



MX0100322

## DETERMINACION DEL DAÑO Y LA REPARACION DEL ADN *IN VIVO* MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL.

Mendiola - Cruz, M.T. y Morales - Ramírez, P. Dpto. de Biología. Proyecto CB 705.

**Resumen.** Se estandarizaron las condiciones experimentales para el montaje de la técnica de Electroforesis Unicelular en Gel (EUG) en el laboratorio de Radiobiología Celular. Se realizaron experimentos preliminares con células humanas y de ratón expuestas a radiación ionizante o peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para inducir daño al ADN y verificar el funcionamiento de la técnica. Se analizó la cinética de reparación *in vivo* del daño inducido por radiación gamma en leucocitos de ratón, exponiéndolos a una fuente de  $^{137}Cs$  y tomando muestras de sangre periférica de la cola de cada ratón a diferentes tiempos de la exposición y procesándolas para EUG. En función de la proporción de células con daño en cada tiempo se determinó la existencia de un mecanismo de reparación rápida en los primeros 15 min., seguida por un ligero incremento en el daño y una etapa de reparación tardía entre los 30 y 90 min. Se analiza dicho comportamiento y la potencialidad de este sistema *in vivo*.

**Introducción.** Los métodos para evaluar el daño y la reparación del ADN, como el análisis de aberraciones cromosómicas, micronúcleos y/o intercambios en las cromátidas hermanas (ICH) (1-3), aunque dan información por cada célula, están limitados a usarse con células en proliferación. Con la técnica de Electroforesis Unicelular en Gel (EUG) se pueden detectar rupturas sencillas y sitios lábiles al álcali en el ADN de células eucariontes (4). Las células a tratar se embeben en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, se lisan, se desenrolla el ADN y se someten a un campo eléctrico para propiciar la migración del ADN fragmentado (5). Singh y col (1988), introdujeron ciertas modificaciones para optimizar la desnaturalización del ADN y la migración de fragmentos, aumentando la sensibilidad en la detección del daño en el material genético de células independientes (6). Las imágenes al microscopio de fluorescencia que resultan de la migración de los fragmentos del ADN del núcleo hacia el ánodo, semejan cometas en el espacio y de ahí que comúnmente también se le denomine "Ensayo Cometa". Esta técnica se aplica en cualquier tejido, células aisladas o cultivos específicos, muestras frescas o congeladas. Basta con 10,000 o 15,000 células por laminilla (5 ó 10  $\mu l$  de sangre por ejemplo), el procedimiento se puede realizar en poco tiempo (5-8 hr. aprox.) y su costo es bajo. La determinación del daño en células individuales, permite evaluar si toda la población presentan el mismo grado de daño, lo cual ayuda en la predicción del efecto de tratamientos específicos para tumores, dado que es posible identificar pequeñas poblaciones celulares resistentes o sensibles. Así mismo, esta técnica se ha utilizado para estudiar el daño y la reparación del ADN bajo diferentes condiciones experimentales y ha constituido una herramienta muy útil en la proposición de los mecanismos involucrados en estos procesos (7-10).

Los objetivos de este trabajo fueron :1) Estandarizar las condiciones experimentales para el uso de la técnica EUG en el laboratorio de Radiobiología Celular. 2) Verificar el funcionamiento de la técnica induciendo daño con radiación ionizante y  $H_2O_2$  en diferentes células. 3) Finalmente, estudiar la reparación *in vivo* de las lesiones inducidas en células sanguíneas de ratón por radiación gamma.

**Material y Metodología.** El desarrollo de los ensayos se basó en la metodología reportada por Singh y col. 1988 (6). Brevemente, se prepararon laminillas resuspendiendo el paquete celular en una solución de agarosa de bajo punto de fusión para darles soporte y se esparció sobre un portaobjetos, se colocaron cubreobjetos encima y se dejó solidificar a  $4^{\circ}C$ , se retiró el cubreobjetos por deslizamiento, se aplicó otra capa de agarosa y se metió al refrigerador para solidificar. Las laminillas se sumergieron en una solución de lisis con alta concentración de sales y detergentes a pH 10 en frío para romper las membranas celulares, posteriormente se colocaron en una cámara de electroforesis con amortiguador alcalino a pH 13 para permitir el desenrollamiento de la cadena de ADN y se sometieron a una corriente eléctrica de 25 V y 300 mA para propiciar la migración de los fragmentos del ADN dañado. Después se neutralizan las laminillas con un amortiguador de pH 7.5 y se tiñieron con bromuro de etidio para analizarlas con el objetivo de 25X en el microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro barrera de 590 nm.

