

**ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA ALCALINO EN CÉLULAS DE
SANGRE PERIFÉRICA**

ANGELA PATRICIA VERGARA GARCÍA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de

BIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIA

BIOLOGÍA

BOGOTÁ

DICIEMBRE 2010

**ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA ALCALINO EN CÉLULAS DE
SANGRE PERIFÉRICA**

ANGELA PATRICIA VERGARA GARCÍA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de

BIOLOGA

MARTA LUCIA BUENO ANGULO

Directora

OLGA MARÍA MORENO NIÑO

Jurado

**ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DEL COMETA ALCALINO EN CÉLULAS DE
SANGRE PERIFÉRICA**

ANGELA PATRICIA VERGARA GARCÍA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de

BIOLOGA

INGRID SCHULER GARCÍA

Decana Académica

ANDREA FORERO RUIZ

Directora de Carrera

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la Verdad y la Justicia”

A Dios

A mis padres. A mi madre por su disimulada exigencia y a mi padre por la fortaleza y el equilibrio. A ambos porque simplemente los amo.

A Titi y a Tita, por el cariño infinito y por consentirme tanto.

A mis amigas, a las que me enseñaron que la amistad no culmina cuando acaba un ciclo, a las que aprendí a querer por la diaria convivencia y a las biólogas con las que espero tener el honor de graduarme.

A Caro, porque más que una amiga eres una hermana. No compartimos el 50 por ciento de genes, pero sí el 100 por ciento de cariño.

AGRADECIMIENTOS

En esta página, y de manera paradójicamente corta quiero dejar constancia de lo que debo a todas aquellas personas que contribuyeron para que este trabajo fuese un hecho. A las que lo hicieron de forma consciente, y a las que lo hicieron de forma natural y espontánea. Me gustaría empezar agradeciendo a mi directora, Marta Lucia Bueno Angulo, porque aún cuando nunca vio mi proceso de pregrado y nunca antes había sido mi maestra, me abrió las puertas del laboratorio de citogenética, para investigar y aprender.

A la profesora Olga Moreno, por ser jurado de este trabajo de grado y resolver amablemente mis inquietudes.

A Carolina Arango, por toda la paciencia que mantuvo ante mis múltiples preguntas, por guiarme y enseñarme muchas cosas, incluso sin darse cuenta.

A Laura Rengifo por su apoyo constante, académica y emocionalmente, por las sugerencias y el aporte de ideas.

A Lisset Pabon por la amistad y la ayuda totalmente desinteresada que le brindo a toda la realización de este trabajo. Gracias por qué me dejaste aprender mucho más de lo que esperaba en un semestre.

A Sara Bermúdez por resolver mis dudas del proceso práctico del Ensayo.

A Ricardo Martínez por aclarar mis incertidumbres con respecto a la parte estadística del trabajo.

Y a todas las personas del instituto de genética de la Universidad Nacional que colaboraron incluso hasta en el mínimo detalle.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
2.1. Problema científico	11
2.2. Justificación	12
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
4. MARCO TEÓRICO	14
4.1. Marco conceptual	14
4.1.1. Generalidades	14
4.1.2. Método	15
4.1.2.1. Método Convencional	15
4.1.2.2. Modificaciones al método convencional	19
4.1.3. Ventajas del Ensayo Cometa	20
4.1.4. Desventajas del Ensayo Cometa	21
4.1.5. Aplicaciones	21
4.2 Antecedentes	22
5. OBJETIVOS	25
5.1. General	25
5.2. Específicos	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Tipo de estudio y diseño	26
6.2. Sujetos y toma de muestra	26
6.3. Preparación de las soluciones de trabajo	26
6.4. Fase de estandarización	27
6.5. Fase de verificación	28
6.6. Análisis de imágenes	30
6.6.1. Análisis cualitativo	31
6.6.2. Análisis cuantitativo	31
6.7. Tratamiento estadístico	31

7. RESULTADOS	32
7.1. Fase de estandarización	32
7.2. Fase de verificación	35
7.3. Protocolo final	38
8. DISCUSIÓN	39
8.1. Fase de estandarización	39
8.2. Fase de verificación	41
8.3. Protocolo final	47
9. CONCLUSIONES	48
10. RECOMENDACIONES	49
11. BIBLIOGRAFÍA CITADA	50
12. ANEXOS	55

RESUMEN

La electroforesis de células individuales o el ensayo cometa es una prueba de alta sensibilidad que cuantifica el daño ocasionado por un agente en el ADN, mediante el número de rupturas o fragmentos que posterior a un corrido electroforético toman la apariencia de la cola de un cometa.

En este estudio se estandarizó la técnica del ensayo cometa en su versión alcalina en células de sangre periférica, como herramienta para evaluar en posteriores trabajos la genotoxicidad causada por diferentes agentes químicos o físicos. Esto se llevó a cabo mediante dos fases claramente marcadas. La fase de estandarización, en la que se evaluó el tiempo óptimo de cada una de las etapas del ensayo, los procesos para la obtención ideal de resultados y la composición adecuada de cada buffer o sustancia empleada; y la fase de verificación, en la que se examinó el daño causado por tres agentes genotóxicos ampliamente estudiados como la Mitomicina (agente alquilante), el Peróxido de hidrogeno (agente oxidante) y los Rayos X (clastógeno físico).

En el proceso de estandarización, se obtuvo resultados óptimos al realizar periodos de lisis prolongados, rangos de denaturación y electroforesis cortos, seguidos de tres lavados a pH neutro, antes de la tinción. En el proceso de verificación se observó en todos los casos un comportamiento de dosis- respuesta.

Se corroboró satisfactoriamente la estandarización lograda, al contrastar los resultados obtenidos en el proceso de verificación con las publicaciones existentes para cada uno de los tres agentes evaluados.

1. INTRODUCCIÓN

La genotoxicidad o genética toxicológica es la ciencia que se encarga del estudio del daño causado en el material hereditario por efecto de un determinado agente físico o químico (Mudry y Carballo 2006). Las investigaciones que están en estrecha cercanía con el tema de la genotoxicidad adquieren día a día más importancia, debido al incremento constante de deterioro del medio ambiente al que se encuentra expuesto el hombre por la presencia de agentes mutagénicos (Arencibia y Rosario 2009).

El ensayo cometa es un test de genotoxicidad sencillo, de bajo costo, con un protocolo rápido y altamente sensible a bajos niveles de daño (Di Giorgio *et al.* 2001). El uso de esta técnica ha proporcionado ventajas sobre el manejo de otras de la citogenética clásica, con lo cual ha sido ampliamente trabajada en estudios de ecotoxicología y aplicaciones clínicas (Prieto y Llopiz 1999, Machado *et al.* 2009). En Colombia, este ensayo no está muy desarrollado y es importante su empleo en distintas disciplinas de la ciencia a nivel nacional. Es por ello que en este trabajo se llevó a cabo la estandarización de la técnica como herramienta que permita evaluar en posteriores estudios el potencial genotóxico de agentes químicos y físicos de exposición cotidiana laboral y ambiental en nuestro país.

En el desarrollo de este trabajo se realizó a partir de la sangre periférica de 20 donantes sanos, un estudio descriptivo – experimental, con una fase de estandarización de la técnica del ensayo cometa y una fase de verificación por medio de agentes genotóxicos ampliamente estudiados, como la Mitomicina (agente alquilante), el Peróxido de hidrogeno (agente oxidante) y los rayos X (clastógeno físico).

Con la estandarización obtenida en cada una de las etapas del ensayo, el análisis y la información adicional consignada en este estudio, no solo se brinda un punto de referencia para el adelanto de la técnica en otros laboratorios, sino que además se proporciona información relevante para la obtención de diversos estudios en los que se evalúe el daño genético ocasionado por distintos agentes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Problema científico

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula es una herramienta útil en la detección de daño y reparación del ADN en distintas poblaciones celulares (Di Giorgio *et al.* 2001). Por la flexibilidad de su protocolo es posible la evaluación de agentes que producen una gran variabilidad de alteraciones en el material genético, dentro de los que es importante mencionar: las rupturas de cadena doble y sencilla, los sitios sensibles al álcali, los enlaces entrecruzados entre las fibras de ADN o ADN – proteínas, bases oxidadas, dímeros inducidos por UV y la capacidad de reparación del material genético (Dusinská y Collins 1996, Mudry y Carballo 2006). Es una técnica rápida, sencilla, económica y altamente sensible a bajas concentraciones y poco tiempo de exposición a un determinado genotóxico (Prieto y Llópiz 1999, Hwang y Bowen 2007).

