

EVALUACIÓN POR ENSAYO COMETA DE DAÑO CELULAR INDUCIDO CON PERÓXIDO DE HIDRÓGENO A LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA IN VITRO
Camacho Banda G. S. ⁽¹⁾; Morán Martínez J. ⁽²⁾; Betancourt Martínez N. D. ⁽²⁾; Monreal de Luna K. D. ⁽²⁾; Benítez Muños M. A. ⁽³⁾

⁽¹⁾Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro; ⁽²⁾ Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Torreón; ⁽³⁾Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

RESUMEN

Se realizó la evaluación del daño genómico inducido a células de sangre periférica, linfocitos, utilizando como agente genotóxico el peróxido de hidrógeno, el cual ha demostrado ser capaz de inducir un daño celular general, y específico al genoma de la célula. Se analizaron diferentes muestras de sangre periférica por duplicado, analizando el daño según el tiempo de exposición y concentración al agente genotóxico, haciendo uso del Ensayo Cometa para la comparación de los niveles de daño; cada categoría de cada cometa, fue asignada según el método por Collins (2002). Al final se realizó una comparación entre los controles y las células dañadas según su exposición a diferentes concentraciones del agente, así como a los diferentes tiempos de exposición a este. Se comprobó la relación entre la variación de concentraciones de H_2O_2 con un tiempo constante y diferentes tiempos de exposición a una concentración constante, y su relación con el daño celular que se presentó. Se llegó a la conclusión de que el nivel de concentración influye de manera directa en el daño celular que se presente, siendo el tiempo de exposición un determinante final del daño progresivo a observarse en las células al ser expuestas a un agente genotóxico.

INTRODUCCIÓN

La mayor parte del material hereditario, DNA, se localiza en el núcleo celular como bases químicas, Adenina, Guanina, Citosina y Timina; el orden y secuencia de estas determina la información para construir y mantener un organismo. Existen diferentes tipos de daños al DNA que inducen ciertas lesiones introduciendo desviaciones a su conformación normal de doble hélice. Un agente genotóxico, es capaz de producir modificaciones de las características particulares del DNA; el H_2O_2 es un agente capaz de dar lugar a múltiples reacciones, llegando a producir un daño celular. El daño celular producido por estos agentes al encontrarse en elevadas cantidades, ocurre sobre diferentes macromoléculas, tal es el caso de lípidos, proteínas y DNA, conociéndose a este daño como estrés oxidativo. En el DNA, el estrés oxidativo puede dar lugar a fenómenos como mutaciones y carcinogénesis. Los linfocitos humanos periféricos representan una población celular donde el DNA está predominantemente en la etapa pre-sintética del ciclo celular, fase Go. Los linfocitos humanos poseen un núcleo denso y citoplasma escaso. Se distinguen dos tipos principales de linfocitos, células T y B. El número total de linfocitos en un

adulto saludable puede ser aproximadamente 500×10^9 , y alrededor del 2% (10×10^9) están presentes en la sangre periférica y el resto se ubican en otros tejidos, como en timo, nodos linfáticos, tejido linfático del intestino, bazo y médula ósea. Para interpretar aberraciones cromosómicas, es de gran importancia conocer si el grupo de linfocitos periféricos pertenece al grupo de redistribución; cerca del 80% de los linfocitos (400×10^9), pertenecen a este y el tiempo total de recirculación es de cerca de 12 horas. Empleando los linfocitos de sangre periférica como modelo experimental no solo puede detectarse el daño cromosómico que ha sido inducido en los linfocitos en la sangre periférica, sino también aquellos que han sido inducidos en cualquiera de los órganos donde estas células se distribuyen en el cuerpo. Singh y colaboradores (1988) introdujeron una técnica en microgeles que involucra la electroforesis alcalina (pH 13) para detectar el daño al DNA en células individuales; se refiere a la migración del DNA en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, que al ser observada la célula al microscopio, por fluorescencia o tinción con plata, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear, y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo, por lo que es conocido como Ensayo Cometa, debido al patrón de migración del DNA que se produce. Comparado con otros ensayos de genotoxicidad, el Ensayo Cometa se distingue por: 1) Una demostrada sensibilidad para detectar bajos niveles de daño al DNA, 2) Rápida realización, 3) Un análisis de los datos a nivel de células individuales, 4) Requerir un pequeño tamaño de muestra, 5) Flexibilidad y bajo costo, 6) y es aplicable a cualquier población de células eucariotas; Todo esto justifica su amplio uso en la evaluación genotóxica in vitro, de químicos industriales, agroquímicos, fármacos, así como, en el biomonitorio ambiental y humano.

