

“Efectos de la radiación ultravioleta sobre la viabilidad de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT”

Autores

Estudiantes:

Figueroa, Joaquín¹

Mejías, Daniela¹

Silva, Irina¹

Zanotta, Doménica¹

Zapata, Valeria¹

Orientadores:

QF. Gabrielli, Adriana ² (asistente)

Dra. Lafon-Hughes, Laura ^{2,3} (co-responsable)

Dr. Peluffo, Daniel ² (responsable)

¹Ciclo de Metodología Científica II 2022 - Facultad de Medicina - Universidad de la República, CENUR Litoral Norte, Salto, Uruguay

²Grupo de Biofísicoquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República (CENUR LN, Udelar)

³Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Ministerio de Educación y Cultura (IIBCE, MEC)

**CENUR Litoral Norte - Universidad de la República
Salto, Uruguay - 2022**

UC-24.CICLO DE METODOLOGÍA CIENTÍFICA II-2022, Grupo 114

Índice de contenidos

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS	10
DISEÑO EXPERIMENTAL	11
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	23
AGRADECIMIENTOS	24
CONSIDERACIONES ÉTICAS	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
ANEXOS	29

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Efecto de la exposición a radiación UVA (1 - 10 J/cm²), UVB (0,05 - 0,5 J/cm²) o ambas simultáneamente, sobre la viabilidad celular (ensayo MTT) en la línea HaCat. **pag.15.**
- Figura 2. Efecto de la exposición a radiación UVA (0,3 - 1 J/cm²), UVB (0,017 - 0,05 J/cm²) o ambas simultáneamente, sobre la capacidad de proliferación (ensayo clonogénico) en la línea celular HaCaT. **pag.18.**

RESUMEN

La exposición a la radiación ultravioleta (UV), proveniente del sol, particularmente UVA (315-400 nm) y UVB (280-314 nm), afecta al ADN de los queratinocitos humanos, llevando al daño del mismo y a la eventual generación de cáncer de piel. No se han encontrado estudios que intenten reproducir las condiciones reales de exposición solar en la superficie terrestre combinando la exposición de UVA-UVB en una proporción energética aproximada de 95%:5% respectivamente(1). Entonces, se procuró simular las condiciones reales de exposición solar, respetando las proporciones de UVA y UVB. En este trabajo, se evaluó la viabilidad y capacidad clonogénica de la línea celular proveniente de queratinocitos humanos, HaCaT, expuesta a radiación UVA y/o UVB utilizando un irradiador BIO-SUN.

Se determinó la viabilidad celular a través de la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Se expusieron las células a UVA y/o UVB en fluencias correspondientes a aproximadamente 3 o 30 minutos de sol. También se utilizó el ensayo clonogénico exponiendo las células a UVA y /o UVB a fluencias correspondientes a aproximadamente 1 o 3 minutos de sol(2).

Al irradiar las células respetando las proporciones energéticas de UVA y UVB que llegan a la superficie terrestre, se observó una importante pérdida de viabilidad celular y eficiencia clonogénica, casi exclusivamente atribuible al UVB. La interpretación de los resultados debe tomar en cuenta que la utilización del irradiador permitió irradiar con UVA a una tasa que es similar a la solar, pero la irradiación con UVB fue a una tasa unas 10 veces mayor, posiblemente disminuyendo así las probabilidades de reparación del daño genético inducido. Sería deseable continuar con estos experimentos para disminuir la variabilidad, así como realizar nuevos estudios simulando la fluencia y tasa de irradiación con UVA-B.

Palabras clave: Queratinocitos humanos; HaCaT; Sol; UVA-UVB; Viabilidad; Eficiencia clonogénica.

ABSTRACT

The exposure to ultraviolet radiation (UV) coming from the sun, particularly UVA (315- 400 nm) and UVB (280-314nm), affects the DNA of human keratinocytes, causing genetic damage and leading to the eventual generation of skin cancer. Studies that combine the actual exposure conditions to UVA-UVB in an energetic proportion approximately of 95%:5% respectively, are still missing(1). Therefore, the present work tried to simulate the actual conditions of sun exposure, according to its UVA-UVB proportions. The viability and clonogenic capacity of the cell line from human keratinocytes, HaCaT, was evaluated upon exposure to UVA and/or UVB radiation using a radiator BIO-SUN.

Cell viability was determined through the metabolic reduction of 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay). Cells were exposed to UVA and/or UVB at fluences corresponding approximately to 3 or 30 minutes of sun exposure(2). Cell proliferation ability was tested through the clonogenic assay, exposing cells to UVA and/or UVB at fluences corresponding to approximately 1 or 3 minutes of sun exposure.

By irradiating the cells, using the energetic proportions of UVA and UVB that reach the Earth surface, an important loss of cell viability and clonogenic efficiency was observed, almost exclusively due to the UVB. The interpretation of these results must take into account that the irradiator supplied UVA at a rate that is similar to that of the sun. Irradiation with UVB, on the other hand, was performed at a 10-fold higher rate, possibly reducing the probability of induced genetic damage repair. It would be desirable to increase the number of these experiments to reduce the assay variability, as well as to perform new studies simulating the fluence and UVA and UVB rates of irradiation.

Key words: Human keratinocytes; HaCaT; Sun, UVA - UVB; viability; clonogenic efficiency.

INTRODUCCIÓN

Diariamente el ser humano está expuesto a rayos ultravioleta (UV) provenientes del sol, conformados en un 95% por radiación UVA y un 5% por UVB (1). Aunque la exposición a los mismos ofrece algunos beneficios a los seres humanos tales como: la conversión de la vitamina D a su forma activa (3), la participación en el metabolismo fosfocálcico (3), y la modulación del sistema inmune (4), la exposición diaria y acumulativa a la radiación UV es capaz de generar múltiples daños como suprimir el sistema inmune, acelerar el envejecimiento (fotoenvejecimiento) y eventualmente favorecer el desarrollo tumoral (3).

Se encontraron varios trabajos sobre el potencial daño que genera la radiación UVA y UVB al ADN, no obstante, también se destacó un estudio en el cual se vio el efecto beneficioso de la radiación como tratamiento de patologías dermatológicas (5). Ante tal dicotomía, se observan los dos efectos de la radiación UV, tanto malignos como benévolos, evidenciándose dichos efectos desde dianas tan pequeñas como el ADN hasta en el órgano más grande del ser humano, la piel.

En este sentido se encontraron estudios que, a diferencia de la presente investigación, evalúan el daño que genera la radiación UV en el ADN de las células. En uno de ellos (6) se mide la 8-Oxo-2-Desoxiguanosina en células HaCaT, descubriendo que el daño oxidativo del ADN puede jugar un papel importante en el proceso de carcinogénesis de la piel.