Se tuvieron que realizar una serie de experimentos para estandarizar las siguientes variables : 1) Concentraciones y cantidades adecuadas de agarosa de punto de fusión normal y de bajo punto de fusión bajo para lograr una buena adherencia de los geles en los portaobjetos. 2) Tipo de portaobjetos más convenientes a utilizar (esmerilados o lisos). 3) Determinación de la cantidad adecuada de células. 4) Tiempo mínimo de permanencia en la solución de lisis y temperatura de ésta para asegurar la ruptura de las membranas celulares. 5) Temperatura y tiempo necesario para el desenrollamiento del ADN y para la migración adecuada de los fragmentos de éste durante la electroforesis. 6) Condiciones óptimas para la toma de fotomicrografías. 7) Criterios a considerar para el análisis del daño en las células.

Los experimentos preliminares para la determinación de la inducción de daño al ADN se realizaron en células humanas o de ratón como hepatocitos, leucocitos de sangre periférica o linfocitos aislados. Estas se resuspendieron en una solución salina de Hanks, las células a tratar se expusieron al  $H_2O_2$  (50  $\mu m$ ) o a la fuente de radiación gamma , en el caso de los experimentos *in vivo* se irradiaron los ratones dentro de un contenedor de plástico (0.5 - 1.0 Gy). En esta primera etapa se calculó el daño en función de la migración de los fragmentos de ADN según la longitud de la cola de los cometas en los negativos de las fotomicrografías.

Para estudiar la cinética de reparación en leucocitos de ratón, se expusieron los organismos a una fuente de  $^{137}Cs$  y se tomaron muestras de sangre periférica de la cola de cada ratón a diferentes tiempos de la irradiación. En los experimentos

iniciales se tomaron muestras a los 5, 30 y 60 min. después de la exposición, pero se consideró necesario aumentar una toma a los 15 y otra a los 90 min. Finalmente, se decidió tomar un total de 12 muestras, una antes de la exposición (control) y otras desde 3 hasta 90 min. después a intervalos de 5 o 10 min. Se calculó la proporción de células dañadas en función de la presencia de cola en un total de 300 células en cada muestra. Además los cometas se clasificaron en 3 categorías de acuerdo al tamaño de las colas en relación con el diámetro del núcleo : chicos (hasta un núcleo), medianos (de uno a dos núcleos) y grandes (más de 2 núcleos). Se cuantificó el porcentaje de cada uno en las muestras.

**Resultados y Discusión.** Las condiciones experimentales que resultaron óptimas para la utilización de la metodología EUG fueron las siguientes : esparcir uniformemente 200  $\mu$ l de agarosa de punto de fusión normal a una concentración de 0.75 % sobre cada portaobjetos liso y dejar secar para que actúe como superficie de adherencia de las siguientes capas. Resuspender las células en 100  $\mu$ l de la solución de agarosa de punto de fusión bajo al 0.5% y aplicar una última capa de 100  $\mu$ l de esta misma agarosa para protección. La cantidad adecuada de células es de 8000 aproximadamente (4  $\mu$ l de sangre) para evitar que queden encimadas. Una hora de lisis a 4°C es suficiente para lograr la ruptura completa de las membranas celulares. Para el desenrollamiento del ADN es necesario dejar las laminillas en el buffer de electroforesis durante 40 min. y para la migración adecuada del ADN se necesitan 40 min. de electroforesis. Se consideran como células sin daño las que aparezcan como núcleos y aquellas que presenten cola serán los cometas que presentan daño. Las fotomicrografías se deben tomar con película Technical Pan ajustando el microscopio a 30Din/800ASA, 3 min. de exposición, sin zoom, objetivo 25X. Al medir la longitud de cada cometa en el negativo se hace la conversión a micras tomando como referencia que los eritrocitos de 7  $\mu$ m miden 2 mm en los negativos tomados en estas condiciones.

Inicialmente se realizaron algunos experimentos para determinar el daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por exposición a una fuente de radiación gamma (Cs 137) con una dosis de 0.5 Gy. Los resultados indican que la exposición a radiación produjo una cantidad de rupturas en el ADN que se relacionó directamente con la longitud de migración de los fragmentos. En el caso del grupo control, el valor de migración equivalente a 7.52  $\mu$ m es prácticamente igual a la medida de los núcleos sin daño. Los linfocitos irradiados presentaron una migración de 24.25  $\mu$ m, la cual es 3.2 veces mayor que la del grupo control. La diferencia entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$  (prueba t de student). En la distribución de la migración del ADN, el 95% de las células del grupo control se ubicó en el valor equivalente al núcleo sin daño. En el irradiado el valor de 24.5  $\mu$ m, que es el de mayor longitud de migración, tuvo el más alto porcentaje equivalente al 40%. Realizando otros experimentos similares para analizar más células se observó que la reproducibilidad de los resultados es aceptable.