El desarrollo del ensayo con una muestra pequeña de células y la posibilidad de que sea empleado en tejidos celulares no proliferativos, son unas de las ventajas que lo constituyen en uno de los test más empleados actualmente en el área de la genética toxicológica, encontrándose incluso superior a técnicas de citogenética convencional como las aberraciones cromosómicas, el intercambio entre cromátides hermas y la prueba de micronúcleos (Prieto y Llópiz 1999, Tice *et al.* 2000, Di Giorgio *et al.* 2001). De igual manera las aplicaciones del ensayo abarcan una gran diversidad de disciplinas en las que se ven involucradas las ciencias de la salud y de la vida como la medicina, la microbiología, la biología, la nutrición y la ecología. La gran mayoría de las publicaciones son relacionadas con el efecto citotóxico, genotóxico o mutagénico de distintos agentes dependiendo de su interacción con el ADN, sin embargo, hay también un número respetable de artículos que tratan sobre casos clínicos y biomonitorización ocupacional y ambiental de poblaciones humanas y animales o vegetales (Machado *et al.* 2009).

Esta técnica recibe el nombre de ensayo cometa por la apariencia del ADN en cada célula, después de la exposición a un agente genotóxico. Los agentes genotóxicos ocasionan rupturas que originan la fragmentación del material genético, lo cual se aprecia como la cola de un cometa

posterior a una electroforesis. Así pues ante la acción de un genotóxico, se espera tener cabezas con información intacta y colas con material afectado, por el contrario en células sin daño se espera obtener solo cabezas o núcleos sin la existencia de colas. La cola del cometa se forma debido a que los fragmentos de ADN que en ella se encuentran son menos pesados que el resto de la cadena de ADN y por tanto su velocidad de migración hacia el polo positivo es mayor.

El ensayo cometa se desarrolla mediante una serie de pasos o etapas que corresponden a: (1) el preparado de láminas, en las que las células a evaluar son embebidas en agarosa y colocadas sobre portaobjetos; (2) la lisis celular por acción de altas concentraciones de sales y detergentes con los que se degradan las membranas, los residuos de RNA y otras proteínas; (3) la denaturación del ADN; (4) la electroforesis, que permite la migración del material genético dañado hacia el ánodo; (5) la neutralización, en la que se eliminan restos de sales presentes en los geles y se renaturalizan las cadenas de ADN en la cabeza del cometa; (6) la tinción y (7) el análisis (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009).

Ahora bien, el proceso de estandarización de la técnica se lleva a cabo de manera independiente en cada laboratorio, estando en la mayoría de ocasiones sujeto a modificaciones del protocolo original por las condiciones características de cada área de labor, así como de los reactivos y materiales que se dispone. El carácter individual de la estandarización permite al mismo tiempo autonomía a los distintos grupos de investigación, al momento de introducir variaciones en el manejo del tiempo y empleo de otras concentraciones en las soluciones de trabajo.

El Laboratorio de Citogenética del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, pretende introducir protocolos en el área de la genética toxicológica con el fin de adelantar estudios posteriores en distintas áreas de biomonitorización ambiental y de poblaciones humanas, dentro de las cuales ésta será una técnica requerida.

2.2. Justificación

La genotoxicidad vincula efectos directos e indirectos sobre el ADN, como por ejemplo la inducción de mutaciones que pueden desencadenar procesos de carcinogénesis. La alteración

genética ocasionada por un determinado producto juega un papel fundamental en las pruebas de toxicidad génica para identificación de cancerígenos potenciales (Sorsa 1998), por esto es importante realizar la estandarización del ensayo cometa, como herramienta para efectuar en nuestro país el control a nivel genético de las distintas sustancias de exposición laboral, los tratamientos de los casos clínicos con alta incidencia y el biomonitorio ambiental y poblacional.

Respondiendo a este propósito, y a la misión y visión del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, en los cuales se destaca el desarrollo de la investigación y el conocimiento científico orientados al interés de la sociedad y la comunidad académica, el Laboratorio de Citogenética requirió la implementación y estandarización de la técnica del ensayo cometa, ya que cabe destacar que a pesar de que el test es frecuentemente manejado a nivel internacional, en Colombia son pocos los grupos de trabajo en los cuales se encuentra ajustado y es empleado de forma activa en las investigaciones, de allí la pertinencia de realizar el estudio.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se desarrolla el proceso de estandarización del ensayo cometa en células de sangre periférica para la detección de daño en el ADN?

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Marco conceptual

4.1.1. Generalidades

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula es una herramienta sensible y confiable, con un método rápido y útil para la detección de daño y reparación del ADN en distintas poblaciones celulares (Di Giorgio *et al.* 2001, Hwang y Bowen 2007). Es una prueba sencilla y de bajo costo en la que las células de los tejidos blanco no tienen que estar en proliferación activa ni experimentar fase mitótica (Prieto y Llopiz 1999), permitiendo medir cualitativa y cuantitativamente el daño al ADN de células individuales de forma no invasiva (Bajpayee *et al.* 2005). Esta técnica es altamente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido, identificando posibles mutágenos y cancerígenos, entre otros aspectos, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Ritter y Knebel 2009); ha sido sugerida y aplicada en estudios de cáncer, evaluación de genotoxicidad ambiental y laboral, estudios de prevención de exposición a productos químicos y biomonitorización en general (Machado *et al.* 2009).

En el desarrollo de la técnica las células son embebidas en agarosa y colocadas sobre láminas portaobjetos para ser sometidas a una electroforesis de condición neutral o alcalina, que se ejecuta posterior a la lisis por acción de altas concentraciones de sales y detergentes (Mudry y Carballo 2006, Arencibia y Rosario 2009). Las células con mayor frecuencia de rupturas de cadena doble, rupturas de cadena simple y sitios álcali lábiles muestran una migración significativa del ADN hacia el ánodo (Fairbairn *et al.* 1995, Zúñiga 2009). El fundamento bioquímico básico de la técnica es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, con lo cual las células con daño se visualizan al microscopio con apariencia de cometas, donde la cabeza la constituye la región nuclear con material genético intacto y la cola la conforman los fragmentos de ADN en migración, de los que hacen parte roturas y puntos sensibles al álcali (Cossio *et al.* 2004, Liao *et al.* 2009). El largo o extensión de los cometas, es directamente proporcional al daño inducido sobre el material genético y es indicador de la sensibilidad de la prueba.

El resultado efectivo de la técnica, además de un número de pasos, está mediado por el control de otros factores como la constitución de la matriz de agarosa, el nivel de pH, la temperatura, el tiempo de lisis y electroforesis y el voltaje y amperaje con los que se lleva a cabo el ensayo (Tice *et al.* 2000, Arencibia y Rosario 2009, Liao *et al.* 2009). Así pues, la apariencia de los cometas difiere notablemente por los procesos de lisis y electroforesis empleados (Klaude *et al.* 1996).

4.1.2. Método

Existen muchas versiones del ensayo cometa que se aplican constantemente en diferentes laboratorios a nivel mundial; la metodología general y estándar fue descrita por Ostling y Johanson en 1984 y luego reformada por Singh *et al.* en 1988, sin embargo actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación (Fairbairn *et al.* 1995, Mudry y Carballo 2006).

4.1.2.1. Método convencional

La versión convencional del ensayo cometa incluye una serie de pasos de los que depende la reproducibilidad y sensibilidad de la prueba. Después de haber obtenido la suspensión de células, las etapas básicas del ensayo incluyen preparación de las láminas con las células embebidas en gel de agarosa, lisis celular para liberar el ADN, ADN desenrollado o relajado, electroforesis, neutralización de los álcali y tinción del ADN (Palchaudhuri y Hergenrother 2007, Liao *et al.* 2009). Todos los tampones utilizados en este ensayo no deben haber sido preparados con un tiempo superior a un mes para mejores resultados, de acuerdo con los criterios de control de calidad.