Por otra parte, un ensayo clínico en piel humana evidencia que la fototerapia con UVA y UVB mejora a los pacientes con enfermedades esclerosantes o pseudoesclerosantes que consiguen terminar el tratamiento (5). Esta dualidad riesgo-beneficio es ampliamente conocida y contemplada en numerosos estudios (3), (1).

El sol emite rayos de luz visible, infrarrojos y radiación UV, en sus tres tipos UVA, UVB y UVC. En el pasaje por la atmósfera terrestre, parte de la radiación UV es absorbida: los rayos UVC son absorbidos en su totalidad por la capa de ozono y los rayos UVB en aproximadamente un 90%, por lo que no llegan en su totalidad a la superficie de la Tierra. La radiación solar total en la superficie terrestre varía en relación a la altitud, a la densidad de las nubes, la latitud geográfica, y hora del día, entre otros factores (1).

La radiación UVA comprende longitudes de onda de 315 a 400 nm, y penetra hasta la segunda capa de la piel. Esta radiación es nociva, pudiendo ser absorbida por cromóforos como también por el ADN, produciendo daño oxidativo y la formación de dímeros de pirimidina (CPD y 6-4 PP), entre otros mecanismos de daño del ADN (1).

La radiación UVB abarca longitudes de onda de 280 a 315 nm, penetrando en la primera capa de la piel. La misma es necesaria para producir vitamina D, lo que no quiere decir que este tipo de radiación no genere daño, ya que lo hace en gran medida. En comparación con los rayos UVA produce menos daño oxidativo y más dímeros de pirimidina (1).

Por último, UVC se emite en longitudes de onda de 100 a 280 nm. Dado que es mayormente absorbida por la atmósfera, no se considera un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de piel (1).

Según la estadística del Laboratorio de Energía Solar (LES) instalado en el territorio uruguayo (proyecto elaborado para proporcionar información confiable sobre el recurso solar en el país), el promedio anual de radiación UV que alcanza la superficie uruguaya es de 4,73 kWh/m²; esto correspondería a 1,18 J/min/cm². A su vez, es posible discernir la gran variabilidad de la radiación según la época del año, teniendo un promedio máximo en el año de 7,24 kWh/m² (1,8 J/min/cm²) en el mes de enero (verano uruguayo) y un promedio mínimo de 2,25 kWh/m² (0,56 J/min/cm²) en el mes de junio (invierno uruguayo) (7).

Con estos datos es interesante comparar la radiación solar que llega a la superficie terrestre considerando las diferencias en cuanto a latitud, altitud y longitud en los diferentes puntos del hemisferio terrestre, para así conocer si Uruguay se encuentra en una de las posiciones que reciben mayor radiación UV.

En este sentido se encontraron datos de que la radiación solar que llega a la superficie de Estados Unidos de Norteamérica tiene un promedio anual de 4,3 kWh/m² (1,07 J/min/cm²) (8) lo que es similar aunque un poco menor al promedio anual de radiación que llega a Uruguay.

La importancia de la investigación radica en que en Uruguay se observan las tasas más altas de incidencia y mortalidad por cáncer de piel, en comparación con el resto de Latinoamérica (9), siendo la exposición a la radiación UV uno de los principales factores predisponentes para la aparición de cáncer de piel (1).

El cáncer de piel se divide en cáncer no melanoma y melanoma. El cáncer de piel no melanoma a su vez se divide en cáncer de células escamosas y cáncer de células basales (9). El cáncer de células escamosas es de especial interés en esta investigación, ya que el mismo afecta a los queratinocitos, de los cuales deriva la línea celular en estudio denominada HaCaT.

El cáncer de piel no melanoma, suele excluirse de las estadísticas oficiales por las dificultades que ofrece su registro. Por lo tanto, en Uruguay no se cuenta con registros estadísticos de incidencia ni de mortalidad de cáncer de piel no melanoma, a pesar de ser por lejos el más frecuente (10).

La presente investigación está focalizada en los efectos de la radiación UV sobre la piel humana, más específicamente en los queratinocitos, por lo cual se realizó una búsqueda exhaustiva de estudios previos en los cuales se haya expuesto la línea celular de queratinocitos de piel humana HaCaT a radiación UVA o UVB para así considerarlos como guía en la confección del presente diseño experimental.

Múltiples investigaciones (11), (12), (6), (2), (13), (14), (15) aprecian el daño celular generado por rayos UVA o por rayos UVB de manera individual, dejando como incógnita el efecto potencial de estas radiaciones en forma conjunta. Para el caso de la radiación UVA se han probado fluencias en el rango de $0,3 \text{ J/cm}^2$ (10) a 80 J/cm^2 (6) utilizando longitudes de onda de 330 a 400 nm (12), (15). Se ha demostrado que la radiación UVA puede generar citotoxicidad (12), aumentar determinados marcadores de transformación tumoral como metaloproteinasas de matriz, inducir sobreexpresión de queratina 13 y producir alteraciones morfológicas (16). A su vez, a dosis fisiológicamente relevantes, induce roturas de cadenas de ADN (15); todos estos cambios generados por la radiación UVA contribuyen a la conversión tumorigénica de las células.

En el caso de la radiación UVB se han probado fluencias en el rango de $0,0008$ (2) a $0,05855 \text{ J/cm}^2$ (13), utilizando longitudes de onda de 290 a 320 nm (14). Se ha observado que la irradiación repetida induce a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (2) y eventualmente al desarrollo de cambios tumorigénicos (14).

En este estudio se pretendió disecar la contribución relativa de la irradiación por UVA y UVB, así como explorar su interacción, manteniendo las proporciones energéticas que llegan a la superficie terrestre. Los efectos fueron cuantificados en términos de supervivencia y capacidad de proliferación, sobre la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.

Las células HaCaT son una línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides transformados de la piel humana adulta, no tumorigénica. Por lo tanto, HaCaT es la primera línea de células epiteliales humanas immortalizadas de un adulto que muestra una alta capacidad de diferenciarse y proliferar *in vitro*, siendo una prometedora herramienta para estudiar el efecto de la radiación UV (17).

En esta investigación se procedió a realizar dos ensayos: MTT y clonogénico. El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que evalúa la viabilidad celular a través de la determinación de la actividad metabólica, sin distinguir entre la proliferación y la supervivencia celular. Esto lo hace midiendo la conversión de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales de formazán (de color violeta) en células vivas por acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. Las células muertas no van a ser capaces de reducir el MTT y por lo tanto no darán lugar a un producto coloreado. Cabe destacar que, si se trabaja en el rango adecuado, para lo cual se han realizado previamente las correspondientes curvas de calibración, la intensidad del producto de color es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo (18).

