

# MECANISMO DE ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN CULTIVOS CELULARES

Santiago Oviedo Rouco<sup>1</sup>, Ezequiel Akaherajiko<sup>2</sup>, Isis Coalova<sup>3</sup>, Gabriela Chaufan<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Educación Técnica N°2 de Merlo, <sup>2</sup>Escuela de Educación Técnica N° 1 de Ituzaingó,

<sup>3</sup>Departamento de Química Biológica, FCE yN, UBA, <sup>4</sup>CONICET

## Introducción

El hexaclorobenceno (HCB) es un hidrocarburo aromático, que antiguamente se utilizaba como plaguicida. Actualmente y debido al descubrimiento de su toxicidad, se ha prohibido su uso. De todas maneras, a causa del largo tiempo en el que se utilizó, su alto grado de persistencia y que sigue siendo producto lateral en la fabricación de otros compuestos clorados, aun continúan detectándose altas concentraciones de HCB (superiores al máximo permitido en el ambiente) en distintos lugares del mundo.

## Objetivo

El objetivo del trabajo es determinar el mecanismo de acción del HCB sobre una línea celular tumoral de Hep G-2, partiendo de la búsqueda de la curva de crecimiento de las células en presencia de HCB sobre la línea y averiguando luego si el mecanismo de acción produce oxidación sobre la membrana celular.

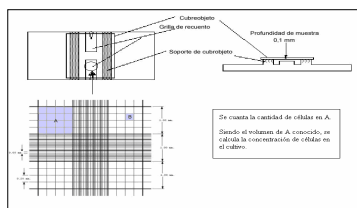
## Materiales y Métodos

Se partió de un cultivo de una línea celular de hepatocitos humanos (hepatoma) Hep G-2 crecidas en medio completo.

Se trataron 6 cultivos separados con distintas concentraciones de HCB, donde el cultivo control no contenía HCB y los otros contenían 1, 5, 10, 100, 1000 µg/l cada uno y se cultivaron durante 24 hs, en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub>, a 37° C.

Separación de células vivas y células muertas: las células muertas, que se despegan del sustrato (superficie de plástico), fueron descartadas y el cultivo lavado con PBS. Las células que quedan adheridas al sustrato formando una monocapa son las células vivas.

El número de células se contó en una cámara de Neubauer, sobre 1 µL de cultivo.



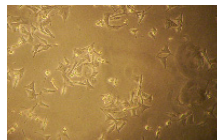
Se repitió la tarea a las 48 hs y a las 72 hs, para determinar la curva de crecimiento.

La determinación de proteínas se realizó usando el reactivo de Bradford y el empleo de una curva de calibración, con suero albúmina bovina 0,1 mg/ml como estándar.

La determinación de malódialdehído (MDA) se realizó por el método del TBARS (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico). Estos resultados no se presentan porque calleron fuera del límite de detección.

## Resultados

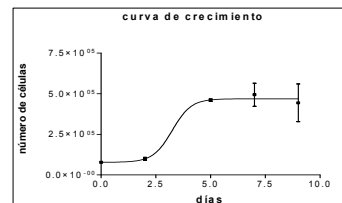
### Morfología de los hepatocitos en cultivo



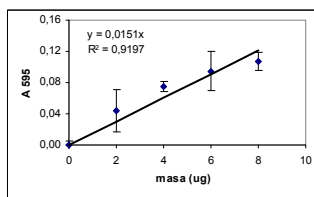
Microscopía óptica de la línea celular Hep G2, en condiciones control

### Curva de crecimiento del cultivo de hepatocitos en condiciones control

Se determinó el número de células en cultivos de 2, 5, 7 y 9 días, bajo condiciones control



### Determinación de proteínas

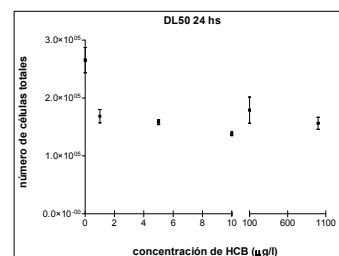


El cuarto punto de la curva de calibración se alejó de la linealidad, razón por la cual se descartó. Los resultados indican que la absorbancia de las muestras debe caer por debajo de 0,100, para poder aplicar la ley de Lambert y Beer

### Efecto del HCB sobre cultivos de HepG2

El HCB provocó un efecto dual. A bajas concentraciones del tóxico cayó el número de células en función de la concentración, en tanto que a  $\geq 100$  µg/l se obtuvieron valores normales.

Posiblemente esto se deba a que el HCB acelera el crecimiento, lo cual compensa el descenso por muerte celular.



## Conclusiones

Durante la realización de la presente experiencia didáctica, los alumnos aprendieron a:

1. Realizar cultivos celulares
2. Contar células en cámara de Neubauer
3. Realizar curvas de calibración espectrofotométricas
4. Pudieron comprobar que el HCB afecta el crecimiento del cultivo.