Preparados

En el preparado de las láminas los protocolos varían entre una y tres capas de agarosa. La preparación es esencial por dos objetivos principalmente, siendo el primero de ellos brindar un soporte adecuado a las células a analizar y el segundo lograr la mejor visualización posible sin ruido que imposibilite el posterior análisis (Zúñiga 2009). Cuando se emplea una única capa de

agarosa la suspensión celular mezclada con el gel se coloca directamente sobre una lámina portaobjetos limpia y desengrasada. El empleo de una sola capa es una posibilidad poco usada actualmente, puesto que su uso requiere de mucho cuidado en la manipulación y además es mayor el trabajo para la visualización de los cometas (Zúñiga 2009).

Lo más común es el uso de tres capas de agarosa a modo de sándwich. En este caso las células de interés son suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión, generalmente a 37°C, y colocadas entre una primera y tercera capa (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009). La primera es una capa de agarosa de punto de fusión normal que sirve de base a la capa celular, para conferirle mejor adherencia (Zúñiga 2009). La última o tercera capa de agarosa es igualmente de bajo punto de fusión y juega principalmente un papel protector (Zúñiga 2009). Algunos laboratorios han eliminado esta tercera capa y han dejado el protocolo con solo dos, puesto que se ha demostrado que no dificulta el proceso y permite mejores resultados ante otras modificaciones (Liao *et al.* 2009). Cada capa debe solidificarse antes de agregar una capa superior (Ritter y Knebel 2009).

En la capa celular, bien sea la segunda o primera, debe manejarse la concentración de agarosa y la dilución celular con mucho cuidado. Si la cantidad de células por unidad de área es grande, el análisis tiende a verse afectado, con mayor efecto en los estudios en los que el daño inducido es alto y por tanto mayor la migración esperada del ADN, pues en estos casos se visualizará un solapamiento de colas y es imposible la medición rigurosa del daño causado. Por su parte, la concentración de agarosa puede dificultar la migración del ADN. Normalmente se sugiere una mezcla de aproximadamente 10000 hasta 50000 células en 10 µl de suero fetal Bovino o medio de cultivo con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión, a una concentración final entre 0.5 y 1.5% (Tice y Vásquez 1999). Los microlitros de muestra y agarosa varían también de acuerdo a sí las células a analizar han pasado por un cultivo o se adicionan de manera directa sin antes ser estimuladas (Speit *et al.* 2003, Bajpayee *et al.* 2005, Speit y Schütz 2008).

Lisis

Después de solidificada la última capa de agarosa, las láminas son colocadas en solución de lisis alrededor de una hora, aunque el tiempo de la lisis puede variar según el experimento. La

solución stock comúnmente utilizada está conformada por NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM y Tris 10 Mm. El fundamento bioquímico del empleo de altas concentraciones de sales y detergentes en el proceso está dado por la degradación de las membranas celular y nuclear. Algunos tipos celulares requieren de otros detergentes para la lisis total de membranas (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009).

Las soluciones de lisis pueden ser neutras o alcalinas de acuerdo a los objetivos del estudio. Generalmente se usa la lisis neutra para la detección preferente de rupturas de cadena doble y lisis alcalina para evidenciar rupturas de cadena simple y formación de sitios álcali lábiles (Zúñiga 2009). La temperatura de la solución de lisis es fundamental para mantener la integridad de los geles (Mudry y Carballo 2006).

Denaturación

Posterior a la lisis y antes de la electroforesis los preparados son incubados en un Buffer de electroforesis por 20 minutos generalmente. Este buffer puede variar su pH entre 10 y 13, de acuerdo a las condiciones neutras o alcalinas que se quieran generar. Los pH alcalinos son los más empleados, puesto que con ellos no solo se permite la separación de la doble hebra, sino que se maximiza la producción de rupturas de cadena simple y sitios álcali lábiles, además de evidenciar una gama de daños más frecuentemente formada por agentes genotóxicos (Zúñiga 2009). El buffer recomendado por Singh *et al.* (1988) es EDTA 1mM e Hidróxido de Sodio 300 Mm pH 13 (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009). El tiempo de denaturación por lo general se mantiene en los distintos laboratorios y solo se modifica en evaluaciones específicas.

Electroforesis

Este paso se realiza con el mismo buffer empleado en la denaturación. La electroforesis llevada a cabo en el ensayo cometa, es diferente a las convencionales, pues en este caso se necesita que el ADN migre solo una fracción de milímetros, lo que se consigue con la exposición de los portaobjetos a bajos voltajes por corto tiempo, entre 0,5 – 5 V/cm y 5 – 30 minutos (Mudry y

Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009). Las condiciones óptimas de voltaje y amperaje dependen generalmente de la migración evidenciada en los controles negativos. Los fragmentos de ADN inducidos por agentes genotóxicos migran hacia el ánodo (Faust *et al.* 2004).

Neutralización

Este paso se lleva a cabo para neutralizar los álcalis presentes en el o los geles de agarosa. Generalmente se realizan tres lavados con buffer Trizma pH 7,5 con duración cada uno de 5 minutos (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009). Si en los portaobjetos se evidencia ruido de fondo pueden realizarse mayor número de lavados o ampliar el tiempo de los mismos. En la neutralización las cadenas de ADN separadas por el tratamiento alcalino en la cabeza del cometa se renaturalizan, puesto que el material genético está intacto, mientras que el ADN de la cola permanece como monocatenario (Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009).

Finalizada la neutralización, los preparados pueden ser teñidos o deshidratados para su análisis inmediato o posterior respectivamente. Si se decide realizar preparados permanentes, se pasan las láminas sucesivamente por varios alcoholes, con lo que se logra la deshidratación de los geles (Klaude *et al.* 1996).

Tinción

La tinción o colorante utilizado es específico para ADN. Los colorantes más empleados son el Bromuro de Etidio, el Ioduro de Propidio y el 4,6-Diamino-2 fenil indol (DAPI) (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009). Cada una de estas tinciones actúa de forma diferente sobre el ADN, el bromuro de etidio es un agente intercalante que se inserta entre los pares de bases nitrogenadas adyacentes en la doble cadena; el ioduro de propidio se intercala entre las bases con poco o ningún orden de preferencia y el DAPI forma complejos fluorescentes en los surcos menores de la doble hélice de ADN y es estabilizado por puentes de hidrógeno (Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009). En algunos estudios también se han empleado técnicas no fluorescentes como la tinción con nitrato de plata (Cossio *et al.* 2004).

Análisis

Los preparados generalmente se analizan en microscopio de fluorescencia a un aumento que oscila entre 160x y 600x, siendo mayormente empleados objetivos de 200x y 400x (Mudry y Carballo 2006, Liao *et al.* 2009, Zúñiga 2009).

Hay un gran número de posibilidades para evaluar y medir la extensión del daño al ADN obtenida en el ensayo cometa y poca la literatura que ajuste esta prueba a un único sistema de valoración. Algunos trabajos tienden a presentar más resultados cualitativos que cuantitativos, en los que se comparan criterios que atienden al nivel de daño determinado por la proporción de ADN que escapa del núcleo. En otros casos se utiliza un ocular con escala para medir el largo del cometa, el ancho del núcleo y luego obtener una razón que permita cuantificar el daño (Prieto y Llopiz 1999). También es sugerida la evaluación del daño por la relación entre el radio del núcleo y la extensión del cometa, lo cual ya es llevado a cabo por el uso de software especial (Machado *et al.* 2009).

A la hora de presentar los resultados, es de destacar que tampoco existe un método estadístico estándar, sin embargo, generalmente los datos son presentados a manera de histogramas de frecuencia en función de distintas propiedades como: momento de cola, dispersión de la longitud de la cola, porcentaje de ADN que migra, entre otras (Ejchart y Sadlej 2003, Moller 2006). Otros trabajos sugieren el uso de curvas de calibración para estandarizar los parámetros que permiten cuantificar el daño evaluado entre laboratorios, teniendo en cuenta las dosis de daño a las que han sido expuestas las células *in vitro* y el momento o porcentaje de ADN en cola (Güerci *et al.* 2006).

