorio que evaluó los supuestos de normalidad e independencia utilizando los métodos estadísticos paramétricos o no paramétricos, según su pertinencia. Para las variables cuantitativas, se evaluó la distribución de los datos con prueba de Shapiro-Wilk. Las comparaciones entre grupos se realizaron con análisis de varianza o prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias se considerarán significativas (\*) con un  $P < 0,05$ .

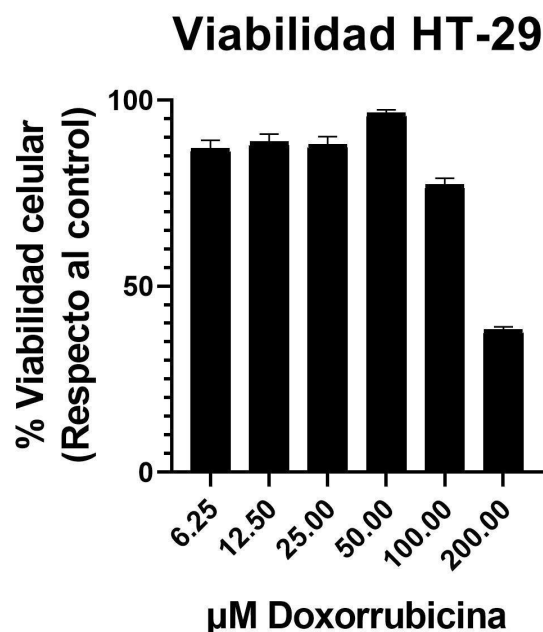
## 7. Resultados y Discusión

### 7.1. Ensayos de viabilidad celular

Las condiciones experimentales para inducir la producción de ROS se establecieron a través de ensayos de viabilidad para las líneas celulares MCF-7 y HT-29, utilizando los resultados obtenidos como guía para definir las concentraciones óptimas a emplear de los productores de ROS (DOXO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), con el fin de cuantificar el estrés oxidativo intracelular. Para lograr esto, se tuvieron en cuenta factores como: la variación morfológica entre ambas líneas celulares, la densidad celular y las diferencias en concentración de los inductores de estrés oxidativo a 24 horas de exposición. Estos parámetros deben ser controlados, ya que varían entre las diferentes líneas celulares; por lo que es notoria la diferencia de densidad celular que se requiere por cada pozo, las concentraciones y la sensibilidad de los inductores de estrés oxidativo a evaluar entre ambas líneas celulares y cada tratamiento; tal como se muestra en las Figuras 4, 5, 6 y 7. De modo que, la importancia de la densidad celular radica en que afecta la confluencia de los pozos, y por ende, la cantidad de proteína ligada a el nivel de esterasas que se requiere para transformar el ensayo de DCFH-DA a DCF el compuesto fluorescente, asimismo, la variación morfológica y la concentración del inductor permiten evidenciar el comportamiento de la DOXO y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con las células, para elegir las condiciones óptimas a implementar en la cuantificación de ROS.

En un inicio, la producción de ROS se basó en la IC<sub>50</sub> considerando que a esta concentración se esperaba producir cantidad suficiente de ROS sin que se vieran afectados los niveles de esterasas intracelulares, que se requerían para llevar a cabo la oxidación del ensayo de DCFH-DA a DCF. Sin embargo, se observó que las concentraciones de elección debían cumplir principalmente con dos criterios, el primero era mantener porcentajes de viabilidad superiores al 65% y el segundo, que se mantuvieran morfológicamente bien bajo la observación del microscopio. De los resultados obtenidos, se estableció que el rango de concentraciones a evaluar con el tratamiento de DOXO en la línea celular HT-29 basados en los datos de viabilidad y la aproximación del IC<sub>50</sub> (entre 100 µM - 200 µM), debían ser menores a 6,25 µM, ya que a concentraciones mayores, aunque se mantuviera un alto porcentaje de viabilidad (Figura 4), las células presentaban daños morfológicos bajo el microscopio y no producían la fluorescencia esperada, ya que es necesario contar con cantidad suficiente de esterasas intracelulares que permitan llevar a cabo la desacetilación del DCFH-DA para que en presencia de ROS genere DCF, el compuesto fluorescente, que será detectado por fluorimetría. Por otra

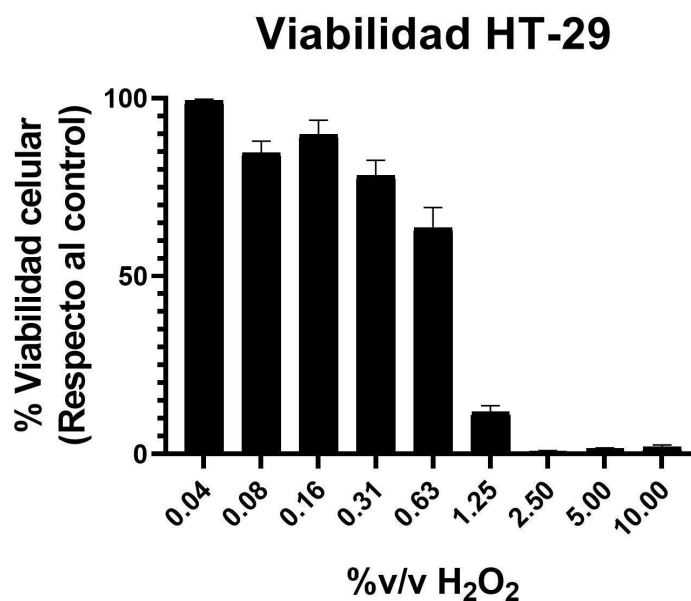
parte, se evidencio que HT-29 requirió de concentraciones mucho más elevadas a las empleadas en MCF-7 con DOXO, siendo esta línea menos sensible al fármaco por un mecanismo específico para el cancer de seno y sus otras indicaciones (Carvalho et al., 2009); ya que ejerce un efecto al disminuir la expresión de la proteína NF-kB y esto a su vez afecta el estrés oxidativo al aumentar la producción de peróxido de hidrógeno, haciendo al fármaco una terapia dirigida para cáncer de seno (Pilco-Ferreto & Calaf, 2016).