Para poder utilizar un tipo celular diferente a los linfocitos con esta metodología, se realizaron otros experimentos con hepatocitos de ratón tratados con  $H_2O_2$  a una concentración de  $50 \mu M$ . Se apreció que la exposición de estas células al peróxido de hidrógeno produjo un incremento en la migración del ADN equivalente al doble del valor obtenido en el grupo control. Aunque no se pudo contar un número suficiente de células, resultó evidente que sufren daño. Cabe aclarar que el tamaño del núcleo de los hepatocitos es mayor que el de otras células como linfocitos y en parte por esta razón el valor de migración del grupo control salió más alto que el de otros experimentos. La diferencia entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa con una  $p < 0.001$ , prueba t de student. En la distribución de frecuencias de los hepatocitos tratados con  $H_2O_2$ , resultó claro que el grupo tratado, en comparación con el control, presentó un mayor porcentaje de su población celular en valores de migración más altos entre  $18$  y  $25 \mu m$ .

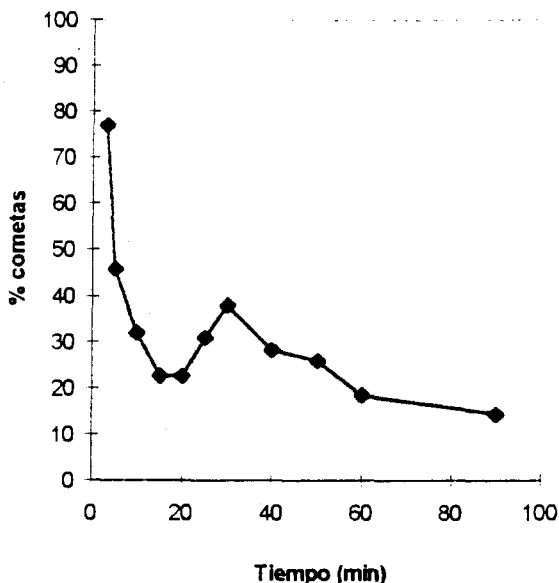
Los siguientes experimentos se diseñaron para determinar la producción de daño por radiación *in vivo* en leucocitos a diferentes tiempos y a la vez ensayar la toma de varias muestras de sangre periférica de un mismo ratón. Dada la cantidad de células que se deben analizar por muestra (mínimo 30) y lo tardado de tomar fotomicrografías de cada una de ellas, se tomó la decisión de analizar el daño en función de la proporción de células dañadas (con cola) en los siguientes experimentos. Además, se consideró que la longitud de la cola de los cometas no es un parámetro realmente confiable que refleje el total del daño inducido, ya que una ruptura puede producir un fragmento chico o uno grande y la longitud de migración será distinta en estos casos, aunque la cantidad de daño sea la misma. Otros autores han apoyado la determinación del daño en función de la fracción de núcleos con cola (11).

En los primeros ensayos, las muestras se tomaron 5 min. antes de la irradiación para los grupo control, 5, 30 y 60 min. después de la irradiación con  $1.0$  Gy para los grupos tratados. Se observó una reducción gradual en el % de cometas pero se consideró insuficiente el número de muestras, por lo tanto se procedió a realizar otro ensayo incluyendo además muestras de 15 y 90 min. para analizar con más detalle el daño en función del tiempo. Resultó evidente que es durante los primeros tiempos cuando se reduce notablemente el daño inicial. Se detectó un incremento hacia el tiempo 30 min. que vuelve a reducirse posteriormente.

Ya con la experiencia de los experimentos anteriores, se determinó la cinética de reparación *in vivo* del daño inducido en leucocitos de sangre periférica de ratones expuestos a  $1.0$  Gy de radiación gamma, incluyendo una muestra a los 3 min., 5 min. y otras cada 5 o 10 min hasta 90 min. Los promedios calculados en un total de 5 animales, indicaron que el porcentaje de cometas obtenido a los 3 min. postradiación fue de 80%, es obvio que durante este tiempo parte del daño pudo haber sido reparado antes de tomar la muestra, ya que este porcentaje se redujo al 45% 2 minutos más tarde y continuó disminuyendo hasta el 22% a los 15 min. Este hecho evidenció la presencia de un mecanismo de reparación rápida. Entre los 25 y 40 min. se detectó un ligero pero consistente incremento en la proporción de

células dañadas, seguido por un período de reducción de dicho daño. Este segundo incremento puede deberse a la presencia de cierto tipo de lesiones que se convierten en rupturas durante el proceso de reparación. A los 90 min. todavía persiste el daño en algunas células, lo cual podría deberse a la presencia de una población celular con mayor radiosensibilidad.