4.1.2.2. Modificaciones al método convencional

Con el fin de detectar daños más específicos se han realizado varias modificaciones al protocolo original del ensayo cometa, dentro de estas cabe mencionar: la introducción de enzimas de reparación o la incubación con endonucleasas de lesión específica, adición de proteinasa K, diferenciación entre entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-Proteínas, diferenciación entre

células apoptóticas y necróticas, diferenciación entre roturas de cadena sencilla y sitios sensibles al álcali (Mudry y Carballo 2006), ensayo cometa e hibridación in situ fluorescente (FISH) o COMET – FISH (Glei *et al.* 2009, Spivak *et al.* 2009) y reparación del ADN (Zúñiga 2009).

Cada modificación incluida obedece a distintos propósitos que permiten un estudio más detallado de daños puntuales en el ADN en general o en el ADN de determinados cromosomas, regiones de interés dentro de un cromosoma o genes concretos. Por la aplicación de variantes al protocolo original, además de la detección de sitios sensibles al álcali y rupturas de cadena simple y doble, se obtiene información acerca de otros tipos de daño como bases oxidadas, dímeros inducidos por UV y enlaces entrecruzados entre las fibras de ADN o de ADN y proteínas ocasionados por agentes potencialmente genotóxicos como los radicales libres del oxígeno (Dusinská y Collins 1996). Otros cambios en el protocolo corresponden a estudios de las tasas de reparación de distintos genes, haciéndose importante la evaluación de la eliminación del daño antes de la replicación, siendo este un paso necesario para que el error no se filtre como mutación en la línea celular (Horváthová *et al.* 2004).

4.1.3. Ventajas del Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula provee ciertas ventajas ante otras pruebas que evalúan el daño genotóxico por efecto. En este test los datos son colectados a nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación. Así mismo se requiere sólo pequeños números de células para ser llevado a cabo y virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada en el proceso (Tice *et al.* 2000, Di Giorgio *et al.* 2001, Frenzilli *et al.* 2009). Por medio de este ensayo es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio sobre otras técnicas que si lo requieren (Prieto y Llopiz 1999).

En la electroforesis de una sola célula además se ha reportado mayor sensibilidad de detección de daño con respecto a otras pruebas de citogenética clásica. Estudios comparativos en donde se evalúan los efectos genotóxicos de la radiación por rayos X en linfocitos humanos, establecen que el daño se incrementa con las dosis de radiación proporcionadas a la muestra tanto en el test

de micronúcleos como en el ensayo cometa, sin embargo la sensibilidad del ensayo cometa es significativamente superior, puesto que el daño es detectado incluso a bajas exposiciones (He *et al.* 2000). El ensayo del cometa alcalino es considerado también en otros estudios comparativos de carácter farmacéutico para la evaluación de nuevas drogas, junto con la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando un alto grado de valor predictivo (Hartmann *et al.* 2003).

A nivel general este test de genotoxicidad es bastante flexible permitiendo la detección de un amplio rango de daños que pueden ocasionarse en el ADN y consta de un proceso sencillo y de rápida ejecución, por lo que es posible la obtención de resultados el mismo día en que se ha tomado la muestra y se ha realizado el protocolo (Di Giorgio *et al.* 2001, Hwang y Bowen 2007).

4.1.4. Desventajas del Ensayo Cometa

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente empleada y aceptada a nivel mundial, existen algunas desventajas en su proceso de evaluación. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos y el número de variables que pueden afectar un óptimo desarrollo, pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado a analizar debido a la alta sensibilidad de la técnica (Zúñiga 2009). La segunda desventaja es la imposibilidad de detectar el efecto de agentes aneugénicos, los cuales también son eventos de gran participación en los procesos carcinogénicos (Mudry y Carballo 2006). La tercera desventaja y la más nombrada, hace referencia a la falta de estandarización en el análisis de las muestras y la representación de los datos que se obtienen en los estudios, ya que aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios (Zúñiga 2009).

4.1.5. Aplicaciones

El ensayo cometa es una de las técnicas más empleadas en la actualidad dentro del área de la genética toxicológica. Por su método económico, rápido y efectivo, es empleado en el estudio de

seguimiento a exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas (Valverde y Rojas 2009). En las disciplinas medioambientales, por ejemplo, se han realizado estudios del impacto de genotóxicos en medios acuáticos usando como modelo biológico distintas especies de peces (Frenzilli *et al.* 2009, Machado *et al.* 2009). Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de Farmacovigilancia de distintas drogas (Hartmann *et al.* 2003); de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral (Goldberg 2008, Cemeli *et al.* 2009); y estudios sobre mutágenos de línea germinal (Aitken *et al.* 2008, Speit *et al.* 2009), por mencionar algunos casos.

Aunque los estudios de genotoxicidad son los más abundantes, no son los únicos que se realizan tanto *in vitro* como *in vivo* para la valoración de la seguridad de los distintos agentes y la potencial mutagenicidad de estos (Zúñiga 2009). A nivel clínico se han llevado a cabo diversas publicaciones que informan de manera cada vez más extensa los mecanismos de acción de los tratamientos oncológicos y el proceso de evolución de los tumores, a la vez que se evalúa la capacidad de reparación del ADN como un factor principal en la susceptibilidad al cáncer y una línea de defensa fundamental contra la acción de los agentes xenobióticos (Faust *et al.* 2004, Zúñiga 2009).

La biomonitorización ambiental y de poblaciones humanas es otro punto a destacar. La relevancia de este tipo de estudios generalmente se mueve en relación a dos propósitos: evaluar el riesgo de animales y plantas que habitan un ambiente expuesto a contaminantes, o evaluar el riesgo de la población humana a contaminantes presentes en los cultivos alimentarios, en el agua o en el ambiente que los circunda (Faust *et al.* 2004, Valverde y Rojas 2009, Zúñiga 2009).

4.2. Antecedentes

Ostling y Johanson en 1984, fueron quienes desarrollaron originalmente el test del ensayo cometa para la evaluación del daño en el ADN a nivel de una sola célula, su técnica consistió en una lisis celular con detergentes y alta concentración de sales, para la eliminación de las membranas citoplasmáticas y nucleares, así como la eliminación de restos citoplasmáticos, ARN y algunas

proteínas nucleares. De esta manera el ADN liberado se sometió a una electroforesis bajo condiciones neutras y se tiñó con naranja de acridina, generando una emisión verde cuantificada al microscopio. El ADN liberado de la cabeza del cometa depende del efecto del mutágeno que fue usado, sin embargo en esta versión solo es posible examinar el daño por ruptura de cadena doble.

Posteriormente Singh *et al.* en 1988 modificaron el protocolo con la introducción de la denaturación del ADN bajo condiciones alcalinas a $\text{pH} > 13$, en donde las células son lisadas a $\text{pH} 10$ con 2,5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 Mm Tris, DMSO 10% y 1% de Triton X-100, por una hora, seguido de un tratamiento con álcalis (1 mM Na_2EDTA y 300 mM NaOH) y electroforesis a pH elevado ($\text{pH} > 13$). A este pH se incrementa la migración de ADN asociada con mayores niveles de rupturas de cadena simple, actividad incompleta en sitios de reparación y sitios álcali lábiles. Puesto que la mayor parte de agentes genotóxicos inducen esta clase de daños, ésta es la versión más recomendada y usada en trabajos de carácter internacional en la valoración de toxicidad génica.

Olive *et al.* en 1990 introducen otra versión alcalina del ensayo en la que las células son lisadas en un buffer débilmente alcalino (30 mM NaOH) por una hora y la electroforesis es corrida a $\text{pH} \sim 12,3$. Esta variante de la prueba fue desarrollada para la detección óptima de subpoblaciones celulares con sensibilidad variable a las drogas y la radiación.

A partir de entonces, se han desarrollado otras modificaciones al protocolo original, generalmente alcalino y han surgido otros estudios dentro de los que cabe resaltar: la adición de endonucleasas usadas en la detección de pirimidinas oxidadas por Collins *et al.* en 1993; la descripción de células necróticas o apoptóticas con cabezas pequeñas o inexistente y colas largas y difusas por Olive y Banáth en 1995; la detección de enlaces entrecruzados de ADN por Pfuhrer y Wolf en 1996; la combinación del ensayo cometa con FISH en la identificación de rupturas cromosómicas y genes específicos por Santos *et al.* en 1997; la publicación de las primeras normas internacionales para la aplicación del ensayo en toxicología genética y biomonitorización por Tice *et al.* en 2000; la medición de la capacidad de reparación del ADN de un extracto celular por Collins *et al.* en 2001.