**Figura 4.** Viabilidad celular para la línea HT-29 tratada con doxorubicina por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 20.000 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).

Por otro lado, se evidenció que el tratamiento con  $H_2O_2$  en HT-29 se requiere de concentraciones mayores a 0,63 %v/v de  $H_2O_2$  para observar una reducción el porcentaje de viabilidad, a diferencia de MCF-7 donde solo se requirió de la mitad de esta concentración (0,31 %v/v) para obtener el mismo efecto. A partir de esto, se realizó el cálculo de la  $IC_{50}$  con  $H_2O_2$ , obteniendo un resultado de 0,74 %v/v (Figura 5) con un coeficiente de correlación de 0,9231, así pues, las concentraciones a emplear para el ensayo de cuantificación de ROS fueron establecidas en el rango de 0,08 %v/v a 0,31 %v/v, ya que a concentraciones más altas se induce un porcentaje de muerte celular mayores al 60%, al igual que con doxorubicina, se podría ver afectada la cantidad de esterasas necesarias para transformar el DCFH-DA a su

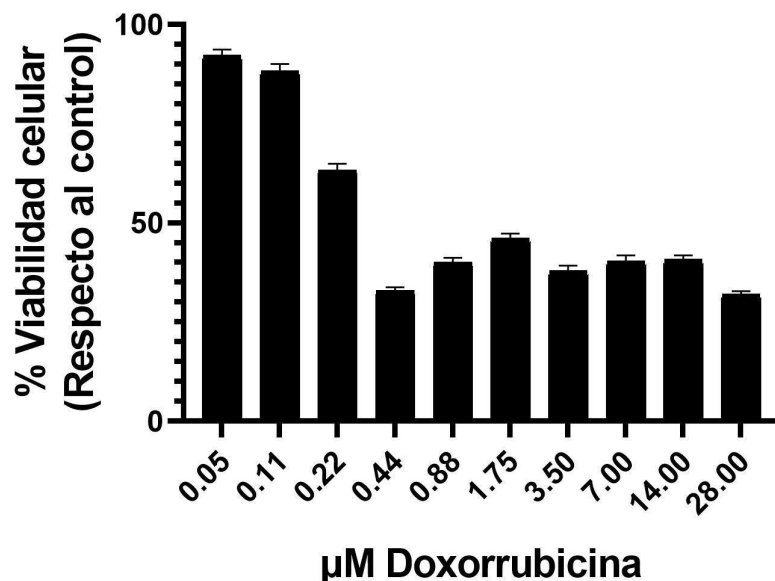
compuesto fluorescente (DCF) (Loetchutinat et al., 2005) y a menores concentraciones no se genera la producción de radicales libres para cuantificarlos, tal como se muestra en la figura 5 que a 0,04 %v/v el porcentaje de viabilidad es aproximadamente del 100%.



**Figura 5.** Viabilidad celular para la línea HT-29 tratada con peróxido de hidrógeno por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 20.000 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).

Posteriormente, también fue evidente una mayor tasa de crecimiento para las células MCF-7 y una mayor sensibilidad a los tratamientos en comparación con HT-29, esto basado en un análisis cualitativo del porcentaje de confluencia bajo el microscopio y los resultados de los porcentajes de viabilidad que se muestran en las figuras 6 y 7.

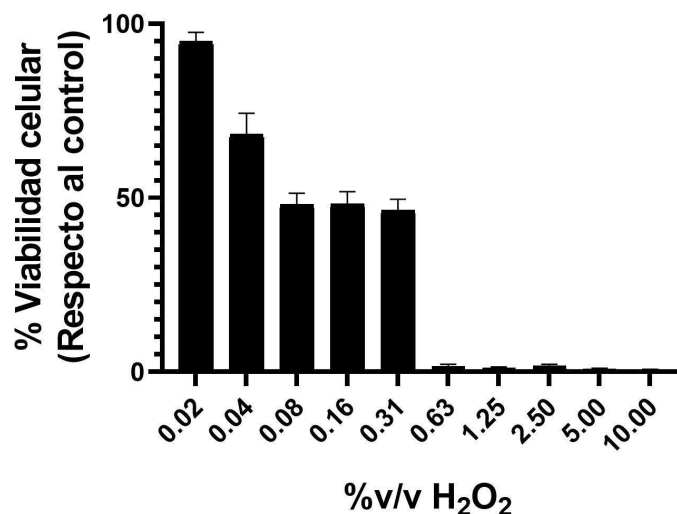
## Viabilidad MCF-7



**Figura 6.** Viabilidad celular para la línea MCF-7 tratada con doxorubicina por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 7.500 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).

