

Centro de Investigaciones Biomédicas

NORMALIZACIÓN DE LA ELECTROFORESIS DE CÉLULAS INDIVIDUALES (ENSAYO COMETA)

Dr. Elio Antonio Prieto González y Dra. Niurka D. Llopiz Janer

Descriptores DeCS: ELECTROFORESIS/normas; DAÑO DEL ADN.

El cáncer es una enfermedad multifactorial con una elevada incidencia y mortalidad. Una condición indispensable para el desarrollo tumoral es la alteración en la secuencia del ADN o mutación. Las mutaciones pueden producir la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales (antioncogenes).

Establecer los niveles de daño al ADN en individuos y poblaciones es un criterio importante para caracterizar el riesgo de sufrir cáncer. Por otro lado el daño al ADN puede dar lugar a un incremento en la tasa de malformaciones congénitas cuando no se asocia al incremento de la esterilidad.¹

Muchas pruebas se han desarrollado para detectar daño al ADN, desde las bioquímicas y espectrofotométricas –que son muy costosas– hasta las pruebas citogenéticas y las basadas en la sedimentación del ADN dañado, pero todas tienen diversos inconvenientes que pueden resumirse en que a mayor sensibilidad del ensayo, mayor costo.²

La electroforesis de células individuales o ensayo cometa es una prueba rápida, de bajo costo y con una sensibilidad que supera en más de 100 veces a las pruebas citogenéticas y que permite detectar roturas de simple cadena y sitios lábiles a los

álcalis. Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariótica y permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales. Se utiliza además para monitoreo ambiental y análisis de sensibilidad a radiaciones. Puede aplicarse en las más disímiles circunstancias, lo que lo hace elegible para estudios de campo.³

Uno de nuestros principales objetivos es la evaluación del impacto ambiental sobre el ADN en diferentes ecosistemas con variable grado de contaminación. El estudio de organismos centinelas (peces, anfibios, moluscos, aves) no requiere el sacrificio del animal, el que incluso puede marcarse para su reevaluación, de manera que la alteración introducida en el sistema estudiado sea mínima.^{4,5}

Dado que esta técnica permite el análisis de diferentes tipos celulares en un mismo individuo, brinda una información más acabada de los niveles de daño al ADN a diferencia de los estudios citogenéticos que utilizan casi siempre el linfocito de sangre periférica.⁶

En nuestro laboratorio se ha normalizado este ensayo en estudios de monitoreo genético en linfocitos, evaluación del daño al ADN y la apoptosis inducidos por luz ultravioleta A (UVA) en queratinocitos

humanos y en la evaluación de la capacidad protectora de un pseudopéptido sobre el ADN de queratinocitos expuestos a UVA.

En Cuba es la primera vez que se aplica la técnica aunque es actualmente de las más utilizadas en el mundo. Durante la normalización del ensayo fue necesario realizar algunas modificaciones al protocolo original de Singh,⁶ que no sólo incrementaron la especificidad sino que contribuyeron al ahorro de reactivos.

Se aplicó el ensayo alcalino que fue descrito en 1988 por vez primera; fueron utilizados linfocitos de sangre periférica (LSP) de 21 donantes sanos y queratinocitos de la línea NC19 de la ICN Flow. Además, se determinó el grado de daño al ADN en 12 individuos sanos residentes en Ciudad de La Habana.

A cada individuo se le tomaron 40 µL de sangre total que de inmediato se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión a 37 °C; luego se vertió la agarosa sobre un portaobjetos previamente recubierto con agarosa de punto de fusión normal y luego de solidificarse la segunda capa se le cubrió con otra de agarosa de bajo punto de fusión. Cuando se trabajó con queratinocitos, éstos se contaron en una cámara de Neubauer y se utilizaron aproximadamente 10 000 células. Se incubaron las láminas en solución de lisis 2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris. HCl, pH 12,1 % Triton X-100 a 4 °C por 1 hora en una cubeta de electroforesis horizontal. La corrida se efectuó en el *buffer* 0,3 M NaOH 1mM EDTA a 0,7 V/cm durante 30 minutos a 4 °C. Todo el proceso se realizó con luz amortiguada.