En Colombia el ensayo cometa no está ampliamente estandarizado en los laboratorios de genética y toxicología, aunque se encuentran algunos estudios ya publicados de genotoxicidad *in vitro* de distintos agentes, que sobretodo pueden ubicarse en el área de las aplicaciones en salud humana. Los laboratorios que hasta el momento han adelantado artículos en esta materia, corresponden al Laboratorio de Genética Humana de la Universidad de los Andes, y los Laboratorios de Biotecnología Animal y Biología Celular y Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín en convenio con la Universidad de Antioquia (Monroy *et al.* 2005, Soler *et al.* 2005, Urrego *et al.* 2005).

5. OBJETIVOS

5.1. General

Estandarizar el test del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica para la detección de daños en el ADN.

5.2. Específicos

- Estandarizar los tiempos y el proceso de cada etapa del ensayo cometa en células de sangre periférica obtenidas de sangre entera, linfocitos aislados o suspensión celular.
- Verificar la eficacia y funcionalidad del ensayo cometa en el laboratorio por medio de la evaluación del efecto genotóxico de un agente alquilante como la Mitomicina, oxidante como el Peróxido de Hidrógeno y clastogénico como los Rayos X.
- Establecer el protocolo final con el que se podrá llevar a cabo el ensayo y realizar una guía visual de este.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio y diseño

El presente es un estudio descriptivo – experimental que se desarrolló en dos fases, una de estandarización del ensayo de genotoxicidad, y otra de verificación del proceso estandarizado, por medio de ensayos con agentes de efecto genotóxico conocido y registrado en la literatura.

6.2. Sujetos y toma de muestra

El trabajo se realizó con la intervención de veinte donantes (hombres y mujeres) sanos entre los 19 y 28 años, quienes no presentaron historia de exposición a genotóxicos, sin contacto cotidiano con químicos, no fumadores, no expuestos a fármacos por dosis terapéutica, ni evidencia de anomalías genéticas. Estos criterios de inclusión se manejaron de manera estricta, para mantener la validez interna del estudio y evitar resultados falsos positivos.

Las muestras de sangre se realizaron por punción endovenosa en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional – Sede Bogotá, en tubos tipo vacutainer con heparina sódica, en la mayoría de los casos.

Las células evaluadas se obtuvieron por sangre entera y suspensión celular. Se empleó sangre entera tanto para la totalidad de las pruebas del proceso de estandarización, como para la verificación con Rayos X. En la verificación con Mitomicina y Peróxido de Hidrogeno se trabajó con células en suspensión. No se llevó a cabo el aislamiento de linfocitos por la técnica con Ficoll Histopaque puesto que no se dispuso de este reactivo.

A cada individuo donante se le explicó el proceso y los fines de la investigación, así como también diligenciaron y firmaron el consentimiento informado.

6.3. Preparación de las soluciones de trabajo

Concentraciones de agarosa: Se preparó LMPA – agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% y NMA – agarosa de punto de fusión normal al 1,0%. Ambas agarosas fueron disueltas en PBS.

Solución de lisis: se agregó NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM y Trizma 10 mM a 700 ml de agua destilada y se mezcló. Se Ajustó el pH a 10 usando concentraciones de HCl o NaOH y se llevó el volumen de la solución hasta 890 ml con H₂O. A la solución final se le agregó 1% Triton X-100 y 10% de dimetilsulfoxido (DMSO).

Buffer de denaturación y electroforesis: se prepararon dos soluciones stock, 10 N NaOH y 200 mM EDTA (pH 10). Para la solución de trabajo final se agregó por litro, 30 ml de NaOH (stock) y 5 ml de EDTA (stock), se mezcló bien y se verificó el pH > 13 antes de su uso.

Buffer de neutralización: se añadió Trizma base 0.4 M a 800ml de agua destilada, ajustando el pH a 7.5 con concentraciones de HCl. Posteriormente se agregó H₂O hasta completar 1000ml.

Solución de tinción: se preparó una solución stock agregando 1ml de bromuro de etidio en 50 ml de agua destilada para una concentración 10X. Para la solución de trabajo a una concentración de 1X se adicionó 1 ml de la solución stock a 9 ml de agua destilada.

Todas las soluciones después de realizadas se mantuvieron en refrigeración a 4°C, para procurar la estabilidad de los buffers, al igual que ambas preparaciones de agarosa. La solución de tinción, tanto stock como de trabajo, fueron la excepción, pues se mantuvieron a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

6.4. Fase de estandarización

Se realizaron un total de 23 pruebas a partir de 19 muestras de sangre periférica, en las que se estudió el fundamento bioquímico de cada una de las etapas del ensayo cometa y se variaron distintos aspectos, con el fin de encontrar el mejor ajuste en cada paso. Dentro de los aspectos modificados es posible citar el tiempo de duración de cada etapa, el anticoagulante del vacutainer empleado en la toma de muestra, el proceso de elaboración de los preparados (geles), la solución de lisis empleada en la degradación de membranas, el voltaje manejado en la electroforesis y el nivel del buffer de denaturación y electroforesis en la cámara electroforética, tal y como se detalla en la Tabla 1.

El protocolo guía que se tomó como punto de partida en la fase de estandarización, fue reportado por primera vez por Singh *et al.* (1999), este se mejoró por la revisión de varias publicaciones.

Tabla 1. Aspectos modificados en la fase de estandarización

Etapa	Variable	Clases, categorías o rangos de variación			
Toma de muestra	Anticoagulante	Heparina sódica		EDTA	
Preparados	Primera capa	Sin deshidratación		Con deshidratación	
	Segunda capa	Mezcla con sangre a 37°C		Mezcla con sangre > 37°C	
Lisis	Tiempo	1 hora	17 horas	22 horas	
	Composición	Tris HCl pH 8, EDTA 0,5M y SDS 10%.	NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% Y Tritón X-100 1% (Reutilizada) .	NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% Y Tritón X-100 1% (Nueva – sin reutilizar) .	
Denaturación	Tiempo	40 min		20 min	
Electroforesis	Tiempo	25 min		15 min	
	Nivel del buffer en cámara	2cm sobre las láminas		5mm sobre las láminas	
	Voltaje	25V		30V	
Neutralización	Número de lavados	3 lavados		4 lavados	
Tinción	Volumen del colorante por lámina	300µl	150µl	100µl	40µl

6.5. Fase de verificación

Se efectuaron tres ensayos de verificación a partir de una misma muestra de sangre periférica. Para este propósito se empleó la exposición a Mitomicina como agente alquilante, el Peróxido de Hidrógeno como agente oxidante y los Rayos X como clastógeno físico. Se evaluó un control general para los tres ensayos y tres dosis de exposición en cada uno.

Verificación con mitomicina: Se agregó 1ml de sangre entera a 2ml de medio RPMI 1640 que contenía la sustancia en estudio en una de tres concentraciones, 0.16µg/ml, 0.33µg/ml ó 0.65µg/ml (Figura 1.). Las muestras fueron incubadas por 48 horas a 37°C. A las 24 horas de incubación se examinaron las suspensiones para efectuar un cambio de medio RPMI, que no fue necesario. Al término de la incubación la suspensión celular fue traspasada a un eppendorf y

centrifugada por 3 minutos a 2000g, después de los cuales se retiró el sobrenadante. A partir de este punto se continuó con los pasos estandarizados para el ensayo cometa.