Para la inducción de estrés oxidativo en MCF-7, al momento de calcular el  $IC_{50}$  a través del programa GraphPad, bajo el modelo de pendiente variable con un intervalo de confianza del 95%; que se ajusta a la pendiente de la curva según los datos a analizar, se obtuvo un valor de 0,21  $\mu$ M para el tratamiento con DOXO y 0,20 %v/v para  $H_2O_2$  (Figura 7). Donde los coeficientes de correlación fueron 0,9415 y 0,8309 respectivamente, siendo bajo en el tratamiento con  $H_2O_2$ , ya que los resultados obtenidos en viabilidad se observan que a la concentración entre 0,31 %v/v y 0,08%, no se observa un cambio en el porcentaje de viabilidad, sino que las células presentan resistencia al inductor.

## Viabilidad MCF-7



**Figura 7.** Viabilidad celular para la línea MCF-7 tratada con peróxido de hidrógeno por 24 horas, usando como control células no tratadas y con una densidad de 7.500 células/pozo para todas las muestras reportado con el error estándar de la media (SEM).

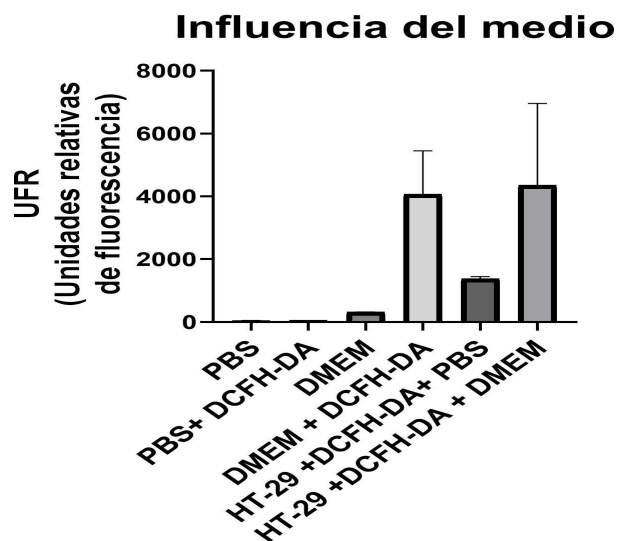
A partir de estos valores de  $IC_{50}$ , se estableció que el rango de concentraciones para inducir estrés oxidativo para doxorrubicina a usar en el ensayo de DCFH-DA para doxorrubicina estuviera en el rango de 0,03  $\mu$ M y 0,11  $\mu$ M, donde se evidenció que la viabilidad celular era mayor al 80 % (Figura 6). Caso similar se obtuvo con el tratamiento con  $H_2O_2$  para esta línea celular, ya que el rango de concentración se estableció entre 0,01 %v/v y 0,04 %v/v; dicho rango fue elegido al igual que el tratamiento con doxorrubicina por la alta sensibilidad que presenta la línea celular de cáncer de seno (Figura 7).

### 7.2. Influencia del medio de disolución en la transformación del DCFH-DA

El DCFH-DA es un reactivo sensible a los cambios de pH, luz, temperatura y medio de disolución. Es por esta razón que se realizó un experimento por triplicado a una concentración de trabajo de 10 $\mu$ M evaluando el PBS sin DCFH-DA, PBS + DCFH-DA, PBS+HT-29+DCFH-DA y por otra parte el DMEM sin DCFH-DA, DMEM+DCFH-DA y DMEM+HT-29+DCFH-DA. De lo cual se obtuvo que; cuando el DCFH-DA es disuelto en PBS el background generado al cuantificar la fluorescencia fue de 79 veces menos comparado con el DMEM (Figura 8). Al realizar el experimento con HT-29 y el DMEM, sigue siendo de 28,98 veces más que el PBS. Esto se explica debido a que; el medio de cultivo al tener nitrato férrico nanohidratado ( $Fe(NO_3)_3$ )

. 9 H<sub>2</sub>O) y sulfato cúprico pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>. 5 H<sub>2</sub>O) (Thermo Fisher Scientific, n.d.), genera radicales hidroxilos a partir de una reacción en cadena entre el ion ferroso o férrico y el peróxido aumentando la fluorescencia no atribuible a la formación ROS (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016) y esto a su vez causa la variabilidad en los datos obtenidos. Otro factor a considerar es la capacidad buffer del PBS comparado con el DMEM, puesto que el PBS proporciona un entorno iónico estable y una capacidad de tampón de pH de aproximadamente +/-7,4 manteniendo un medio neutro más estable que asegura la transformación parcial a la forma fluorescente (DCF-). Adicionalmente, es importante recalcar que una variación del pH a un medio más ácido afectaría los resultados obtenidos al leer la fluorescencia en el equipo afectando los espectros de emisión y excitación del DCF (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016) haciendo el medio de disolución un factor crítico en la cuantificación de ROS y por ende se escogió el PBS como medio de disolución del DCFH-DA .

Por otro lado, la temperatura de incubación a 37°C juega un papel clave, ya que se produce una reacción enzimática al hidrolizar intracelularmente el DCFH-DA al anión carboxilato (DCFH-) gracias a la acción de las esterasas, por tanto, la temperatura afecta la velocidad de la reacción y a su vez la transformación del ensayo al producto fluorescente (DCF-) lo que puede llegar a desencadenar cambios del 10% al 20% en los resultados que se obtengan (Daniel & Danson, 2013).