OBJETIVO

Evaluar el daño celular inducido por agente genotóxico (peróxido de hidrógeno), en linfocitos de sangre periférica para análisis de las rupturas de simple cadena y sitios abásicos producidos en el DNA por el agente como criterio de genotoxicidad mediante la electroforesis alcalina de células individuales mediante el Ensayo Cometa.

EXPERIMENTAL

Se utilizó solución de agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.5 %, solución de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 0.5 %, solución de lisis celular (45mL Stock de lisis, 4mL DMSO, 400μL TitonX100), solución tampón de electroforesis (EDTA (Na_2) + NaOH + HCL, pH13), solución tampón de neutralización (Tris + NaOH + HCL pH7), 1mL de H_2O_2 30%, v/v, Bromuro de Etidio. Se recolectaron muestras de tres sujetos sanos para los tres ensayos realizados. Cada categoría de cada cometa, fue asignada según el método por Collins (2002).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las muestras utilizadas para el ensayo fueron tomadas el día de su realización. En total se realizaron tres ensayos, el primero para obtener controles negativos, el segundo para evaluación de daño celular por exposición a 10μL de H_2O_2 con variación en los tiempos de exposición (1, 5, 10 minutos), y tercero para evaluación de daño celular por exposición a diferentes concentraciones de H_2O_2 (5, 10, 15μL) durante 5 minutos, realizándose todo por duplicado.

Durante los ensayos fue visible el daño ejercido por el agente genotóxico al visualizarse una reacción de efervescencia inmediatamente después de agregar el agente. Se analizaron las laminillas con un microscopio de fluorescencia (LABOMED, Lx 400), contándose cincuenta células por laminilla y se le asignó una categoría a cada célula según el tamaño de la cabeza y cola, y fluorescencia del cometa formado (Figura 1).

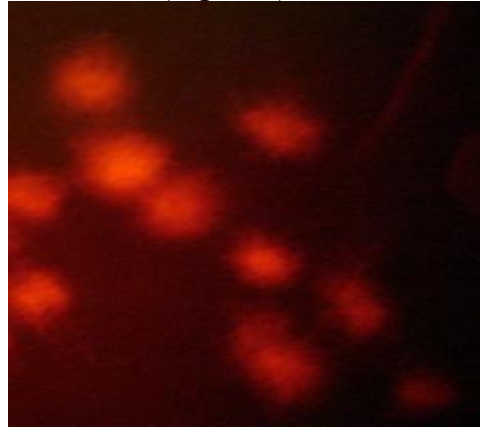


Figura 1. Cometas encontrados en tratamiento con 10 μ L de H₂O₂ durante 5 minutos presentando un nivel de daño celular 3.

Por otro lado se realizó una comparación grafica entre el control negativo y las células tratadas con 10 μ L de H₂O₂ con del tiempo de exposición (Figura 2).