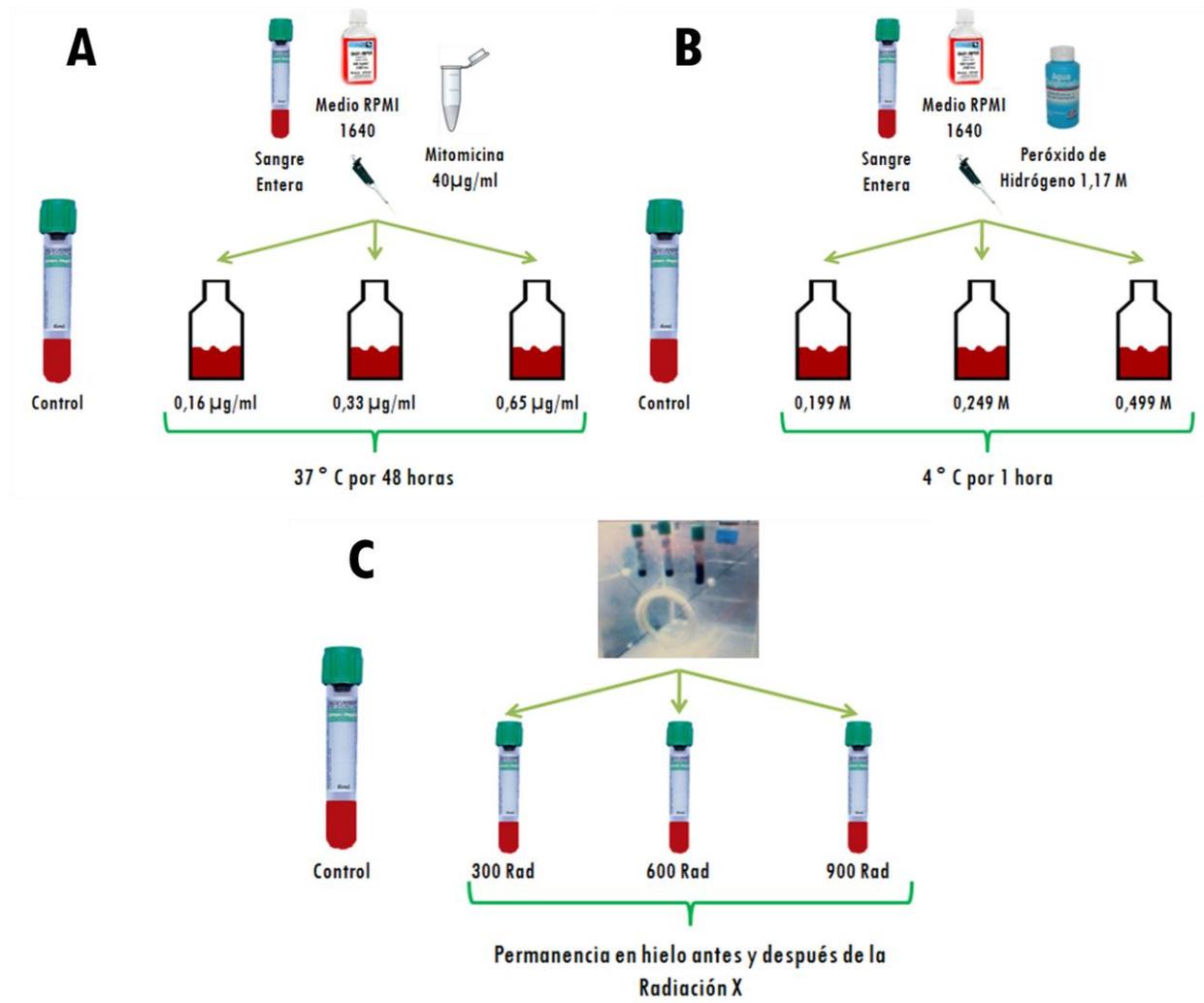


Figura 1. Método empleado para la exposición *in vitro* de sangre periférica a agentes genotóxicos. **A.** Mitomicina. **B.** Peróxido de hidrógeno. **C.** Rayos X.

Verificación con peróxido de hidrogeno: Se agregó 1ml de sangre entera a 1ml de medio RPMI 1640 previamente mezclado con H₂O₂ en alguna de las siguientes concentraciones 0.199M, 0.249M ó 0.499M (Figura 1.). Las muestras fueron refrigeradas a 4°C por una hora. Al finalizar este periodo de tiempo la suspensión celular se pasó a un eppendorf y se centrifugó por 3 minutos a 2000g, después de los cuales se retiró el sobrenadante. A partir de este punto se continuó con los pasos estandarizados para el ensayo cometa.

Verificación con radiación X: El procedimiento experimental de la radiación se realizó en el Instituto Colombiano de Geología y Minería – INGEOMINAS – en el laboratorio secundario de calibración dosimétrica, con un equipo de Rayos X industrial (PANTAK) a 150V, 5mA y un rendimiento de 16.20R/min. Las muestras fueron ubicadas a 1.33m de la fuente de poder colimada en un soporte de acrílico. Se expuso un tubo vacutainer por cada dosis de exposición: 300Rad, 600Rad ó 900Rad (Figura 1.). Los tiempos de exposición para cada una de las dosis corresponden respectivamente a 18 minutos, 37 minutos ó 55 minutos. Tan pronto culminó la exposición a la radiación las muestras fueron colocadas en hielo. A partir de este punto se continuó con los pasos estandarizados para el ensayo cometa.

6.6. Análisis de imágenes

Las observaciones fueron hechas en un microscopio ZEISS con lámpara de fluorescencia HBO de 100W y un filtro de BP 546 FT 580 LP 590, conectado a una cámara digital Nikon. La magnificación empleada para el análisis fue de 20X. Las imágenes fueron capturadas con uso del software Lucia 5.30 y procesadas por medio del software de acceso público Comet Score™, especial para el ensayo cometa.

En la figura 2 que aparece a continuación se muestra la imagen de una célula sin daño y una célula con daño, en donde se ilustran las partes a destacar del cometa: cabeza y cola, ambas fundamentales en la comprensión y análisis de este ensayo.

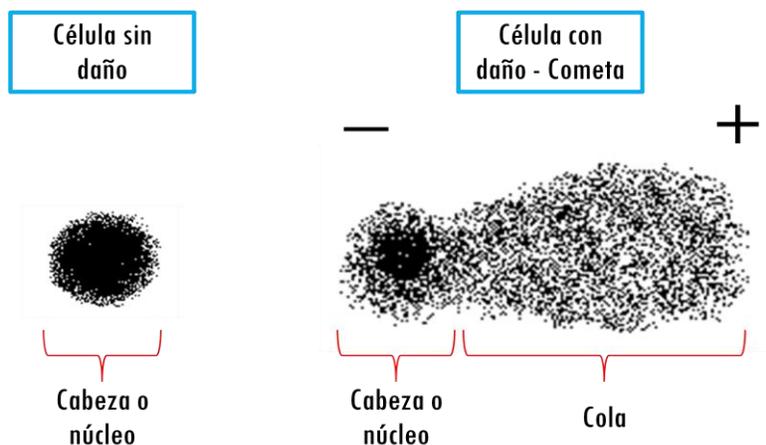


Figura 2. Célula sin daño y con daño. Imagen del cometa y partes de este.

6.6.1. *Análisis cualitativo*: este tipo de análisis se llevo a cabo únicamente en los tres ensayos de verificación, contando en doscientas células la frecuencia del grado de daño apreciado en los cometas, en una escala de 1 a 5. Siendo 1 el grado de daño más bajo o nulo y 5 el grado de daño más alto o evidencia de apoptosis, tal y como lo proponen Collins *et al.* (1995) y Kobayashi *et al* (1995).

6.6.2. *Análisis cuantitativo*: Este análisis se realizó en dos ensayos de la fase de estandarización¹ y los tres ensayos de la fase de verificación, para al menos 30 cometas por tratamiento a evaluar. Para este proceso se escogieron las tres medidas cuantitativas más empleadas en estudios del ensayo cometa según lo planteado por Faust *et al.* (2004), entre las que están la longitud de la cola², el porcentaje de ADN en cola³ y el momento de cola⁴ [(Longitud de cola x % de ADN en cola)/100]. Las medidas obtenidas fueron arrojadas por Comet ScoreTM después del procesamiento de imágenes.

6.7. Tratamiento estadístico

A los datos obtenidos en el análisis cuantitativo de los ensayos de verificación se les aplicó el test de Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons, del paquete estadístico Statistix 9.0. Se estudiaron diferencias significativas entre el control y las dosis de exposición a un determinado agente tanto para $P < 0.01$, como para $P < 0.05$. Se llevó a cabo una prueba no paramétrica después de haber rechazado el supuesto de homogeneidad de varianzas en el paquete estadístico SPSS 17. La estadística descriptiva referente al promedio y la desviación estándar de cada tratamiento, al igual que las gráficas de distribución, se realizó en Microsoft Office Excel 2007.