Las preparaciones se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron 100 células en un microscopio de fluorescencia Olympus.

Se compararon 2 criterios de evaluación:

1. Atendiendo al nivel de daño determinado por la proporción de ADN que escapa del núcleo.

2. Utilizando un ocular con escala para medir el largo del cometa, el ancho del núcleo y luego obtener una razón que permita cuantificar el daño.

Los resultados indicaron elevados niveles de daño en los primeros individuos estudiados. Como no existían antecedentes de exposición a clastógenos y la sensibilidad de la técnica había sido comprobada exponiendo los linfocitos a concentraciones crecientes de H₂O₂ decidimos realizar algunas modificaciones, entre las cuales la más importante fue la de preparar las soluciones *stock* semanalmente. Los resultados antes y después de las modificaciones se observan en las tablas.

TABLA 1. Resultados antes de las modificaciones

Sujetos	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
1	17	56	6	14	8
2	2	7	12	38	41
3	13	22	16	25	25
4	9	27	23	27	13
5	6	9	18	42	25
6	3	13	31	26	27

TABLA 2. Resultados después de las modificaciones. Evaluación de los LSP de acuerdo con la longitud de la cola del "cometa"

Sujetos	Nivel 0	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
7	35	38	15	7	5
8	33	43	10	8	6
9	26	30	17	13	13
10	17	52	26	5	0
11*	3	9	50	32	6
12	11	80	9	1	0
13	9	73	17	1	0
14	0	12	82	5	2
15	0	12	77	9	2
16	4	77	15	4	1
17*	3	26	49	20	3
18*	4	19	50	23	4
19	0	36	57	7	0
20*	4	25	46	18	8
21	10	74	12	3	1

* Indica que el sujeto es fumador. Se evaluaron 100 células en cada caso.

En cuanto a los criterios de análisis todos los individuos fueron evaluados según ambos criterios y la medición de la longitud/anchura de la cola permitió una clasificación más precisa que la basada en niveles aunque la decisión de emplear uno u otro criterio depende de las po-

sibilidades de realizar morfometría en cada laboratorio.⁷

AGRADECIMIENTOS

A las técnicas en Procesos Biológicos Anamarys Pandolfi Blanco y Johany Hernández Chirino por su participación en la confección del presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vogel W, Nivard MJM. The response of germ cell to ethylene oxide, propylene oxide, propylene imine and methyl methane sulphonate is a matter of cell stage-related DNA repair. *Environ Molec Mutag* 1997;29:124-35.
2. Morley LL, Trainos KJ, Seshdrin R, Ryall RG. Measurement of *in vivo* mutation in human lymphocytes. *Nature* 1983;302:155-6.
3. Ramalho AT, Sinjevaric I, Natarajan AT. Use of the frequency of micronuclei as quantitative indicator of X ray induced chromosomal aberration in human peripheral blood lymphocytes. Comparison of two methods. *Mutat Res* 1988;207:141-6.
4. Perry VK, Andrews PW, Tice RR. Detection of DNA damage in aquatic species using the alkaline single cell gel assay (SCG). *Environ Molec Mutag* 1996;27(Suppl 27):53.
5. Andrews PW, Libbus B, Vasquez M, Tice RR. Fiber induced DNA damage as an indicator of carcinogenicity. *Environ Molec Mutag* 1996;27(27):4.
6. Singh NF, Mc Coy MT, Tice RR, Scheneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.
7. Collins A, Dusika M, Franklin M, Somorovská M, Petrovská H, Duthie S, et al. Comet assay in human biomonitoring studies. Reliability, validation and applications. *Environ Molec Mutag* 1997;30(2):139-46.

Recibido: 29 de marzo de 1998. Aprobado: 16 de abril de 1998.

Dr. *Elio A. Prieto González*. Calle Nacional No. 12913 e/ Corta y Puente. Reparto Aldabó, municipio Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba.