

DYNAMICS OF DNA DAMAGE IN LEUKOCYTES OF THOROUGHbred EQUINES SUBJECTED TO A STANDARDIZED EXERCISE TEST

DINÁMICA DEL DAÑO EN EL ADN EN LEUCOCITOS DE EQUINOS SANGRE PURA DE CARRERA SOMETIDOS A UN TEST DE EJERCICIO ESTANDARIZADO

Muriel M.¹, Seoane A.², Savignone C.³, Palacios A.³, Ferreira V.¹, Boffi F.M.⁴, Picco S.J.^{2*}

¹Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales, Hospital Escuela, FCV UNLP. Centro de Fisiología y Fisiopatología del Equino Deportivo, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata/CONICET, Argentina.

³Cátedra de Bioquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

⁴Profesional independiente.

*Corresponding author: spicco@fcv.unlp.edu.ar

ABSTRACT

It is well established that during exercising, an increase in the production of free radicals occurs, which can break the oxide-reducing balance of the cell causing DNA damage. The aim of this study was to establish the existence of DNA damage in circulating leukocytes of horses undergoing sub-maximal exercise by using the comet assay. Five horses subjected to a standardized exercise test were used. Samples were extracted before starting the exercise and, then, at 8.5 m/s, at 15 m/s, and 1 and 30 min post-exercise. Simultaneously, oxygen consumption during the exercise test was measured. The frequency of cells with DNA damage was 0.448, 0.537, 0.617, 0.556 and 0.592 respectively, being significant the differences from the baseline values over time ($p < 0.05$). Then, the cells were classified by levels of damage, with significant increases ($p < 0.05$), especially at 15 m/s and 30 min after exercise. A significant association between the frequency of cells with DNA damage and oxygen consumption during standardized exercise test is observed. These results suggest that genotoxic damage inducing factors occur mainly during physical exertion.

Key words: equine thoroughbred, exercise, DNA damage.

RESUMEN

Está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres que pueden romper el equilibrio óxido-reductor y causar daño en el ADN. El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a ejercicio sub-máximo mediante el empleo del ensayo cometa. Se usaron cinco equinos sometidos a un test estandarizado de ejercicio, a los que se les extrajeron muestras antes de comenzar el ejercicio, a los 8,5 m/s, a los 15 m/s, y 1 y 30 min post-ejercicio. Simultáneamente se realizó una ergoespirometría continua para determinar el consumo de oxígeno durante el test de ejercicio. La frecuencia de células con daño en el ADN fue 0,448, 0,537, 0,617, 0,556 y 0,592 respectivamente, observándose diferencias significativas con respecto a los valores del tiempo basal ($p < 0,05$). Luego las células se clasificaron por niveles de daño, observándose incrementos significativos ($p < 0,05$) especialmente a los 15 m/s y 30 min post-ejercicio. Se observó una asociación significativa entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el test estandarizado de ejercicio. Estos resultados sugieren que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico.

Palabras clave: equinos Sangre Pura de Carrera, ejercicio, daño en el ADN.

Fecha de recepción: 24/12/2015
Fecha de aceptación de versión final: 21/03/2016

INTRODUCCIÓN

Si bien las primeras evidencias que relacionan al ejercicio con el daño oxidativo datan del año 1978; es en las últimas tres décadas que se han acumulado abundantes conocimientos que vinculan estos dos hechos. En la actualidad, está claramente establecido que durante el ejercicio se produce un aumento en la producción de radicales libres (RL) del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *Reactive Nitrogen Species*) y que dicho aumento tiene su base en el incremento de ROS y RNS producidos especialmente en el propio músculo en ejercicio (Powers y Jacson, 2008). La producción de RL puede alcanzar niveles alarmantes durante el ejercicio extremo, rompiendo el equilibrio oxidante/antioxidante y causando daño en moléculas orgánicas tales como componentes de membrana, proteínas, ADN, etc. En años recientes numerosos trabajos han reportado la aparición de daño en el ADN asociado a estrés oxidativo y ejercicio en diferentes modelos y tipos de animales (Wierzba *et al.*, 2006; Gandhi y Gunjan, 2009).