El ensayo clonogénico es un estudio de supervivencia y proliferación celular *in vitro* que se basa en la capacidad de una sola célula de convertirse en una colonia. Estos ensayos se utilizan para estudiar las células luego de ser irradiadas o expuestas a determinados agentes citotóxicos. Esta prueba permite cuantificar la proporción de células que no solamente sobreviven, sino que conservan su capacidad de reproducción (19).

Se espera que del análisis de los resultados, se beneficien principalmente aquellas investigaciones inmersas en esta área de estudio, promoviendo el conocimiento de las ciencias básicas y alentando a futuras investigaciones relacionadas con esta temática.

HIPÓTESIS

La irradiación con UVA o UVB afecta la viabilidad celular y la eficiencia clonogénica, y su irradiación simultánea presenta efectos aditivos en células HaCaT.

OBJETIVOS

General:

Evaluar los efectos de la irradiación artificial de células HaCaT con UVA y/o UVB, de manera aproximada a la recibida por la exposición solar a 1, 3 o 30 minutos (2).

Específicos:

- Determinar la viabilidad celular a través de un ensayo MTT.
- Analizar la capacidad de generación de colonias a través de un ensayo clonogénico.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Cultivo celular

Las células HaCaT se cultivaron en un medio de cultivo compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium powder, High glucose, (+) L-glutamine, (+) pyridoxine HCl, 110 mg/L sodium pyruvate, con phenol red, Gibco Life Technologies, cat 12800-017, Lote 1904855) y 10% de suero fetal bovino (FBS- Invitrogen Gibco cat 12657029; Lote CP 19-3004 Exp 10/24). Durante el primer experimento no se utilizaron antibióticos, mientras que en los restantes experimentos se optó por emplear Penicilina y Estreptomina 100x. (Capricorn- Cat.No: PS-B). Se mantuvieron en una incubadora (Series II Water Jacket CO₂ incubator de Thermo Scientific Modelo 3111 Class 100) a 37°C y con 5% de CO₂. Para decolar las células, se utilizó tripsina-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0,5% en DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) 10x a volumen final (Capricorn Scientific, cat TRY - 1B10) y se realizó el conteo por el método de Trypan Blue.

Irradiación

Efecto relativo de UVA y/o UVB correspondiente al mismo tiempo de exposición solar y aditividad.

De la revisión bibliográfica de trabajos experimentales previos se obtuvieron rangos de fluencia utilizados, formulando así una escala que va desde 0,3 a 80 J/cm² y de 0,03 a 0,12 J/cm² para UVA y UVB respectivamente. Por su parte, se tomó como referencia que la irradiación solar que llega a la superficie terrestre es tal que en 30 minutos la energía del UVA es de 10 J/cm² y la del UVB 0,5 J/cm² (2).

Se utilizó el equipo irradiador BIO-SUN, el cual tiene lámparas que permiten irradiar a 365 nm (UVA) a 4,610 mW/cm² y a 312 nm (UVB) a 2,57 mW/cm². Por lo tanto, se logra entregar 10 J/cm² de UVA en 33 minutos y 0,5 J/cm² de UVB en 3 minutos con el objetivo de simular la radiación UV proveniente del sol (2). En base a esta recolección de datos, se irradiaron células HaCaT con UVA y UVB de forma individual y conjunta, manteniendo la proporción aproximada de 95% UVA y 5% UVB, y calculando a cuánto tiempo de exposición al sol corresponden. Se evaluó la viabilidad celular y la eficiencia clonogénica.

Se irradió a las siguientes fluencias:

- UVA 0,3 J/cm² y UVB 0,017 J/cm², lo que equivale aproximadamente a 1 minuto de radiación solar, utilizada en la evaluación de eficiencia clonogénica.
- UVA 1 J/cm² y UVB 0,05 J/cm² lo que equivale aproximadamente a 3 minutos de radiación solar, evaluado en el ensayo clonogénico y MTT.
- UVA 10 J/cm² y UVB 0,5 J/cm² lo que equivale aproximadamente a 30 minutos de radiación solar evaluado en el ensayo MTT.

El diseño experimental pretende evaluar cuál de las dos radiaciones (UVA o UVB) causa más muerte celular o pérdida de capacidad clonogénica, así como también evaluar si la exposición simultánea de UVA y UVB presenta aditividad, según la ecuación de Webb (20).

Evaluación de viabilidad celular: ensayo MTT

Al inicio del ensayo (día cero), se sembró 30.000 células/well en placas de 24 wells por triplicado (3 réplicas por tratamiento y tres más para el control). No se optó por emplear placas de 96 wells ya que las paredes del pocillo producen un efecto de sombra, que podría haber interferido en la radiación. Al día siguiente (día uno), se realizó los tratamientos con UVA, UVB y ambos en forma simultánea. Para irradiar se extrajo el medio de cultivo y se dejaron las células en 100 µL de PBS (PBS P4417 Sigma Life Science Lot SBLX8836), realizándose la manipulación en paralelo en los pocillos de células control. A las 24 horas post-irradiación (día dos) se realizó el ensayo de MTT (Sigma), el medio de cultivo de cada pocillo se reemplazó por una solución de 0,5 mL de MTT a una concentración de 5 mg/mL en PBS. Luego de una hora, se extrajo la solución. Los cristales de formazán se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), solvente orgánico que disuelve también las membranas celulares exponiendo el formazán.

Posteriormente, se trasvasó por triplicado 100 µL de la solución de formazán en DMSO a una placa de 96 pocillos, dado que el espectrofotómetro utilizado mide la absorbancia únicamente en este tipo de placas. Se midió la absorbancia a 540 con corrección de fondo a 690 nm en un lector multiplaca (Varioskan Flash) (21). El promedio de la lectura de las 3 réplicas químicas fue considerado el valor de absorbancia de cada pocillo original de la placa de 24.

Evaluación de la capacidad de proliferación celular: Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico requiere que las células estén viables, estudiando la formación de colonias *in vitro*, a raíz de la proliferación de una única célula. Llamaremos colonia a toda subpoblación celular que conste de al menos 50 células, siendo visible a simple vista.

Al inicio del ensayo (día cero), se realizó la siembra de placas a partir de un cultivo con un 60-80% de confluencia. En cada experimento, se sembró tres placas por cada tratamiento con 4000 células y tres para controles con en un rango de 1000 - 2000 células (réplicas) en 4 mL de medio completo. A las 24 horas de sembrado (día uno), se irradió las placas. Para ello, se extrajo las mismas del incubador, se cambió el medio de cultivo por 500 μ L de PBS. Luego del tratamiento, se mantuvo a las células en cultivo. Finalizada la incubación, luego de 6 o 7 días, habiendo más de 50 células por colonia, las placas se retiraron del incubador, descartando el medio por inversión de la placa. Luego se lavó las mismas con 1 mL de PBS, descartando la solución con la técnica mencionada anteriormente. Estas se fijaron con 1 mL de Metanol:ácido acético (3:1) y luego de 20 minutos se descartó el contenido y se tiñó con Cristal violeta al 0,4% a temperatura ambiente. Se las dejó en esta condición durante 40 minutos, enjuagándose posteriormente con agua destilada y llevándolas a la estufa para su secado durante toda la noche y su posterior conteo (18). Se realizó tres experimentos independientes y en cada caso se sembró por triplicado.