¹ Se empleo este análisis en la fase de estandarización para establecer si existían diferencias pronunciadas entre dos tiempos de lisis utilizados.

² Distancia abarcada desde el inicio de la cola justo al final de la cabeza, hasta el último fragmento de la cola.

³ Medida obtenida de la fluorescencia de la cola en contraste con la fluorescencia de la cabeza.

⁴ Medida obtenida por cálculo aritmético al multiplicar el dato de longitud de cola con el porcentaje de ADN, y posteriormente dividir el resultado de dicha multiplicación entre cien.

7. RESULTADOS

7.1. Fase de estandarización

Las figuras 3, 4 y 5 corresponden a los cometas obtenidos por la variación de procesos en la lisis, denaturación y electroforesis, las cuales constituyen las tres etapas en las que se examinó mayor número de variables.

En la figura 3 se muestran seis procesos de lisis estudiados, tres de ellos (A, B y C) referentes a la conformación y naturaleza de la solución y otros tres (D, E y F) concernientes al tiempo de duración de la etapa, en donde se obtuvieron resultados adecuados utilizando el Tritón X-100 y el DMSO como compuestos fundamentales del buffer de lisis (Figura 3C), además de tiempos de lisis prolongados (Figura 3E y 3F).

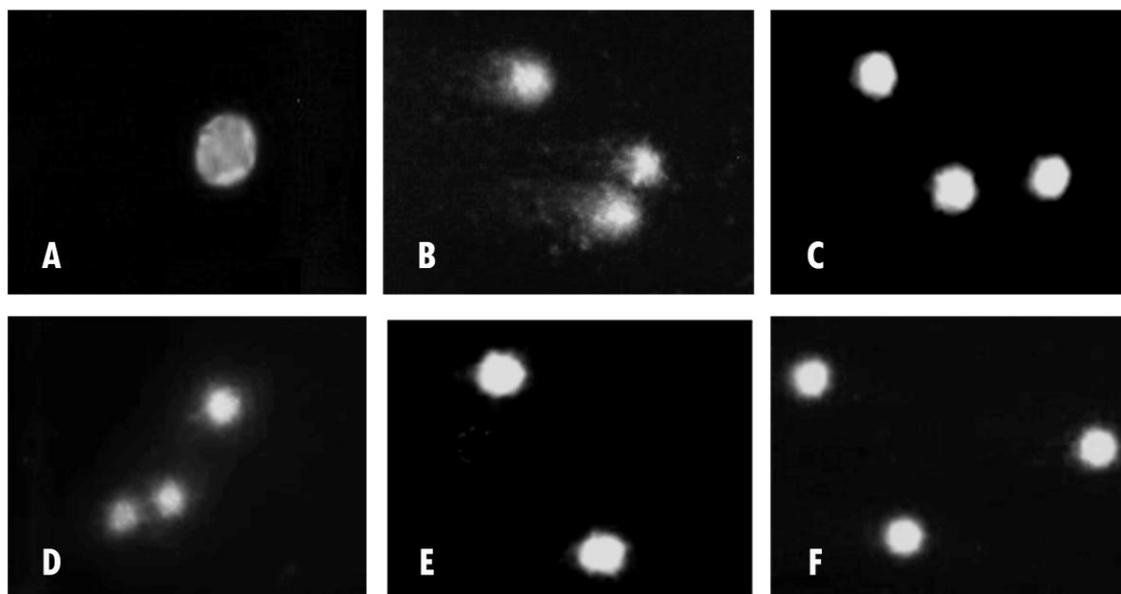


Figura 3. Procesos de lisis evaluados en la fase de estandarización para una muestra control negativo (Vistas en 20x). A. Solución de Lisis conformada por Tris HCl pH 8, EDTA 0,5M y SDS 10%. B. Solución de lisis conformada por NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% y Tritón X-100 1% (Reutilizada). C. Solución de lisis conformada por NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% y Tritón X-100 1% (Nueva – sin reutilizar). D. Lisis de 1 hora. E. Lisis de 17 horas. F. Lisis de 22 horas.

Las otras composiciones del buffer de lisis evaluadas no presentaron un efecto óptimo, debido a que las membranas y restos celulares no se degradaron (Figura 3A) o se evidenció un exceso de daño en controles negativos (Figura 3B). El tiempo corto de lisis no fue apropiado puesto que los geles se observaron con exceso de restos celulares y no todas las células presentaron degradación de membranas (Figura 3D).

En la figura 4 se evidencian dos procesos distintos de denaturación y electroforesis, con mayor (A) y menor (B) tiempo de permanencia de las láminas en el reposo alcalino y la corrida electroforética. Se estableció para el protocolo final el uso de tiempos cortos de denaturación y electroforesis, pues cuando se trabajaron tiempos mayores se apreció daño agregado en el ADN, lo cual se manifestó con núcleos no compactos.

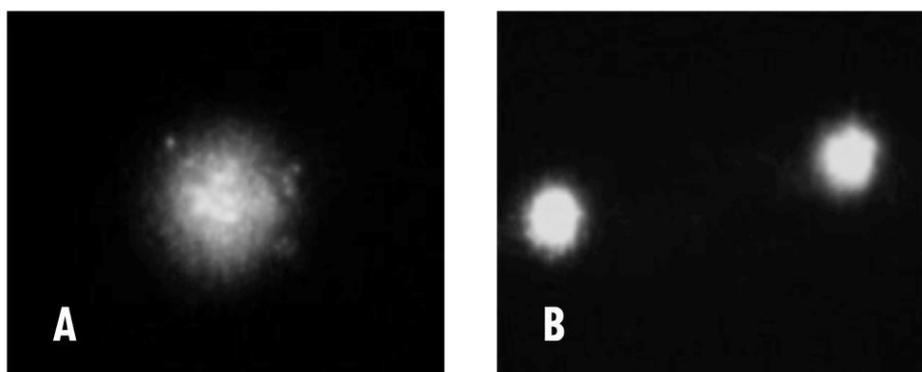


Figura 4. Procesos de denaturación y electroforesis evaluados en la fase de estandarización para una muestra control negativo (Vistas en 20x). A. Denaturación de 40 minutos y electroforesis de 25 minutos B. Denaturación de 20 minutos y electroforesis de 15 minutos.

En la figura 5 se presentan distintos fenómenos de electroforesis teniendo en cuenta el nivel del buffer presente en la cámara de electroforesis. Se escogió niveles bajos del buffer, debido a que al trabajar con niveles altos, para un control positivo no se apreciaron colas.

En la etapa de electroforesis, adicional al tiempo y al nivel del buffer empleado, también se analizaron cambios en el voltaje, sin embargo es de resaltar que se obtuvo desprendimiento de geles a valores superiores de 25.

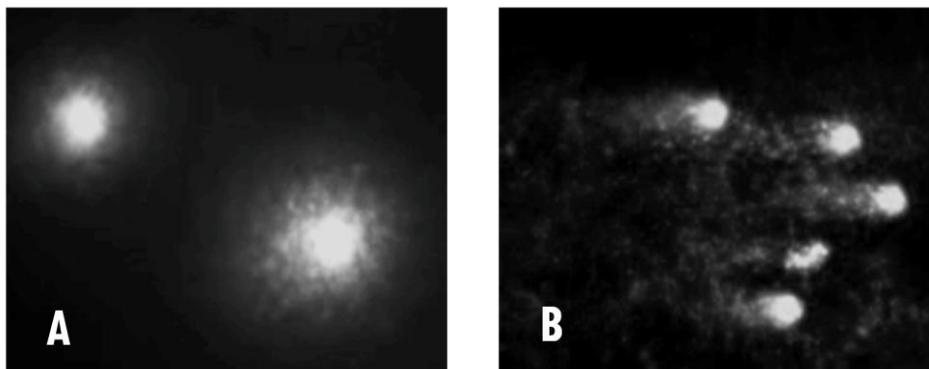


Figura 5. Nivel del buffer en la cámara electroforética evaluado en el proceso de electroforesis de la fase de estandarización para una muestra control positivo, con daño (Vistas en 20x). A. Aproximadamente 2cm de solución cubriendo las láminas. B. Aproximadamente 5mm de solución cubriendo las láminas.