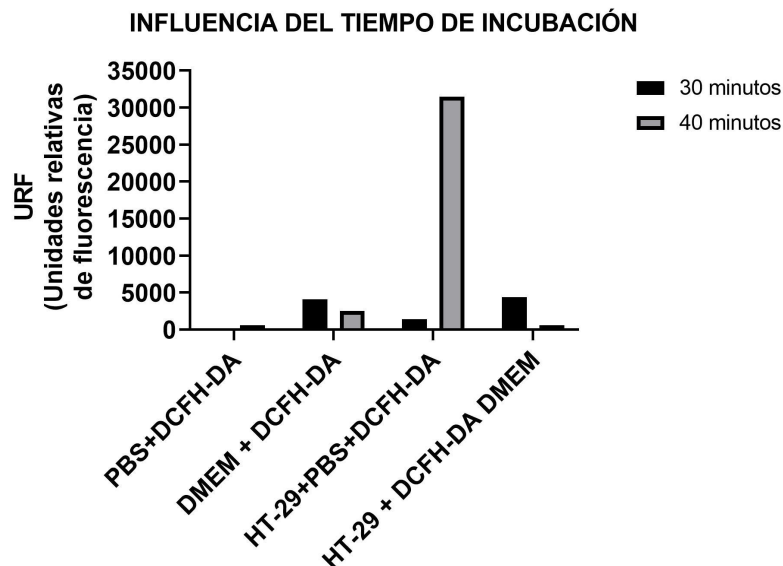


**Figura 8.** Influencia del medio de disolución usando DCFH-DA 10µM en la línea celular HT-29 en un tiempo de incubación de 30 minutos.

### *7.3. Influencia del tiempo de incubación del reactivo y concentración del DCFH-DA.*

En ensayos previos (ver sección 7.2) se evidenció un menor background (ver Figura 8) expresado en URF para el PBS en comparación con el DMEM. Partiendo de esta premisa se evaluaron dos tiempos de incubación por triplicado a 30 y 40 minutos usando una concentración de 10 $\mu$ M DCFH-DA (ver figura 9), de lo cual se obtuvo que; para el PBS+DCFH-DA en un tiempo de 40 minutos fue 10,78 veces más alto que para el tiempo de 30 minutos, por otra parte al evaluar el DMEM+DCFH-DA la fluorescencia producida fue de 1,62 veces menos incubando el ensayo a 40 minutos comparado con 30 minutos. En consecuencia cuando se cuantificó la cantidad de ROS con HT-29+PBS+DCFH-DA se evidenció el mismo comportamiento que para el PBS+DCFH-DA con un aumento de 91,17 veces más con respecto a los 30 minutos y para HT-29+DMEM+DCFH-DA sucede todo lo contrario y disminuye 7,92 veces con respecto a los 30 minutos. De modo que, para la evaluación de la influencia del tiempo de incubación es fundamental controlar el tiempo de reacción por 30 min para evitar la autooxidación del ensayo al producto fluorescente (DCF-) no atribuible a la inducción de estrés oxidativo. Recordando que al incubar el ensayo por 40 minutos el DCF- al ser un producto altamente polar, es capaz de permear la membrana al medio extracelular causando variabilidad en la cuantificación de ROS intracelular.

Por otra parte en este trabajo no se evaluó la concentración del reactivo ya que, se evidenció que la variabilidad de los datos era atribuible a otros factores como el medio, el tiempo de incubación, temperatura y pH, factores que al ser minimizados se obtuvieron valores reproducibles. Por ende se decidió mantener la concentración de 10 $\mu$ M de DCFH-DA para todos los experimentos, además basándose en revisiones previas de literatura. Los autores reportan evaluar rangos de concentraciones entre (10 $\mu$ M-50 $\mu$ M), de las cuales eligen 10 $\mu$ M como una concentración sensible y confiable con un periodo prolongado de permanencia de la fluorescencia, así mismo recalcaron la importancia de no usar concentraciones mayores a 10 $\mu$ M puesto que comprometen la viabilidad celular, un parámetro fundamental para garantizar la producción de ROS intracelular (Figueroa et al., 2018).

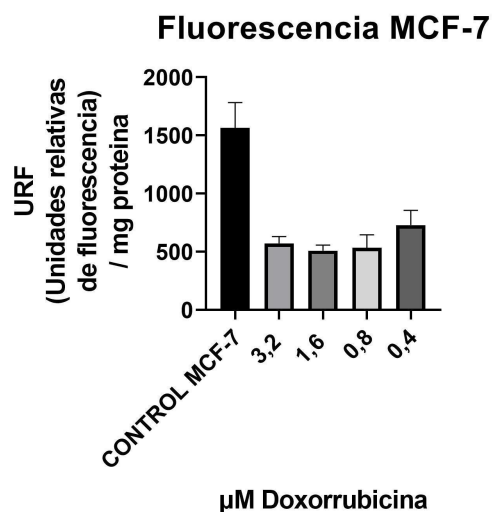


**Figura 9.** Evaluación del tiempo de incubación en medios de disolución con DCFH-DA 10 $\mu$ M a 30 y 40 minutos en la línea celular HT-29.