En cada instancia, se trabajó sembrando células en paralelo para un ensayo clonogénico y un experimento de MTT. Cada experimento tuvo 3 réplicas. Sin embargo, durante el tercer experimento del ensayo MTT, todos los tratamientos correspondientes a la exposición aproximada a 30 minutos de sol fueron descartados del presente estudio. Esta decisión fue tomada en vistas a que ocurrió un error procedimental en el cual los pocillos respectivos fueron irradiados con tapa.

Análisis estadístico:

Se abordó el estudio mediante diversos tests estadísticos, comparando y discutiendo los supuestos y las limitaciones de cada uno. Durante este proceso, se desarrollaron habilidades en el manejo de herramientas tales como Microsoft Excel, desarrollando gráficas, tablas de comparación de parámetros estadísticos de tendencia central y de dispersión, entre otras cosas. Se utilizaron algunos tests con carácter exploratorio, entre los que se incluyó el test *t* de Student.

La verificación de existencia de normalidad y la consideración de existencia de homocedasticidad de varianzas se abordó por una parte con tests estadísticos realizados utilizando el software Prisma que no es de acceso libre y gratuito. Por otra parte, también se realizó el análisis de manera intuitiva a través de la observación de la distribución de los datos.

Se utilizó de forma online el Astatsa para el cálculo de ANOVA y el test de Bonferroni a posteriori. Debido a la existencia de normalidad pero no homocedasticidad de varianzas, se utilizó también el Prisma para realizar un test no paramétrico (test U de Mann-Whitney).

RESULTADOS

Disminución de la viabilidad celular por la irradiación con UVB, pero no por UVA en fluencias aproximadas al mismo tiempo de exposición solar:

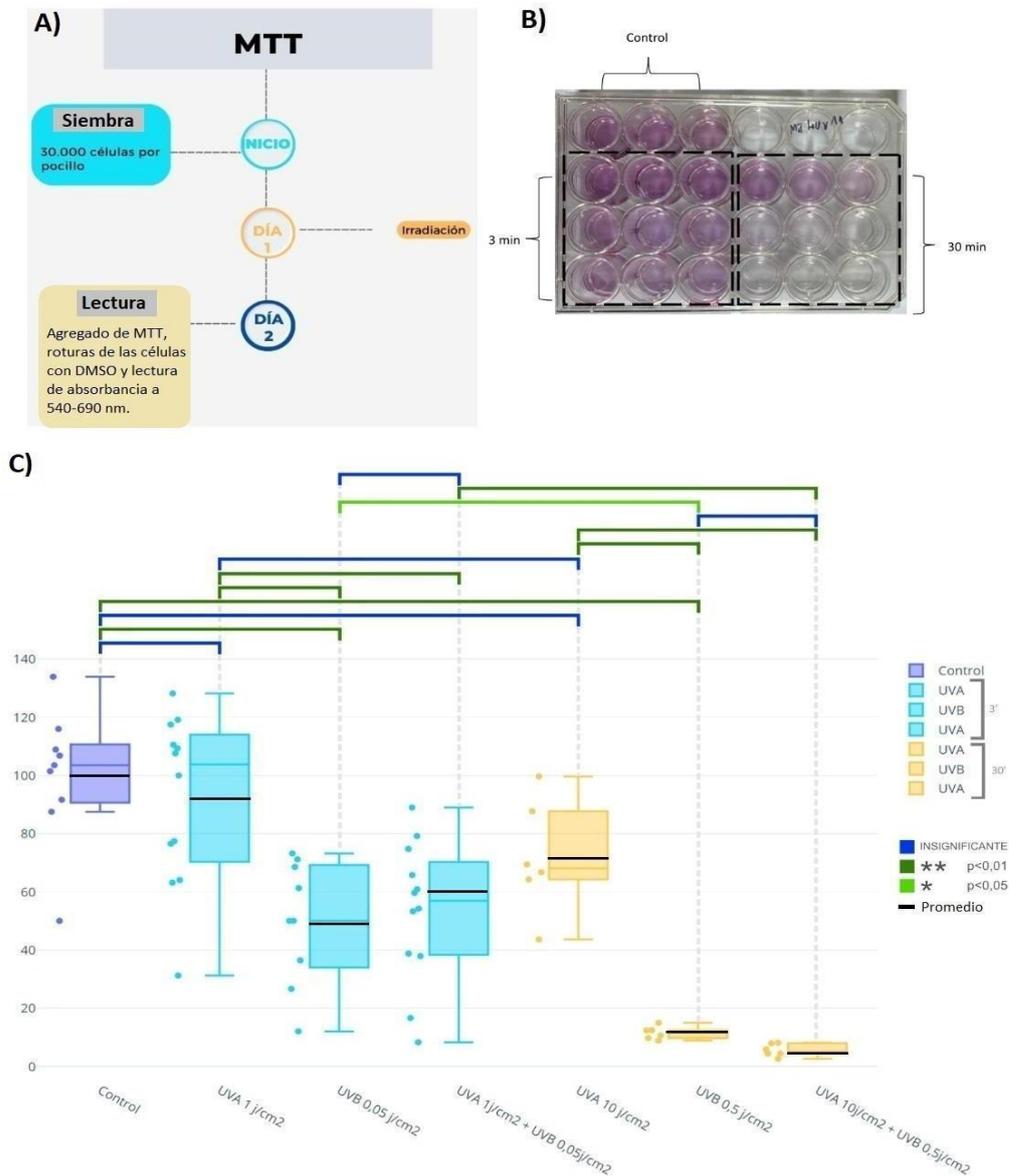


Figura 1. Efecto de la exposición a radiación UVA (1 - 10 J/cm²), UVB (0,05 - 0,5 J/cm²) o ambas simultáneamente, sobre la viabilidad celular (ensayo MTT) en la línea HaCaT. Ensayo de viabilidad celular por MTT. A) esquema temporal: se representan los momentos de siembra de células HaCaT, tratamiento y revelado con MTT. B) Se muestra placa de 24 pocillos en donde se realizaron los tratamientos. C) Gráfico box and whiskers de resultados: En abscisas se indica la fluencia de tratamiento y en código de color se indica cuanto tiempo de exposición al sol corresponde según (Calò and Marabini 2014). Se expresa la viabilidad como porcentaje del control, los datos corresponden a 6 12 pocillos por tratamiento, que provienen de al menos dos experimentos independientes. ANOVA y test de Bonferroni. *p < 0,05; **p < 0,01.

El esquema temporal de los experimentos de viabilidad celular (**figura 1 A**) consistió en irradiar las células al día siguiente de la siembra y evaluar la viabilidad con MTT a las 24 hs post-irradiación. La reacción colorimétrica observada se muestra en la **figura 1 B**, en una de las placas de 24 pocillos utilizadas para la siembra e irradiación de las células HaCaT. Se observa distinta intensidad de color violeta dependiendo de la radiación y el tiempo utilizado para cada tratamiento. Es así que se observa mayor intensidad en los pocillos control que en los pocillos que fueron expuestos a una radiación aproximada a 3 minutos y aún más a los que se los expuso a fluencias correspondientes a 30 minutos de exposición solar, siendo estos últimos casi incoloros. A su vez, se observa dentro del recuadro correspondiente a 3 minutos de exposición solar una diferencia en la intensidad del color entre los pocillos expuestos a UVA y los expuestos a UVB y UVB más UVA de forma conjunta, siendo en los primeros de forma mucho más intensa.

Los resultados se expresaron como un gráfico box and whiskers (de caja y bigotes) en el cual se representan los datos en cuartiles, dejando el mismo número de observaciones por cada cuartil. En las cajas se grafican los 2 cuartiles centrales, y en los bigotes los 2 cuartiles externos. Dentro de cada caja se evidencia la mediana con el color correspondiente a su misma caja y por otra parte en color negro el promedio de las observaciones (**figura 1 C**). Se representó en color celeste los resultados correspondientes a las células tratadas con fluencias correspondientes a 3 minutos de exposición solar, en amarillo aquellas irradiadas a fluencias aproximadas a 30 minutos de exposición solar, y en violeta el control.

Al mismo tiempo, se observan las líneas de comparación ubicadas en la parte superior de la gráfica, con los niveles de significancia estadística según el test de Bonferroni. Se utilizan las mismas con el objetivo de comparar al control con los distintos tratamientos, y también comparar los tratamientos entre sí. De acuerdo a su nivel de significancia, se representó en color verde a la disminución de la viabilidad celular que fue estadísticamente significativa y en color azul a la que no.

No hubo una disminución significativa de viabilidad celular para aquellas células tratadas con UVA en sus diferentes fluencias comparando con el control. No obstante, para las células tratadas con radiación UVB en sus diferentes fluencias, sí se pudo observar un efecto significativo en la disminución de la viabilidad celular en comparación con el control. Por otro lado, cuando se irradió en forma simultánea con UVA y UVB se observó una disminución de la viabilidad celular significativa en comparación con el tratamiento de UVA. En cuanto a la

comparación con el tratamiento UVB no existió una diferencia significativa de la viabilidad celular.

Esta diferencia entre el tratamiento con UVA y UVB simultáneo y las tratadas con UVA es congruente, ya que se observó únicamente que la disminución de la viabilidad fue significativa cuando se irradió con UVB.

Sin embargo, cuando se compara el tratamiento simultáneo (UVA y UVB) con el tratamiento de UVB, ésta diferencia no es significativa, permitiendo concluir que el efecto observado corresponde a la irradiación con UVB. Dicho de otra forma, no se observó que la irradiación con UVA haya resultado en cambios significativos en la viabilidad celular.

Disminución de la capacidad clonogénica por la irradiación con UVB, pero no por UVA en fluencias aproximadas al mismo tiempo de exposición solar:

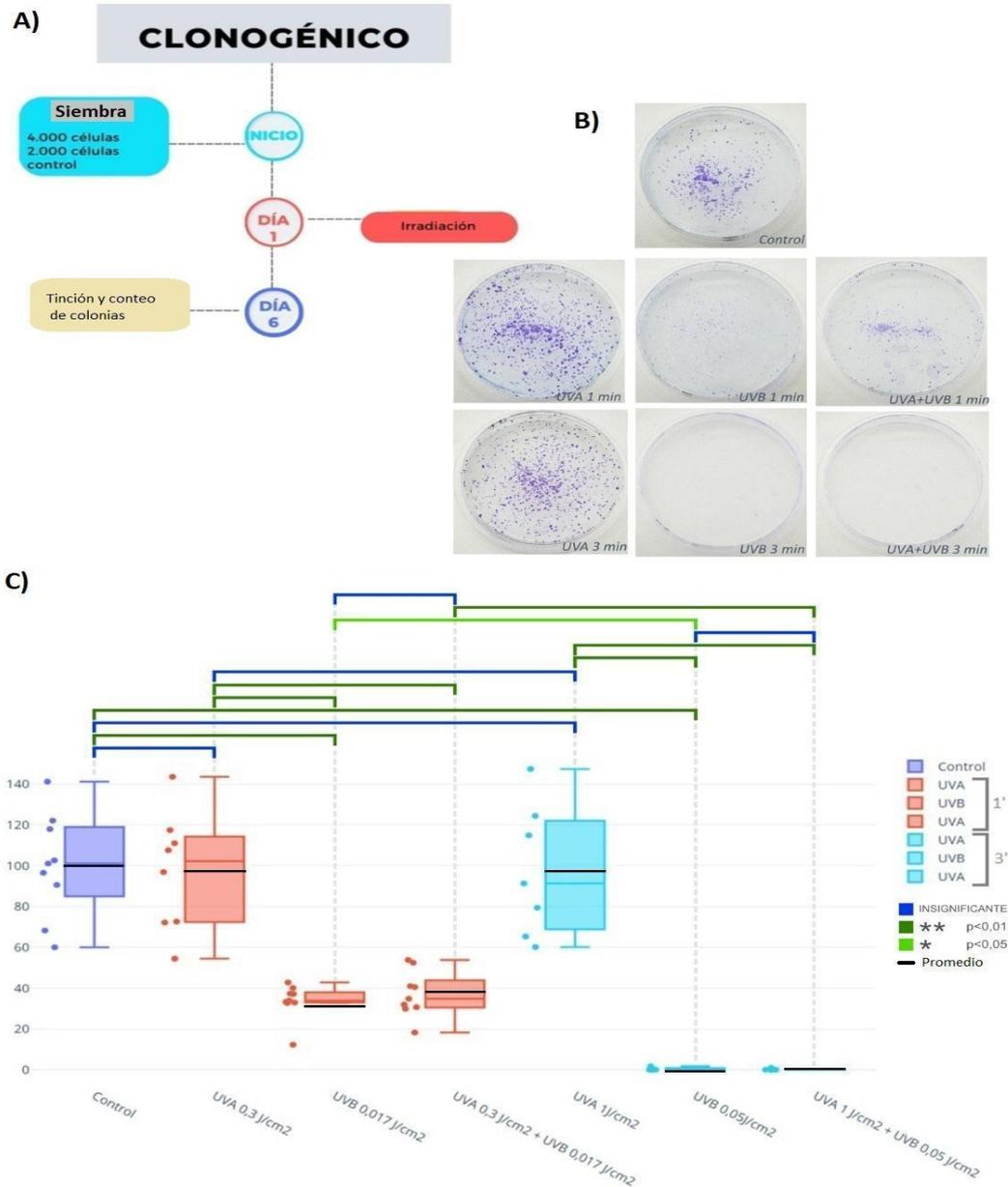


Figura 2. Efecto de la exposición a radiación UVA (0,3 - 1 J/cm²), UVB (0,017 - 0,05 J/cm²) o ambas simultáneamente, sobre la capacidad de proliferación (ensayo clonogénico) en la línea celular HaCaT.