**Porcentaje de cometas por radiación en leucocitos de ratón a diferentes tiempos de la exposición.**



A pesar de que se detectó una alta variabilidad con respecto a la longitud de los cometas, es notorio que durante el segundo incremento de células dañadas al tiempo 30 min., la proporción de cometas con colas cortas se reduce y la de colas largas aumentan. Este hecho apoya la producción de rupturas durante la reparación de otras lesiones o la presencia de células apoptóticas que presentan colas largas según se ha reportado (10).

**Conclusiones.** En la primera etapa del trabajo se estandarizaron las condiciones que brindaron los mejores resultados para el diseño de los siguientes experimentos, inicialmente enfocados hacia la detección y cuantificación del daño inducido por  $H_2O_2$  y radiación gamma en diferentes células. La realización de experimentos preliminares nos permitió obtener experiencia en la utilización de la técnica EUG, la cual resultó sensible para detectar daño inducido tanto por radiación como por  $H_2O_2$  en células de humano y de ratón como leucocitos, linfocitos y hepatocitos.

No fue posible establecer semejanzas y diferencias con respecto a resultados reportados por otros investigadores que trabajaron bajo condiciones similares de

irradiación con linfocitos humanos (9) debido principalmente a que en dichos trabajos se reportan valores de migración más altos para las células control, en algunos casos 2 o 3 veces más de lo que se detectó en los experimentos descritos en este trabajo.

Se observó que los leucocitos de ratón eliminan rápidamente las rupturas causadas por la radiación gamma y que más tardíamente otras lesiones son reparadas.

Dada la sensibilidad del método, la ventaja de poder medir el daño en células individuales y la relativa facilidad para la obtención de resultados, este sistema parece ser adecuado para estudiar la capacidad de reparación *in vivo* el daño inducido por radiación ionizante en las células sanguíneas. Los siguientes experimentos se enfocarán hacia el estudio de la respuesta adaptativa en leucocitos de ratón irradiados *in vivo*, utilizando diferentes dosis de adaptación y de reto.

### **Bibliografía.**

1. Searle A., Beechey C., Evans E., Ford C. y Papworth D. (1971) *Mutat. Res.* 12 :411-416.
2. Perry P. y Evans H. (1975) *Nature* 258 : 121-125.
3. Morales-Ramírez P., Vallarino-Kelly T., Mercader-Martínez, J. Y Rodríguez-Reyes, R. (1994) *Mutat. Res.* 341 : 47-55
4. Tice R., Andrews P. y Singh N. (1990) *DNA damage and repair in human tissues.* Sutherland & Woodhead, Plenum Press, New York, EUA.
5. Fairbairn D., Olive P. y Neill K. (1995) *Mutat. Res.* 339 : 37-59.
6. Singh N., McCoy M., Tice R. y Schneider E. (1988) *Exp. Cell Res.* 175 : 184- 191.
7. Singh N., Danner D., Tice R. y Brandt L. (1990) *Mutat. Res.* 237 : 123-130.
8. Singh N., Tice R., Stephen R. y Schneider E. (1991b) *Mutat. Res.* 252 : 289-296.
9. Vijayalaxmi, Strauss G. y Tice R. (1993) *Mutat. Res.* 292 : 123-128.
10. Olive P., Frazer G. and Banath J. (1993) *Radiat. Res.*, 136 : 130-136.
11. Malcolmson G., Davies J., and Hanson K. (1995). *Europ. J. Cancer* 31A (13/14) : 2320-2323.

### **Agradecimientos.**

Agradecemos la excelente asistencia técnica de Felipe Beltrán Bibiana, Perfecto Aguilar Vargas, Angel Reyes Pozos y Miguel Angel García Torres del laboratorio de Radiobiología Celular. El apoyo brindado por la becaria Patricia Cano Sánchez fue muy importante para la realización de este trabajo, por lo cual le manifestamos nuestro reconocimiento. Gracias a la excelente colaboración del Dr. Víctor Tovar Muñoz y los técnicos Francisco Vergara Martínez y Francisco Martínez Reza del laboratorio secundario de calibración dosimétrica del Dpto. de Metrología, fue posible la exposición de las muestras u organismos a las fuentes de radiación gamma.