La versión alcalina de la electroforesis en gel de células aisladas, más conocida como “*Ensayo Cometa*”, es un método sensible, confiable y rápido para detectar rupturas de simple y doble cadena en la molécula de ADN así como sitios lábiles al álcali. Con esta técnica, la cantidad de daño en el ADN está dada por la cantidad de ADN que migra en el campo electroforético, en forma proporcional a la cantidad de daño presente (Picco *et al.*, 2001).

El objetivo del presente trabajo fue establecer la existencia de daño en el ADN en leucocitos circulantes de equinos sometidos a un test de ejercicio sub-máximo mediante la utilización de la electroforesis en gel de células aisladas (“*Ensayo Cometa*”).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron cinco equinos Sangre Pura de Carrera (SPC) con un peso promedio de 440 kg, habituados a realizar entrenamiento en forma continua en cinta ergométrica.

Protocolo de ejercicio

Los animales fueron sometidos a un test de ejercicio estandarizado sobre una cinta ergométrica marca Kagra modelo 2200. El test constó de las siguientes etapas: 1 min a

1,7 m/s, 4 min a 4 m/s, 1 min a 6,5 m/s, 1 min a 8,5 m/s, 1 min a 10,5 m/s, 1 min a 12,5 m/s, 2 min a 15 m/s, 4 min a 4 m/s, y 1 min a 1,7 m/s, respectivamente. Todo el test se desarrolló con una inclinación del 3%.

Toma de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción de la vena yugular derecha. Para ello se utilizaron Abbocat N° 14 y una guía de 1,20 m de longitud recubierta con papel de aluminio para evitar el contacto de la sangre con la luz. Dichos elementos permanecieron colocados y permeables durante todo el test de ejercicio. Las muestras se tomaron con el animal en reposo previo al ejercicio (T0), durante el test de ejercicio a los 8,5 m/s (T1) y 15 m/s (T2), y a 1 minuto (T3) y 30 (T4) minutos pos ejercicio. En cada toma de muestras se extrajeron 2,5 ml de sangre que fueron almacenadas en tubos éppendorf heparinizados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el posterior análisis.

Ensayo Cometa (versión alcalina)

Para la realización del ensayo cometa las muestras fueron almacenadas en ambiente oscuro y a 4° C por no más de 30 minutos. El ensayo se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con pequeñas modificaciones. Se mezclaron 15 ml de sangre con 75 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5 % (Gibco BRL, NY, USA). Dicha mezcla se colocó sobre un portaobjetos cubierto previamente con agarosa de punto de fusión normal al 0,5 % (Promega, USA) previamente solidificada. Se prepararon dos portaobjetos por animal. Luego de esto, las células fueron lisadas en una solución detergente (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 1 % Triton X-100 y 10 % DMSO) por al menos una hora antes de la electroforesis. Para la electroforesis los portaobjetos fueron colocados en cubeta horizontal y cubiertos con una solución alcalina de electroforesis (1mM EDTA, 300mM NaOH, pH > 13) durante 20 minutos. La electroforesis se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la electroforesis los portaobjetos fueron enjuagados 3 veces con una solución *buffer* de Tris (pH 7,5) durante 5 minutos y finalmente con agua destilada. Una vez secos, los portaobjetos fueron teñidos con una solución de SYBR Green I 1/1000 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (Ward y Marples, 2000). El análisis se realizó utilizando un microscopio Olympus BX 40 provisto de una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W USHIO USH 102 D. El registro de las imágenes se realizó con una cámara Sony

CCD y las imágenes se grabaron utilizando el software Image Pro Plus^á. Se analizaron un total de 200 células por punto experimental. Los leucocitos fueron clasificados primariamente en normales (núcleos sin migración del ADN) y anormales (núcleos con migración del ADN). Posteriormente se realizó la clasificación por niveles de daño tomando como criterio a Kobayashi *et al.* (1995), donde 1 significó ausencia de migración visible del ADN y 5 represento el máximo nivel de migración de daño en el ADN.