Ensayo clonogénico. A) Esquema temporal: se representan los momentos de siembra de células HaCaT, tratamiento y ensayo clonogénico. B) En la imagen se muestran placas de cultivo en donde se realizaron los tratamientos. Se observan las colonias teñidas de violeta. C) Gráfico box and whiskers de resultados: En abscisas se indica la fluencia de tratamiento y en código de color se indica cuanto tiempo de exposición al sol corresponde según (Calò and Marabini 2014). Se expresa la eficiencia clonogénica como porcentaje del control, los datos corresponden a N= entre 7 y 9 placas por tratamiento, que provienen de al menos tres experimentos independientes. ANOVA y test de Bonferroni. *p < 0,05; **p < 0,01.

Se inició el estudio con la siembra de 4.000 células por placa en aquellas en donde se les realizó el tratamiento y 2.000 ó 1.000 células en aquellas escogidas como control. En el día 1 se procedió a realizar la irradiación, se irradió 0,3 J/cm² de UVA que emula 1 minuto de exposición solar, y 1 J/cm² correspondiente a 3 minutos de exposición solar aproximadamente (2). De la misma forma, se irradiaron las placas con 0,017 J/cm² de UVB aproximada a 1 minuto de exposición solar, y 0,05 J/cm² aproximada a 3 minutos de exposición solar (2). Entre los días 6 y 7 luego de la irradiación, se realizó la tinción de las placas y el conteo de las colonias (**figura 2 A**). Para finalizar, entre los días 6 y 7 luego de la irradiación, se efectuó el conteo de forma manual de las colonias a simple vista. En el mismo, fue considerado que la visualización a simple vista de cada colonia teñida de color violeta se daba cuando la misma estaba compuesta por más de 50 células. Se muestra un ejemplo en la **figura 2 B**.

En el gráfico box and whiskers (**figura 2 C**) nuevamente se representaron los datos en cuartiles dejando el mismo número de observaciones por cada cuartil. En las cajas se graficaron los 2 cuartiles centrales, y en los bigotes los 2 cuartiles externos. Dentro de cada caja se representó la mediana con el color correspondiente a cada caja y en negro el promedio de las observaciones. Se representó en color celeste los resultados correspondientes a las células tratadas con fluencias correspondiente a 3 minutos de exposición solar, en rojo aquellas tratadas con fluencias correspondientes a 1 minuto de exposición solar, y en violeta al control. En la parte superior del gráfico se representan líneas de comparación con los niveles de significancia según el test de Bonferroni las cuales comparan al control con los distintos tratamientos, y también compara los tratamientos entre sí, clasificando a estos por colores en cuanto a su significancia. En color verde se encuentran los valores significativos en cuanto a la disminución de la capacidad clonogénica y en color azul los que no fueron significativos.

No hubo una disminución significativa de la capacidad clonogénica para aquellas células tratadas con UVA en sus diferentes fluencias comparando con el control, mientras que, para las células tratadas con radiación UVB en sus diferentes fluencias sí se pudo observar un efecto significativo en la disminución de esta capacidad en comparación con el control. Por otra parte, cuando se trató con UVA y UVB en simultáneo se observó una disminución de la capacidad clonogénica, siendo esta significativa en comparación con el tratamiento de UVA. En cuanto a la irradiación con UVB no existió una disminución significativa de la capacidad clonogénica. Esta comparación entre el tratamiento con UVA y UVB en simultáneo y las tratadas con UVA es congruente, ya que se observó únicamente que la disminución de la capacidad fue significativa dada la presencia de

UVB. Por lo tanto, la irradiación en simultáneo no es significativamente diferente a la irradiación con UVB.

DISCUSIÓN

En base a los resultados se puede comparar las barras en celeste correspondientes a 3 minutos de irradiación solar de ambos ensayos, evidenciando que los efectos de la irradiación UV fueron más pronunciados en el ensayo clonogénico que en el de MTT. Esto se debe a que mientras el ensayo de MTT a 24 horas sólo requiere viabilidad en ese momento, el ensayo clonogénico requiere que las células no solamente estén metabólicamente activas, sino también que proliferen durante 5 o 6 generaciones, para alcanzar las 50 células que constituyen un clon visible.

Se observó una disminución significativa de la viabilidad con UVB pero no para el caso de UVA; de esta manera no fue posible comprobar un efecto aditivo de la irradiación simultánea con UVA y UVB en las presentes condiciones experimentales. Si bien los datos obtenidos sugieren que al exponerse al sol durante tiempos cortos, el agente responsable de la mayor parte de los efectos dañinos es el UVB, hay que tener en cuenta varias limitantes del estudio. En primer lugar, que la tasa fija de fluencia (irradiancia) brindada por el irradiador BIO-SUN, en el caso de UVA es similar a la radiación solar, mientras que para UVB la irradiancia es mayor (unas 10 veces) que la de la radiación solar. Claramente, una tasa de irradiación más alta disminuye las probabilidades de reparación del daño inducido. En segundo lugar, cuando se irradia la piel, no solamente hay queratinocitos sino varios otros tipos celulares. Células aisladas o en monocapa tienden a ser más sensibles a cualquier tratamiento que células a alta densidad o formando parte de un tejido. Además, en un sistema in vivo, UVB ejerce todo su efecto en la superficie del tejido (especialmente en los queratinocitos) porque las células tienen muchos cromóforos que absorben UVB. En cambio, UVA penetra en el tejido. Por lo tanto, es posible que haga menos daño en cada capa, pero que no sea despreciable su efecto en la piel en su conjunto. La irradiancia fluctúa también por otros motivos tales como: la altitud, latitud, la nubosidad, la presencia de la capa de ozono y hasta la hora del día en la que el ser humano se encuentre expuesto. Estas condiciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar el presente trabajo.

Existen estudios previos (22) concordantes en relación al ensayo MTT de la presente investigación. En el estudio citado se utilizaron ambas radiaciones UVB y UVA para valorar la fototoxicidad generada sobre las células HaCaT. Como resultado, obtuvieron que la radiación UVA generó cambios proliferativos en las células únicamente a fluencias mayores que $32,6 \text{ J/cm}^2$ y luego de 80 minutos de exposición, mientras que la radiación UVB con fluencias de hasta 15

veces menores ($2,1 \text{ J/cm}^2$) ya pudo generar daño celular a los 5 minutos. Al compararlo con el ensayo MTT realizado en la actual investigación, se logró ver que los resultados obtenidos para la radiación UVA son similares, ya que no hubo cambios significativos en la viabilidad celular a fluencias similares de UVA ($<10 \text{ J/cm}^2$) utilizadas en el presente estudio, pero sí fueron significativos al aumentar en gran medida la fluencia de UVA ($> 32 \text{ J/cm}^2$).

Por otro lado, con respecto al ensayo clonogénico se encontró una publicación en donde se usa queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT co-cultivados con células de melanoma humano A375 (23). En dicho trabajo, la radiación UV ($P<0,01$) induce una inhibición significativa en la proliferación de células HaCaT en comparación con las células de control, utilizando radiación UVA (365 nm) a fluencias de 1, 5 o 10 J/cm^2 y UVB (311 nm) a fluencias de 100, 200 o 400 mJ/cm^2 y midiendo la proliferación celular a las 0, 12, 24 y 48 horas después de la irradiación UV. Estos resultados difieren de lo hallado en el presente trabajo donde no se encontró una disminución significativa de la capacidad clonogénica para aquellas células tratadas con UVA, en sus diferentes fluencias comparando con el control. No obstante, este trabajo no está finalizado, existe una tendencia a la disminución de viabilidad y capacidad clonogénica con UVA que es posible que se torne significativa al repetir estos experimentos para de esta forma disminuir el margen de error.

En el presente proyecto, como fue descrito en el diseño experimental, se hizo un cálculo aproximado de fluencias de radiación UV correspondientes a 1, 3 y 30 minutos de exposición solar en la superficie terrestre, en base a la estimación de Caló y Marabini del 2014 (2). En el caso particular de Uruguay según los datos obtenidos del LES en 30 minutos de exposición solar se reciben $35,4 \text{ J/cm}^2$ de radiación UV y si esto se desglosa en sus proporciones sería $33,63 \text{ J/cm}^2$ de radiación UVA (95%) y $1,77 \text{ J/cm}^2$ de radiación UVB (5%) (7). Esto implica que las fluencias utilizadas en este trabajo corresponderían aproximadamente a un tercio del tiempo de exposición solar.

Se encontró en la bibliografía accesible un único trabajo que combina irradiación UVA y UVB, que utiliza células TK6 (línea linfoblastoide humana) (24). Estas fueron irradiadas a una fluencia independiente o combinada de 2 J/m^2 de UVB y de 20 y 50 kJ/m^2 UVA, y los autores interpretan que hay un efecto sinérgico de la irradiación simultánea de UVA y UVB si se evalúa la frecuencia mutagénica del gen TK.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En cuanto a lo evidenciado en el presente trabajo de investigación, no se puede concluir que la irradiación con UVA no tenga efectos significativos en las condiciones en las que se realizó este experimento, considerando necesaria la repetición de más ensayos experimentales.

Encontramos en la literatura solamente un único trabajo publicado en donde se evalúa la exposición a la radiación de UVA y UVB de forma conjunta. Este fue realizado en una línea celular distinta a la trabajada en la presente investigación, evaluando la frecuencia mutagénica de un gen específico, y utilizando una fluencia de UVA mil veces mayor a la empleada en este trabajo y sin una proporción real de las condiciones de exposición a la radiación solar. Por lo tanto, nuestras condiciones experimentales parecen ser inéditas, lo cual justificaría seguir adelante con esta investigación. Sería ideal poder repetir estos experimentos para disminuir el margen de error; conseguir un filtro que permitiera bajar la tasa de irradiación con UV-B unas 10 veces para que fuera más similar a la solar y evaluar, además de la viabilidad y la eficiencia clonogénica, parámetros que permitan precisar niveles de daño genético (mediante ensayo cometa o evaluación de foci γ H2AX).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a la Facultad de Medicina la oportunidad de realizar nuestro primer trabajo de investigación científica, ampliando nuestros conocimientos.

Al grupo de Biofísicoquímica perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas del CENUR Litoral Norte por brindarnos el espacio físico, los recursos materiales y sobre todo sus valiosos recursos humanos.

Y muy especialmente queremos demostrar nuestra gratitud a las siguientes personas:

Al Dr. Daniel Peluffo, Dra. Laura Lafon-Hughes y QF. Adriana Gabrielli por su gran calidad investigadora, docente y personal.

A la Dra. Deborah Keszenman su orientación en el uso del equipo del irradiador BIO-SUN y su colaboración.

Agradecemos también a nuestro ex-compañero Julián Jardim por su idea de irradiar manteniendo las proporciones 95:5% simulando la radiación solar que llega a la superficie terrestre.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

En el proyecto se trabajó con células HaCaT, una línea celular inmortalizada por clonación y que posee su origen en material celular extraído de un individuo masculino adulto en 1988 (17). La investigación con células de origen humano fue introducida en la investigación desde hace décadas, y si bien históricamente no existieron cuestionamientos éticos ni legales en relación a los usos científicos de estas líneas celulares (25), en la actualidad el marco bioético y normativo (26) planteó la necesidad que este proyecto fuese presentado para su revisión en un Comité de ética que lo avaló, garantizando la protección de la integridad y derechos humanos de las personas que dieron origen al material biológico involucrado. Por su parte, el proyecto pretende aportar al conocimiento científico básico, lo cual podrá conllevar beneficios a la sociedad.