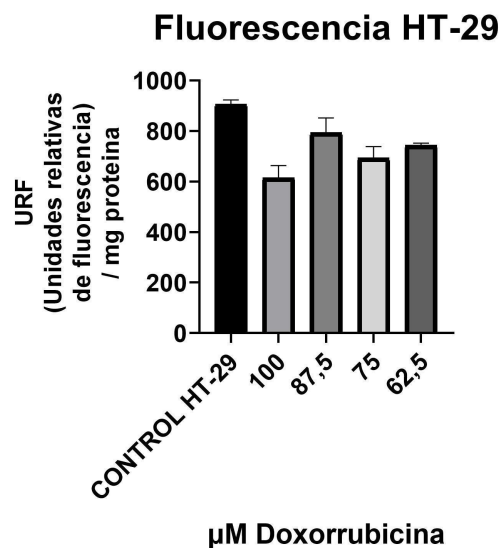
#### 7.4. Producción de ROS intracelular

Inicialmente, para la cuantificación de la producción de ROS intracelular se evaluaron concentraciones menores del IC<sub>50</sub> para ambas líneas celulares. Las concentraciones empleadas fueron de 3,20 $\mu$ M DOX y 0,63%v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para MCF-7 y 400 $\mu$ M DOX y 0,63%v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para HT-29. Se inició con esta aproximación ya que al inducir muerte en las células se activan mecanismos mitocondriales, también se producen daños en el ADN y desequilibrio metabólico, dando como resultado la producción de ROS, mayoritariamente para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016). Sin embargo, al hacer los ensayos basados en el IC<sub>50</sub>, se evidenció cualitativamente al microscopio una muerte celular mayor al 50% que no permitía la cuantificación de ROS, dado que, existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de proteína presente en cada uno de los pozos y la cantidad de esteradas capaces de transformar el reactivo en el producto fluorescente, de modo que al realizar el experimento se obtuvo que el contenido basal de ROS para ambas líneas celulares era mucho mayor al que se esperaba inducir por agentes exógenos como el peróxido y la doxorubicina, en consecuencia se evaluaron nuevamente concentraciones más alejadas al IC<sub>50</sub> que se esperaba que generen ROS mayor a los controles basales de MCF-7 y HT-29.

De modo que, se realizó el ajuste evaluando concentraciones de (3,20 $\mu$ M, 1,6 $\mu$ M, 0,8 $\mu$ M, 0,4 $\mu$ M DOXO y 3,84%v/v, 1,92%v/v, 0,96%v/v, 0,48%v/v para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para MCF-7 y (100 $\mu$ M, 87,5 $\mu$ M, 75 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M DOXO) y (9,72%v/v, 4,71%v/v, 2,36%v/v, 1,18%v/v para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para HT-29 (ver Figura 10 y 11). Usando este rango de concentraciones se evidenció una muerte celular mayor al 80% impidiendo la cuantificación de ROS. Por el contrario en el rango de concentraciones de DOXO en MCF-7, si fue posible la cuantificación de ROS, aun así, al evaluar concentraciones por debajo del IC<sub>50</sub> con una mayor viabilidad no se logra obtener una fluorescencia mayor al control basal, esto también sucede con HT-29. En conclusión, se decidió evaluar concentraciones mayores al 65% de viabilidad para HT-29 y MCF-7 en ambos tratamientos, es decir mayores al IC<sub>50</sub>.