Ergoespirometría

Los registros ergoespirométricos fueron obtenidos a través del sistema Cortex Biofísic MetaVet. El equipo se calibra con cada caballo en particular en función de las condiciones atmosféricas (temperatura ambiental, presión atmosférica, humedad relativa ambiente, presión de oxígeno ambiental y presión de dióxido de carbono ambiental) donde se va a realizar el test de ejercicio. Una vez calibrado el equipo, se le coloca al equino la máscara provista de sensor de flujo/volumen, y luego se lo sube a la cinta ergométrica para dar inicio al ejercicio. Este equipo permite medir el consumo de oxígeno (VO₂) en ambas condiciones “*Body temperature pressure saturated*” (BTPS) donde el análisis se realiza en presencia de vapor de agua ó en “*Standar temperature pressure and dry*” (STPD) esto corresponde a una situación de 0° C de temperatura, presión de 760 mmHg al nivel del mar en condiciones de ausencia de vapor de agua (seco). La información fue procesada con el Programa MetaSoft Vet Metabolic Stress®.

Análisis de los datos

Las frecuencias de células normales y anormales en cada tiempo de muestreo fueron comparadas utilizando el test de Chi cuadrado con corrección de Yates. Los diferentes niveles de daño fueron comparados utilizando el test *t* de Student's (SPSS® Versión 11). Los resultados se expresaron como la media ± DS. La asociación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno se estimó mediante el coeficiente de correlación y valor de R ajustado.

RESULTADOS

La frecuencia de células consideradas anormales fue de 0,448; 0,537; 0,617; 0,556 y 0,592 para el T0, T1, T2, T3 y T4,

respectivamente. Una vez iniciado el ejercicio los niveles de células con daño en el ADN con respecto al T0 aumentaron significativamente en todos los tiempos estudiados (Tabla 1). También fueron significativos los incrementos observados entre T1 y T2 ($X^2= 12,79$; $p<0,005$), entre T1 y T4 ($X^2= 5,93$; $p<0,05$) y la reducción observada entre T2 y T3 ($X^2= 7,42$; $p<0,05$).

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos con el ensayo cometa. El nivel de células sin migración aparente del ADN (Grado 1) fue significativamente menor con respecto al control cuando los animales alcanzaron los 15 m/s ($p=0,0035$) y los 30 minutos pos ejercicio ($p=0,0175$). El nivel de células con daño leve (Grado 2) se incrementó paulatinamente hasta alcanzar los caballos los 15 m/s (T2), momento en el cual el incremento con respecto al T0 fue significativo ($p=0,00609$). Un segundo incremento significativo de células Grado 2 se observó 30 minutos pos ejercicio (T4) ($p=0,025$). También se observó un incremento significativo entre T3 y T4 ($p=0,0466$) y una reducción significativa entre T2 y T3 ($p=0,014$). Las células con daño moderado (Grado 3) alcanzaron sus máximos valores al término del ejercicio pero estos valores no se diferenciaron significativamente de los obtenidos para el control ni para los otros tiempos. Algo similar ocurrió con las células con daño intenso (Grado 4), que alcanzaron sus máximos valores 1 minuto pos ejercicio (T3), aunque dicho valor no fue significativamente diferente. El porcentaje de células con máximo nivel de daño (Grado 5) creció constantemente desde que los equinos iniciaron el ejercicio, alcanzando los máximos valores a los 15 m/s ($p=0,0267$) y 1 minuto pos ejercicio ($p=0,00025$). También se observaron diferencias por incrementos entre los valores obtenidos entre T1 y T2 ($p=0,0457$) y entre T1 y T3 ($p=0,0006$) y por reducción de los valores entre T3 y T4 ($p=0,0017$).