Si bien al día de hoy consideramos que debe existir un consentimiento informado del paciente para generar una nueva línea celular a partir de sus células, y además que se debe proteger la identidad del paciente, también es cierto que las líneas celulares que se han distribuido por el mundo han permitido realizar numerosos descubrimientos con gran beneficio para la salud humana a la vez que se minimizó la utilización de animales de laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. IARC Monograph. RADIATION Volume 100 D a review of human carcinogens. *J Mater Process Technol* [Internet]. 2012;100(1):362. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055><https://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127252><http://dx.doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127252>
2. Calò R, Marabini L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *J Photochem Photobiol B Biol*. 2014;132:27–35.
3. Khater HM, Komnitsas KA, Davidovits J, Andrew RM, Lippiatt BC, Ahmad S, et al. Author 's Accepted Manuscript Author ' s. Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids [Internet]. 2016;115(1):60–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dineu.2015.08.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.06.026><http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2011.06.027><http://dx.doi.org/10.1016/j.appt.2014.02.007><http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.11.019>www.materbuild.com
4. Cela EM. “Exposición cutánea a la radiación Ultravioleta . Implicancias sobre funciones del sistema inmune .” [Internet]. Universidad de Buenos Aires Thesis doctoral; 2016. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/299812882.pdf>
5. Castellanos-Angarita A, Valbuena MC. Phototherapy in sclerosing and pseudo-sclerosing skin diseases Fototerapia en enfermedades cutáneas esclerosantes y pseudoesclerosantes. *Dermatol Online J*. 2020;26(10).
6. Riemschneider S, Podhaisky HP, Klapperstück T, Wohlrab W. Relevance of reactive oxygen species in the induction of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in HaCaT keratinocytes. *Acta Derm Venereol*. 2002;82(5):325–8.
7. Alonso-Suárez, R., Abal, G., Siri, R., Muse P. Mapa Solar del Uruguay [Internet]. Available from: <http://les.edu.uy/online/msuv2/>
8. Zhou Y, Meng X, Belle JH, Zhang H, Kennedy C, Al-Hamdan MZ, et al. Compilation and spatio-temporal analysis of publicly available total solar and UV irradiance data in the contiguous United States. *Environ Pollut* [Internet]. 2019;253:130–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.074>
9. MSP [Internet]. Montevideo, Uruguay; 2021. Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/13-junio-dia-mundial-contra-cancer-piel>
10. Barrios E, Garau M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *An la Fac Med*. 2017;4(1):04–66.
11. O'Reilly JP, Mothersill C. Comparative effects of UV A and UV B on clonogenic survival and delayed cell death in skin cell lines from humans and fish. *Int J Radiat Biol*. 1997;72(1):111–9.

12. Shorrocks J, Paul ND, McMillan TJ. The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2008;128(3):685–93.
13. Chang RS, Chen CS, Huang CL, Chang CT, Cui Y, Chung WJ, et al. Unexpected dose response of HaCaT to UVB irradiation. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2018;54(8):589–99.
14. Tyagi N, Bhardwaj A, Srivastava SK, Arora S, Marimuthu S, Deshmukh SK, et al. Development and Characterization of a Novel in vitro Progression Model for UVB-Induced Skin Carcinogenesis. *Sci Rep.* 2015;5(August):1–11.
15. Wischermann K, Popp S, Moshir S, Scharfetter-Kochanek K, Wlaschek M, De Grujil F, et al. UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. *Oncogene.* 2008;27(31):4269–80.
16. He YY, Pi J, Huang JL, Diwan BA, Waalkes MP, Chignell CF. Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance. *Oncogene.* 2006;25(26):3680–8.
17. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988;106(3):761–71.
18. Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Front.* 2020;1(3):332–49.
19. Anupama Munshi; Marvette Hobbs; and Raymond E. Meyn. M Easures of S Trength. In: R. D. Blumenthal © Humana Press Inc., editor. *Methods in Molecular Medicine.* vol. 110. Totowa, NJ; 2007. p. 1061–6.
20. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):621–81.
21. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986;89(2):271–7.
22. Bajgar R, Moukova A, Chalupnikova N, Kolarova H. Differences in the effects of broad-band UVA and narrow-band UVB on epidermal keratinocytes. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(23).
23. Tang L, Wu W, Fu W, Hu Y. The effects of phototherapy and melanocytes on keratinocytes. *Exp Ther Med.* 2018;15(4):3459–66.
24. McAdam E, Brem R, Karran P. Oxidative stress-induced proteindamageinhibits DNA repair and determines mutation risk and therapeutic efficacy. *Mol Cancer Res.* 2016;14(7):612–22.
25. Cardozo-de Martínez CA, Sorokin PD, Sotomayor MA. Bioética y derecho a decidir sobre el propio cuerpo, sus extensiones, productos y derivados: el discutible caso de las células HeLa. *Med y Lab.* 2015;21(11–12):565–78.

26. EJECUTIVO P, MINISTROS C DE. No Title [Internet]. 158/019 Uruguay; Available from: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/158-2019>

ANEXOS

ANEXO 1: RECURSOS DISPONIBLES - PRESUPUESTO

Equipamiento

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar Nuaire Biological Safety Cabinet Class II
- Incubador Series II Water Jacket CO₂ incubator de Thermo Scientific Modelo 3111 Class 100 operando a 37 °C y 5 % de CO₂.
- Microscopio óptico con lente de 40 X Nikon Eclipse TS100.
- Micropipetas P2, P10, P200, P1000
- Pipetor, pipetas de vidrio
- Cámara de Neubauer
- Sistema/s de filtración
- Lector de placas

Fungibles varios (plásticos y otros)

- Tips
- Flasks de 25 cm² Cellstar® Greiner Bio-one Germany, Ref 690160
- Placas de 96 pocillos
- Cajas de Petri
- Frasco descarte
- Filtros 0.22 µm para esterilización de medios

Stocks

- PBS (Life Technologies tablets cat 003002) Lote744633800B
- PBS P4417 Sigma Life Science Lot SBLX8836
- Tripsina - EDTA 0,5% en DPBS 10X (Capricorn Scientific, cat TRY-1B10).
- DMEM, Dulbecco`s Modified Eagle Medium powder, High glucose, (+) L glutamine, (+) pyridoxine HCl, 110 mg/L sodium pyruvate, con phenol red (Gibco Life Technologies, cat 12800-017, Lote 1904855)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Invitrogen Gibco cat 12657029), Lote CP19-3004 Exp 10/24

Presupuesto

Artículo	Descripción	Cant.	U\$S	\$	Costo final a utilizar \$
Medio de cultivo DMEM	Tagaca/12800017	10 x 1l	—	3354	(2 litros) \$700
FBS x 500 mL	Capricorn 12657029	500ml	294	12054	(200 ml) \$4821,6
Placas de 5 mL con tratamiento de superficie	60 X 15 MM	10 UNID.	—	383	(12 →120 placas) \$4596

Placas de 96 wells para MTT	cod. 137101 caja x50	50 UNID.	120	4920	(10 placas) \$984
PBS 500 mL, 10x	capricorn	5l	—	2318	(2l) \$927,2
Tripsina -EDTA (0.5 %) - DPBS (10X) 100 ml		1l	54,9	2250,9	(100ml) \$225,09
Tips P10, P20, P1000, bolsa x 1000	Biologística/200024 (deltalab)		—		\$3000
Filtros para filtrar el medio de cultivo	Express PLUS membrane Millipore (USA)	12 UNID	—	7344	\$7344
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Biologística/A2231,0001 (BioChemia AppliChem)	1 g	—	\$7808	(0,05g) \$390,4
Botellas de cultivo con tratamiento de superficie (flasks T25)	s/filtro. Biologística/690160 (greiner)	10 UNID	—	\$730	(20 botellas) \$1460
				Total \$	24.448,29