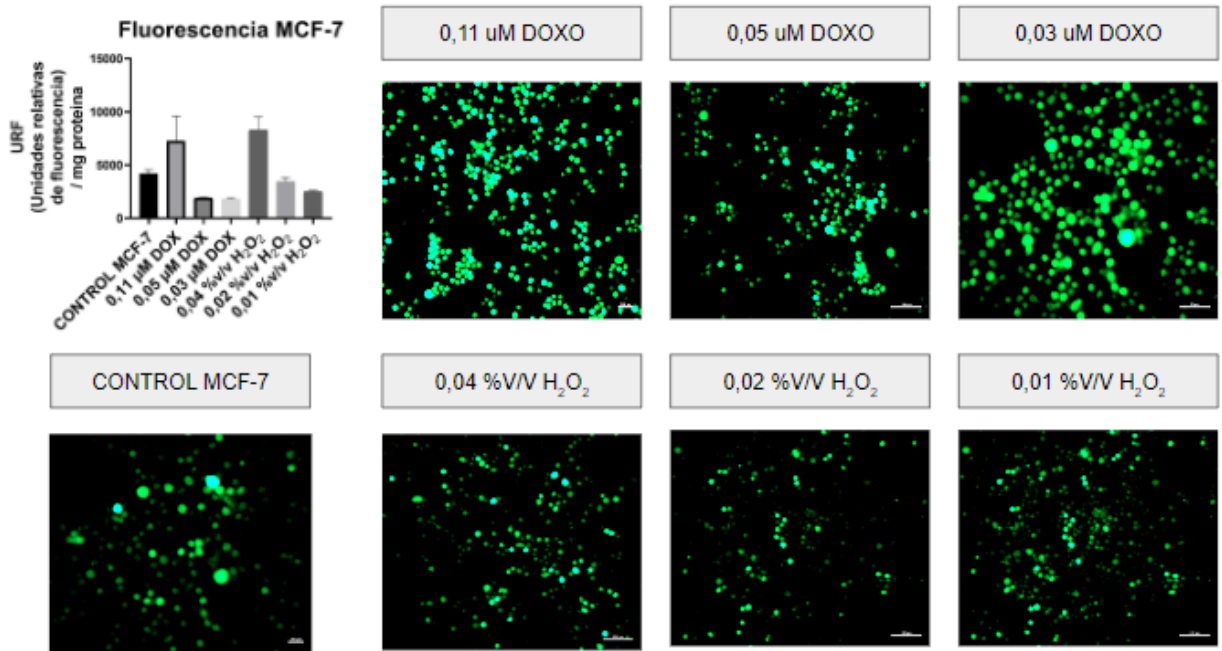


**Figura 10.** Evaluación de la fluorescencia en células MCF-7 usando DOXO con DCFH-DA.

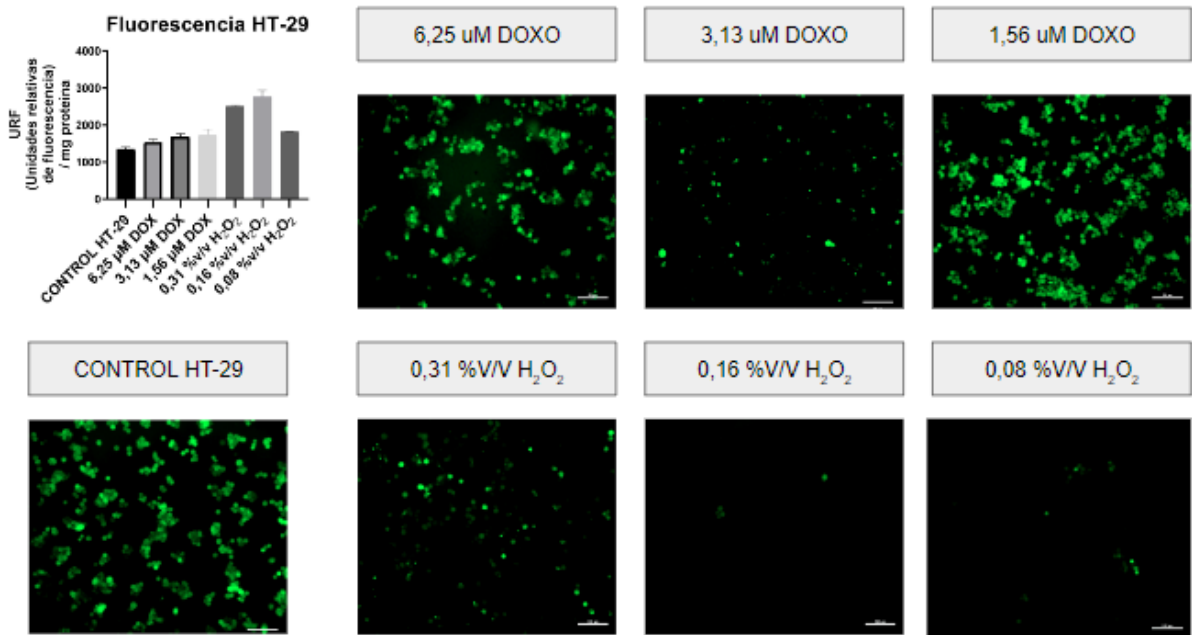


**Figura 11.** Evaluación de la fluorescencia en células HT-29 usando DOXO con DCFH-DA.

De modo que, se realizó el ensayo evaluando (0,11, 0,05, 0,03  $\mu\text{M}$  DOXO) y (0,04, 0,02, 0,01 %v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para MCF-7 y para HT-29 se eligió (6,25, 3,13, 1,56  $\mu\text{M}$  DOXO) y (0,31, 0,16, 0,08 %v/v  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) basado en los experimentos previos (ver figura 10 y 11). Observándose una producción de ROS mayor al contenido basal de cada línea (ver Figuras 12 y 13). Cabe resaltar que las diferencias fueron no fueron mayores al 20% entre las células sin tratamiento y las células tratadas con los inductores de ROS, debido a que los controles al tener un 100% de viabilidad celular y las concentraciones escogidas para cuantificar ROS estaban en un rango de 60-80% de viabilidad celular no se obtienen fluorescencias muy altas como se evidencia en la figura 12 y 13, aun así, se logró producir estrés oxidativo para MCF-7 y HT-29 como se evidencia a continuación:



**Figura 12.** Evaluación de la fluorescencia en células MCF-7 usando DOXO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con DCFH-DA.



**Figura 13.** Evaluación de la fluorescencia en células HT-29 usando DOXO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con DCFH-DA.

Finalmente, se logró obtener la producción de ROS con doxorubicina, la cual mostró ser el mayor inductor de ROS en MCF-7, la exposición por 24 horas a 0,11  $\mu\text{M}$  del fármaco aumentó la producción de ROS 1,4 veces respecto al control, para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,04 %v/v se produjo un aumento de 1,96 veces en referencia al grupo no tratado. Esto se explica por el mecanismo de acción de la DOX en MCF-7, la cual actúa inhibiendo la topoisomerasa II asociada a roturas monocatenarias asociadas a proteínas en el ADN, además la doxorubicina también produce roturas de cadenas de ADN en daño mediado por la generación de radicales libres, específicamente en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dando como resultado un aumento de las ROS a nivel intracelular expresado en su mejor capacidad de ser inductor que el peróxido de hidrógeno. Para el caso de HT-29 usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,16 %v/v, para el fármaco a una concentración de 6,25 $\mu\text{M}$  se obtuvo un aumento de 1.30 veces en comparación con el control (ver Figura 12 y 13). Una vez obtenidos los datos normalizados con proteína para MCF-7 y HT-29 se realizó un análisis estadístico que fueron estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis post-hoc mann Whitney con un  $P < 0,05$ ).