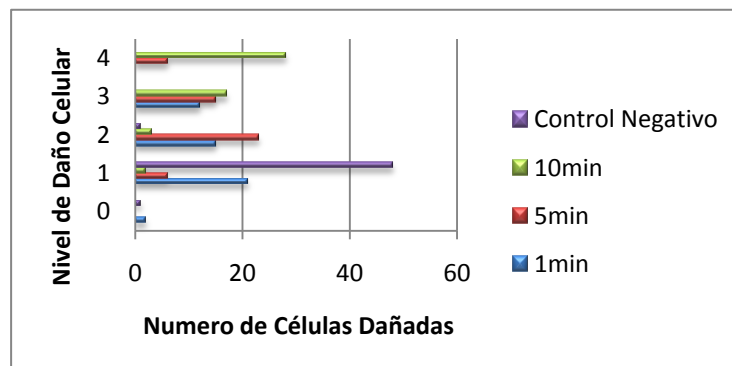


Figura 2. Evaluación de daño celular por exposición a 10 μ L de H₂O₂ con variación en los tiempos de exposición (1, 5, 10 minutos)

Se observó una tendencia de daño creciente conforme aumentaba el tiempo de exposición al agente genotóxico, observándose cometas de nivel 3 desde el primer tiempo de exposición, esto se atribuye a la relación del agente con la concentración celular, siendo la relación utilizada una relación 1:1 (10 μ L sangre periférica y 10 μ L H₂O₂). Se realizó una segunda comparación grafica entre el control negativo y las células tratadas con el peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones con un tiempo constante de exposición (Figura 3).

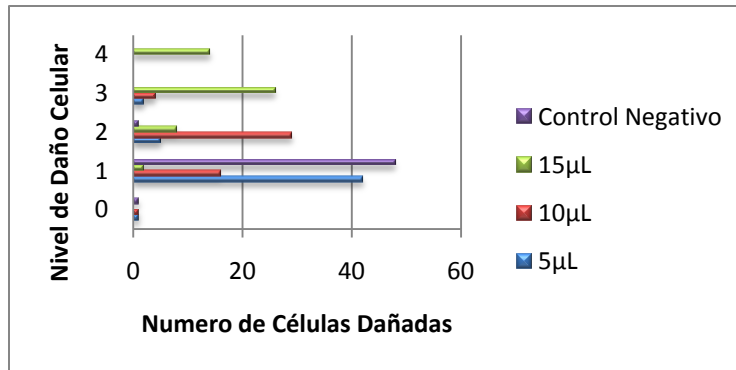


Figura 3. Evaluación de daño celular por exposición a diferentes concentraciones de H₂O₂ (5, 10, 15µL) durante 5 minutos

Se observó una tendencia creciente de daño celular según el aumento de la concentración, aumentando el daño de manera progresiva en las diferentes concentraciones evaluadas.

CONCLUSIÓN

El daño celular presentado según las variaciones de concentración de H₂O₂ con un tiempo constante y el daño a diferentes tiempos de exposición a una concentración constante de H₂O₂, ayudaron a concluir que conforme la concentración aumentaba se observaba un daño superior con crecimiento gradual según la exposición que la célula tenía al agente genotóxico. Por otro lado, al variar los tiempos de exposición se observó un daño celular importante desde el primer tiempo, pero su aumento no fue gradual pero si constante. Se llegó a la conclusión de que el nivel de concentración influye de manera directa en el daño celular que se presente, siendo el tiempo de exposición un determinante final del daño progresivo a observarse en las células al ser expuestas a un agente genotóxico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Noreña Atehortúa J. C.; Lloreda C. E.; Bogotá D.C., “Entendiendo el envejecimiento facial”, Cirugía Plástica y Reconstructiva. 11, 23-27, **2008**.

Arencibia Arrebola D.F., Rosario Fernández L.A., “Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro”, Toxicología, 20, 24-41, **2003**.

M. Madigan. J. Martinko. J. Parker, “Brock, Biología de los microorganismos”, Pearson, España, **2003**.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. “Molecular Biology of the Cell”, WH Freeman, New York, **2004**.

Zúñiga Venegas, L.A. “Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana”. Tesis Doctoral en Genética, Universidad Autónoma de Barcelona-Barcelona, España, **2009**.