El consumo de O₂ experimentó un crecimiento sostenido desde el reposo hasta que los animales alcanzaron la velocidad de 15 m/s, momento en el cual el consumo de O₂ fue unas 10 veces superior a los iniciales. Luego de esto, se produjo un marcado descenso, alcanzando valores similares al basal luego del ejercicio (Tabla 3). La Figura 1 muestra el comportamiento del consumo de oxígeno durante el test de ejercicio y el porcentaje de células con daño en el ADN. La asociación entre la frecuencia de células con daño en el ADN y el consumo de oxígeno durante el set de ejercicio fue de 0,88 ($R^2=0,77$), mientras que cuando se agregó la determinación 30 minutos pos ejercicio la correlación se redujo a 0,58 ($R^2=0,342$).

Tabla 1. Comparación de las células anormales (con daño en el ADN) observadas en T₀ y en los tiempos T₁, T₂, T₃ y T₄ mediante la prueba de Chi cuadrado

Grupo Comparado	Valor de <i>Chi cuadrado</i>	Valor de <i>p</i>
T1 (8,5 m/s)	15,49	< 0,001
T2 (15 m/s)	56,69	< 0,001
T3 (1 min post ejercicio)	23,33	< 0,001
T4 (30 min post ejercicio)	40,96	< 0,001

Tabla 2. Clasificación de las células en niveles de daño en el ADN (ensayo cometa), según Kobayashi *et al.* (1995). Valores medios expresados en porcentaje (\pm DS).

Tratamiento	Grados de daño en el ADN (%)				
	1	2	3	4	5
Reposo	55,19	38,59	4,68	0,95	0,68
(T ₀)	(\pm 16,06)	(\pm 16,69)	(\pm 6,61)	(\pm 0,96)	(\pm 1,18)
8,5 m/s	46,25	45,05	5,65	2,35	0,85
(T ₁)	(\pm 22,97)	(\pm 20,59)	(\pm 5,24)	(\pm 3,23)	(\pm 1,2)
15 m/s	38,25	53,62	4,83	1,42	2,46
(T ₂)	(\pm 10,85)	(\pm 9,56)	(\pm 3,29)	(\pm 1,92)	(\pm 2,64)
Pos 1	44,84	41,06	7,37	3,62	3,50
(T ₃)	(\pm 17,20)	(\pm 14,07)	(\pm 8,83)	(\pm 5,5)	(\pm 1,69)
Pos 2	40,83	51,61	5,28	1,11	1,17
(T ₄)	(\pm 10,92)	(\pm 10,08)	(\pm 4,24)	(\pm 1,61)	(\pm 1,06)

Tabla 3. Valor medio de consumo de O₂ (\pm DS) en los equinos SPC sometidos al test de ejercicio.

Tratamiento	Consumo de O ₂ (l/min)
Reposo (T0)	9,40 (\pm 10,9) ^a
8,5 m/s (T1)	38,60 (\pm 44,9) ^b
15 m/s (T2)	82,60 (\pm 96,1) ^c
Post 1 (T3)	24,00 (\pm 27,9) ^d
Post 2 (T4)	11,20 (\pm 10,4) ^a

Letras diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

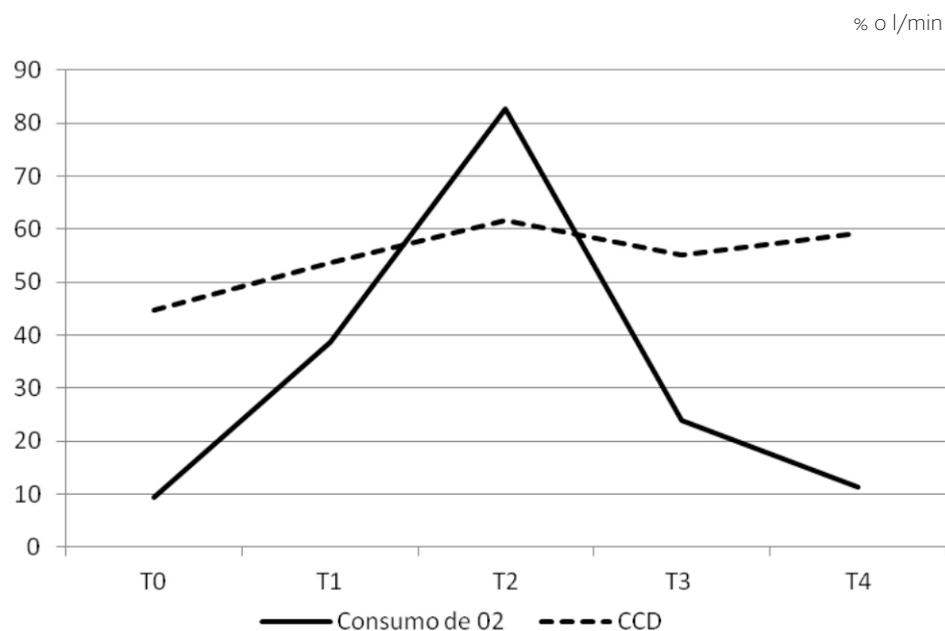


Figura 1. Valor medio de consumo de O₂ (l/min) y porcentaje de células con daño (CCD) en el ADN durante las cinco etapas del test de ejercicio.

T0: reposo, T1: 8,5 m/s, T2: 15 m/s, T3: 1 min post-ejercicio, T4: 30 min post-ejercicio.

DISCUSIÓN

La producción de daño en el ADN asociado a ejercicio no es en sí un hecho inédito. Existen numerosas publicaciones previas en las cuales animales o humanos sometidos a diferentes niveles de ejercicio expresaron daño en el ADN, muchos de ellos incluso, utilizando la misma metodología que la empleada en el presente trabajo (ensayo cometa). Sin embargo, el denominador común de estos trabajos fue la estimación del daño posterior al ejercicio y no durante el ejercicio (Hartmann *et al.*, 1995; Niess *et al.*, 1996; 1998). Con la excepción de los resultados obtenidos por Mastaloudis *et al.* (2004) quienes trabajando en humanos sometidos a ejercicio de resistencia registraron un incremento de los niveles de daño en el ADN a mitad del test (carrera de 50 km), y su posterior retorno a niveles basales 2 hs pos ejercicio, este es el primer trabajo que presenta una cinética de daño en el ADN producto de un modelo particular de ejercicio estandarizado sub-máximo.

Los resultados obtenidos permiten observar que el ejercicio, bajo las condiciones planteadas en el presente ensayo, produce un incremento en el nivel de daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica, alcanzando su máxima expresión al momento de llegar los equinos a la máxima velocidad (15 m/s) y luego, al finalizar la prueba, 30 minutos pos ejercicio.

El hecho de que en el momento en que se produce el ejercicio se haya observado la mayor frecuencia de células con migración del ADN demuestra que los factores inductores de daño genotóxico se producen mayoritariamente durante el esfuerzo físico. Dado que al momento de terminar el ejercicio los valores de daño son significativamente menores a los observados a 15 m/s, puede sugerirse que en ese lapso hay una intensa reparación del daño que tiene como consecuencia una marcada reducción del daño en el material genético. Estudios realizados en 1984 por Van Zeeland en células de mamíferos demostraron que, tras inducir daño con rayos *x* e *g*, la eficacia de la reparación permite a las células recomponer el 80 % de las lesiones en la molécula de ADN entre 5 y 10 minutos post exposición, mientras que el 20 % restante se repara pocas horas después. Estos hallazgos son concordantes con lo observado en el presente trabajo ya que entre la aparición del máximo nivel de daño y la reducción significativa del mismo transcurrieron 6

minutos. Si este razonamiento es correcto, debemos asumir entonces que una segunda fuente de daño genotóxico genera el posterior aumento significativo del daño en el ADN observado 30 minutos pos ejercicio.

Los mecanismos propuestos para explicar la aparición de daño en el ADN tras el ejercicio extremo incluyen la producción de ROS a partir de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, el proceso de isquemia-reperfusión, reacciones catalizadas por la Xantina Oxidasa, mecanismos inflamatorios y producción de catecolaminas (Hartmann y Niess, 1999). La cadena transportadora de electrones mitocondrial es posiblemente la principal responsable del pico de daño observado durante el ejercicio máximo. Esto se debe a que durante el mismo, el consumo de oxígeno (O_2) se incrementa más de 10 veces, pero a nivel de la fibra muscular lo hace unas 100 veces, con el consiguiente aumento proporcional de la actividad de la cadena respiratoria y de la producción de anión superóxido (O_2^-) (Gandhi y Gunjan, 2009), el cual tiene amplia capacidad de difusión a través de las membranas plasmáticas (Picco, 2004).

Tras el ejercicio, la producción de O_2^- por acción de la cadena respiratoria disminuye pero se activan otros mecanismos capaces de generar estrés oxidativo, como la isquemia-reperfusión, la cual es proporcional al esfuerzo realizado y que culmina con la reoxigenación de las áreas isquémicas y la consiguiente producción de ROS (Adams y Best, 2002). En tal sentido, los resultados obtenidos al comparar el consumo de O_2 con la frecuencia de células con daño parecen abonar la teoría de la generación de daño a partir de diferentes estímulos según sea ejercicio extremo o pos ejercicio ya que el pico de daño 30 minutos pos ejercicio se produce en presencia de bajos valores de consumo de O_2 . Es probable que tras el ejercicio adquieran más relevancia factores tales como mediadores inflamatorios, liberación de RL por leucocitos y el fenómeno de isquemia-reperfusión. Este último probablemente también genere daño en el ADN por la vía de la producción de ROS, aunque el origen de estos últimos sea diferente. Es por ello que futuros estudios serán necesarios para dilucidar la responsabilidad de cada uno de los factores generadores de daño durante el ejercicio en equinos SPC bajo modelos de ejercicio como el planteado en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams A.K., Best T.M. (2002) The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *Phys Sportsmed* 30: 37-44.
- Gandhi G., Gunjan C. (2009) Exercise-Induced Genetic Damage: A Review. *Int. J. Hum. Genet.* 9 (2): 69-96.
- Hartmann A., Niess A.M., Grunert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1995) Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat. Res.* 346 (4): 195-202.
- Hartmann A., Niess A.M. (1999) Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen C.K., Packer L., Hänninen O. (Eds.) *Exercise and Oxygen Toxicity: A Handbook*. Elsevier Science: B.V. North Holland/New York, pp.195-217.
- Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Hayashi M., Sofuni T. (1995) A comparison between manual microscopic analysis and computerised image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.* 3: 103-115.
- Mastaloudis A., Yu T.W., O'Donnell R.P., Frei B., Dashwood R.H., Traber M.G. (2004) Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 966-975.
- Niess A.M., Baumann M., Roecker K., Hartmann T., Mayer F., Dickhuth H.H. (1998) Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 38: 111-115.
- Niess A.M., Hartmann A., Gurnert-Fuchs M., Poch B., Speit G. (1996) DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.* 17: 397-403.
- Picco S.J., De Luca J.C., Mattioli G.A., Dulout F.N. (2001) DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the Comet assay. *Mutat. Res.* 498: 1-6.
- Picco S.J. (2004) Consecuencias genotóxicas y clastogénicas de la hipocuprosis bovina. Tesis Doctoral, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Powers S.K., Jackson M.J. (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* 88 (4): 1243-1276.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- Van Zeeland A.A. (1984) DNA repair. In: Obe G. (Ed.) *Mutations in man*. Springer, Berlin, pp. 35-57.
- Ward T.H., Marples B. (2000) Technical report SYBR Green I and the improved sensitivity of the single-cell electrophoresis assay. *Int. J. Radiat.* 76: 61-65.
- Wierzba T.H., Olek R.A., Fedeli D., Falcioni G. (2006) Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (Suppl 10): 115-31.