## **8. Consideraciones éticas**

Las pruebas experimentales fueron realizadas teniendo en cuenta los principios éticos consignados en la Ley 84 de 1989 y en las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud” establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. En concordancia con lo descrito en esta resolución, este estudio es considerado de riesgo mínimo, por lo que no requiere aval ético.

## 9. Conclusiones

- En este trabajo se establecieron las condiciones para inducir la producción de ROS en las líneas celulares MCF-7 y HT-29. El  $H_2O_2$  a una concentración de 0,04 %v/v fue el mejor inductor de ROS para MCF-7, de igual manera, para HT-29 empleando una concentración de 0,16 %v/v, después de 24 horas de exposición.
- Se establecieron las condiciones experimentales para cuantificar el estrés oxidativo intracelular mediante el ensayo de DCFH-DA, siendo crítico disolver el reactivo en PBS y no en medio de cultivo ya que se observa mayor variabilidad en los datos cuando se usa DMEM. El ensayo debe ser incubado por 30 minutos, ya que tiempos mayores aumentan la variabilidad en los resultados. Los valores de fluorescencia deben ser normalizados respecto a la cantidad de proteína en mg, ya que la cantidad de DCFH-DA es dependiente de la concentración de esterasas, enzimas presentes en la membrana, encargadas de transformar el DCFH-DA no fluorescente a DCF fluorescente en presencia de radicales libres.
- Se estructuró un protocolo que será de gran utilidad para evaluar la actividad oxidante o prooxidante de sustancias exógenas en investigaciones que lo requieran, este protocolo también podrá ser empleado para el tamizaje *in vitro* de sustancias antioxidantes.

## 10. Recomendaciones

10.1. Mantener el pH en 7,0+/-0,5 durante la siembra y amplificación de las células, por lo que se puede emplear medio con HEPES, para asegurar que no se den cambios en el pH.

10.2. Controlar y evitar al máximo la exposición a la luz con el fin de evitar interferencias o pérdidas en la cuantificación de la fluorescencia.

10.3 Al momento agregar el reactivo DCFH-DA a las placas de 24 pozos, agregar lentamente alrededor de cada pozo para lograr la perfusión adecuada del mismo.

10.4. Para obtener resultados confiables, robustos y reproducibles; reconstituya el reactivo previo al agregarlo a los pozos o almacene a -20°C en un tiempo no mayor a 2 semanas previo a su uso.

10.5. Si le es posible use placas de 24 pozos con bordes negros, para evitar la difusión de la luz al momento de tomar las fotos en el microscopio de fluorescencia.

10.6. Incubar el ensayo en el mismo equipo donde se realizará la lectura de la fluorescencia o para evitar la variabilidad de los datos; verificando que el equipo se encuentre a 37°C durante la fase de incubación.

10.7. Es importante siempre lavar los pozos dos veces con PBS antes de agregar el reactivo DCFH-DA para evitar el background del medio de cultivo de sus células.

10.8. Los inductores de estrés oxidativo deben asegurar viabilidades mayores al 65% para no afectar la actividad de las esterasas.

# 11. Anexos

## 11.1. Protocolo para la cuantificación de DCFH-DA en HT-29 y MCF-7

### 1. Siembra celular

1. Siembre  $3 \times 10^5$  células de cáncer colorrectal HT-29 por pocillo en una placa de 24 pocillos y  $2 \times 10^5$  células de cáncer de seno MCF-7 y mantenga las células en medio 250 $\mu$ L de DMEM durante la noche a 37 °C.
2. Reemplazar el medio de cultivo con 0,03  $\mu$ M DOX y 0,04 %v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para MCF-7 y para HT-29 6,25  $\mu$ M DOX y 0,16 %v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que contiene medio e incubar durante 24 h a 37°C

### 2. Preparación de la solución DCFH-DA

1. Disolver 9,7458 mg de DCFH-DA en 1 mL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para hacer una solución madre de 20 mM.
2. Diluya la solución madre con PBS en una solución de trabajo de 10  $\mu$ M justo antes de agregarla a los pozos.
3. Colocar esta solución de trabajo en el vórtex durante 10 s.

### 3. Tinción DCFH-DA

1. Retire el medio que contiene el fármaco y lávelo dos veces con PBS.
2. Agregue 250  $\mu$ L de la solución de trabajo DCFH-DA 10 $\mu$ M en cada pocillo e incube a 37 °C durante 30 min.
3. Retire la solución de trabajo DCFH-DA y lave 1 vez con PBS.
4. Agregue 500  $\mu$ L de PBS 1x a cada pocillo.

### 4. Adquisición de imágenes y medición de intensidad.

1. Tome imágenes fluorescentes representativas para cada pocillo utilizando el canal de proteína fluorescente verde (GFP) en un microscopio de fluorescencia.
2. Después de tomar imágenes, retire PBS y agregue 250  $\mu$ L de tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) a cada pocillo.

3. Incubar en hielo durante 5 min, posteriormente centrifugar a  $21.130 \times g$  durante 10 min luego recoger el lisado celular en tubos negros eppendorf de 1,5 mL.
4. Centrifugar a  $21.130 \times g$  durante 10 min.
5. Transfiera 5  $\mu\text{L}$  del sobrenadante que contenga 45  $\mu\text{L}$  de solución A+B para medir la concentración de proteína usando el Kit de cuantificación de Ácido Bicinonínico (BCA)
6. Normalice las intensidades de fluorescencia con las concentraciones de proteínas con la siguiente ecuación

$$\begin{aligned}
 &= \text{Concentración de proteína (mg/mL)} \times \text{Volumen final del pozo (mL)} \\
 &= \text{mg de proteína por pozo} \\
 &= \frac{\text{Fluorescencia emitida por pozo tratamiento} - \text{Fluorescencia emitida pozo control}}{\text{mg de proteína por pozo}} \\
 &= \frac{\text{Unidades de fluorescencia (UF)}}{\text{mg de proteína}}
 \end{aligned}$$

## 12. Referencias bibliográficas

- Benezer-Benezer, M., Castro-Mercado Ernesto García-Pineda, E., & García-Pineda, E. (2008). *Revista Mexicana de Fitopatología . La Producción de Especies Reactivas de Oxígeno Durante la Expresión de la Resistencia a Enfermedades en Plantas*.
- Čapek, J., & Roušar, T. (2021). Detection of oxidative stress induced by nanomaterials in cells—the roles of reactive oxygen species and glutathione. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26164710>
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 16).
- Christopoulos, T. K., & Diamandis, E. (1986). christopoulos1996. *Academic Press*, 309–335. <https://doi.org/10.1016/B978-012214730-2/50015-7>
- Daniel, R. M., & Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. In *FEBS Letters* (Vol. 587, Issue 17, pp. 2738–2743). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.027>
- Dayem, A. A., Hossain, M. K., Lee, S. bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 594, 57–72. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4)
- Figueroa, D., Asaduzzaman, M., & Young, F. (2018). Real time monitoring and quantification of reactive oxygen species in breast cancer cell line MCF-7 by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 94, 26–33. doi:10.1016/j.vascn.2018.03.007
- Henninger, C., & Fritz, G. (2017). Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. In *Cell Death and Disease* (Vol. 8, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.418>
- Khan, I., Khan, F., Farooqui, A., & Ansari, I. A. (2018). Andrographolide Exhibits Anticancer Potential Against Human Colon Cancer Cells by Inducing Cell Cycle Arrest and Programmed Cell Death via Augmentation of Intracellular Reactive Oxygen Species

Level. *Nutrition and Cancer*, 70(5), 787–803.  
<https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1470649>

- Kim, S. J., Kim, H. S., & Seo, Y. R. (2019). Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5381692>
- León-González, A. J., Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2015). Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 98, Issue 3, pp. 371–380). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.017>
- Li, Y. R., & Trush, M. (2016). Defining ROS in Biology and Medicine. *Reactive Oxygen Species*, 1(1). <https://doi.org/10.20455/ros.2016.803>
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J. P., & Mankhetkorn, S. (2005). Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(2–3), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.06.011>
- Miller, M. E. (2018). *Cancer* (eBook Collection). Momentum Press.
- O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Ois Pognan, F. È. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In *Eur. J. Biochem* (Vol. 267).
- OMS. (2021). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- OMS. (2021). El cáncer mató a diez millones de personas en 2020, la mayoría en países de renta baja y media. <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>
- Ortega-Villasante, C., Burén, S., Barón-Sola, Á., Martínez, F., & Hernández, L. E. (2016). In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives. In *Methods* (Vol. 109, pp. 92–104). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.07.009>
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. In *Drug Resistance Updates* (Vol. 7, Issue 2, pp. 97–110). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.004>
- Perillo, B., di Donato, M., Pezone, A., di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 52, Issue 2, pp. 192–203). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>

- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. In *Indian Journal of Clinical Biochemistry* (Vol. 30, Issue 1, pp. 11–26). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pilco-Ferreto, N., & Calaf, G. M. (2016). Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*, 49(2), 753–762. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3558>
- Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1863, Issue 12, pp. 2977–2992). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>
- Santa Cruz Biotechnology, I. (2010). BCA Protein Assay Protocol . <https://datasheets.scbt.com/sc-202389.pdf>
- Tetz, L. M., Kamau, P. W., Cheng, A. A., Meeker, J. D., & Loch-Carusio, R. (2013). Troubleshooting the dichlorofluorescein assay to avoid artifacts in measurement of toxicant-stimulated cellular production of reactive oxidant species. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 67(2), 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.195>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). Cell Culture Media Formulation Tool. Retrieved June 18, 2022, from <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/gibco-media-formulation-tool.html>
- Thermo Fisher Scientific. (2015). Generating and Detecting Reactive Oxygen Species. <https://www.thermofisher.com/co>
- Ye, Z. W., Zhang, J., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2015). Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1850, Issue 8, pp. 1607–1621). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.010>
- Yordi, E. G., Molina Pérez, E., Matos, M. J., & Villares, E. U. (2012). *Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence*. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)