Además de las etapas de lisis, denaturación y electroforesis, también se estudiaron variaciones por el anticoagulante empleado en los vacutainers utilizados en la toma de muestra, heparina y EDTA; el número de lavados llevados a cabo en el proceso de neutralización, entre 3 y 4 eventos de cinco minutos cada uno; y el volumen de bromuro de etidio agregado en el proceso de tinción, 300 μ l, 150 μ l, 100 μ l y 40 μ l. Cabe mencionar que no se presentaron diferencias en los cometas obtenidos con estas variaciones.

Por otra parte, la etapa de preparados se caracterizó por modificaciones en la elaboración de los geles, sin embargo no se presentaron resultados detallados al respecto pues hasta que no quedó estandarizado el proceso de obtención de la primera y segunda capa, se manifestaron geles inestables, no adheridos a los portaobjetos, lo cual dificultaba su observación y análisis. No se realizó una tercera capa de agarosa en este estudio, pues ya en la revisión literaria se estableció que no alteraba los resultados.

Las observaciones evaluadas dentro de cada proceso contribuyeron a escoger el protocolo más adecuado para efectuar la estandarización como se muestra en la figura 6 y de forma más detallada en el anexo 1 y 2.

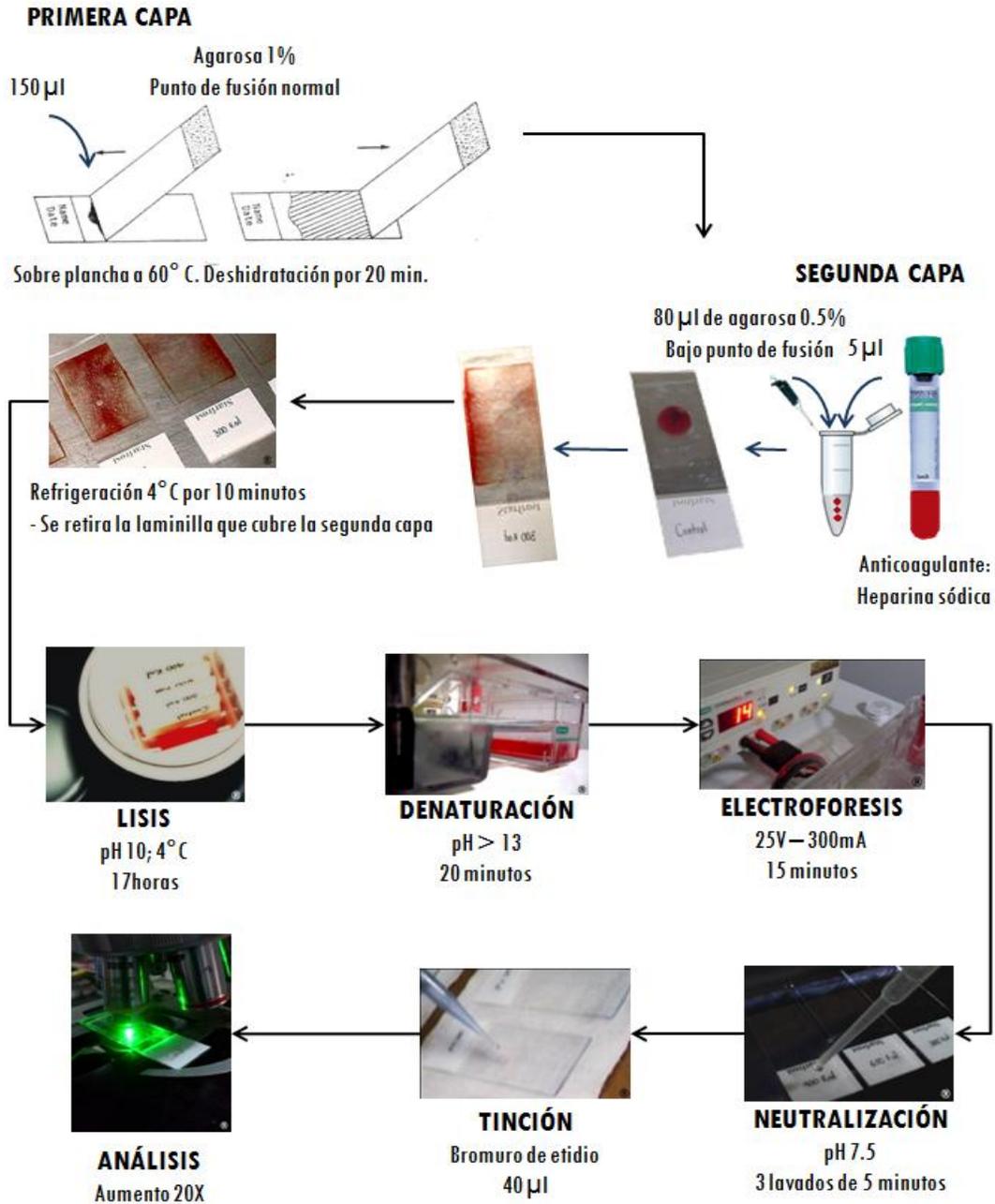


Figura 6. Pasos básicos de la estandarización del protocolo.

7.2. Fase de verificación

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para la medida de daño cualitativo evaluada en los ensayos de verificación, por la aplicación de una escala de 1 a 5, desde el menor grado de daño hasta mayor grado de daño.

Tabla 2. Medida de daño Cualitativo.

Ensayo	Tratamientos	1	2	3	4	5
		Control	199	0	0	0
Mitomicina	0,16 µg/ml	123	72	4	1	0
	0,33 µg/ml	24	68	106	0	2
	0,65 µg/ml	30	98	71	1	0
Peróxido de hidrogeno	0,199 M	11	168	16	3	2
	0,249 M	8	78	97	13	4
	0,499 M	1	33	107	54	5
Rayos x	300 Rads	5	89	95	11	0
	600 Rads	6	27	81	86	0
	900 Rads	0	5	49	114	32

Escala de daño de 1 a 5. Número de cometas en 200 células evaluadas, por cada grado de daño.

En la tabla 3 se presentan las diferencias significativas de las medidas cuantitativas de daño evaluadas con respecto al control negativo para $P < 0.05$ y $P < 0.01$, además de la estadística descriptiva de los datos abordados que permiten una mejor interpretación de las curvas de dispersión posteriormente presentadas en la Figura 7. La significancia encontrada permite establecer que para todos los ensayos de verificación, las dosis de exposición examinadas presentaron resultados diferentes al control negativo.

Tabla 3. Diferencias significativas de las medidas de daño Cualitativo.

Ensayo	Tratamientos	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	Momento de cola
		Control	4,63 ± 3,26	8,10 ± 7,42
Mitomicina	0,16 µg/ml	8,59 ± 5,13 *	11,29 ± 8,12	1,17 ± 1,24
	0,33 µg/ml	17,00 ± 14,79 **	14,87 ± 8,96 *	2,90 ± 2,98 **
	0,65 µg/ml	12,00 ± 12,57 **	15,18 ± 9,82 **	2,50 ± 3,51 **
Peróxido de hidrogeno	0,199 M	17,88 ± 15,23 **	14,69 ± 7,55 *	3,16 ± 3,74 **
	0,249 M	36,26 ± 34,63 **	17,20 ± 9,96 **	7,71 ± 10,32 **
	0,499 M	80,58 ± 79,08 **	17,42 ± 11,41 **	19,07 ± 24,22 **
Rayos x	300 Rads	28,25 ± 31,62 **	22,03 ± 9,83 **	7,96 ± 13,88 **
	600 Rads	40,05 ± 28,41 **	21,63 ± 6,84 **	9,54 ± 9,08 **
	900 Rads	101,55 ± 52,13 **	29,26 ± 9,61 **	33,26 ± 23,27 **

* $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ (Diferencias significativas con el Control)

Las curvas mostradas en la figura 7 se llevaron a cabo teniendo en cuenta que las dosis de daño aplicadas a la sangre periférica constituían la variable independiente, que podía hacer variar la

variable dependiente, en la que se evaluaba el efecto causado (daño en los cometas), por la longitud de cola y el porcentaje de ADN en cola.

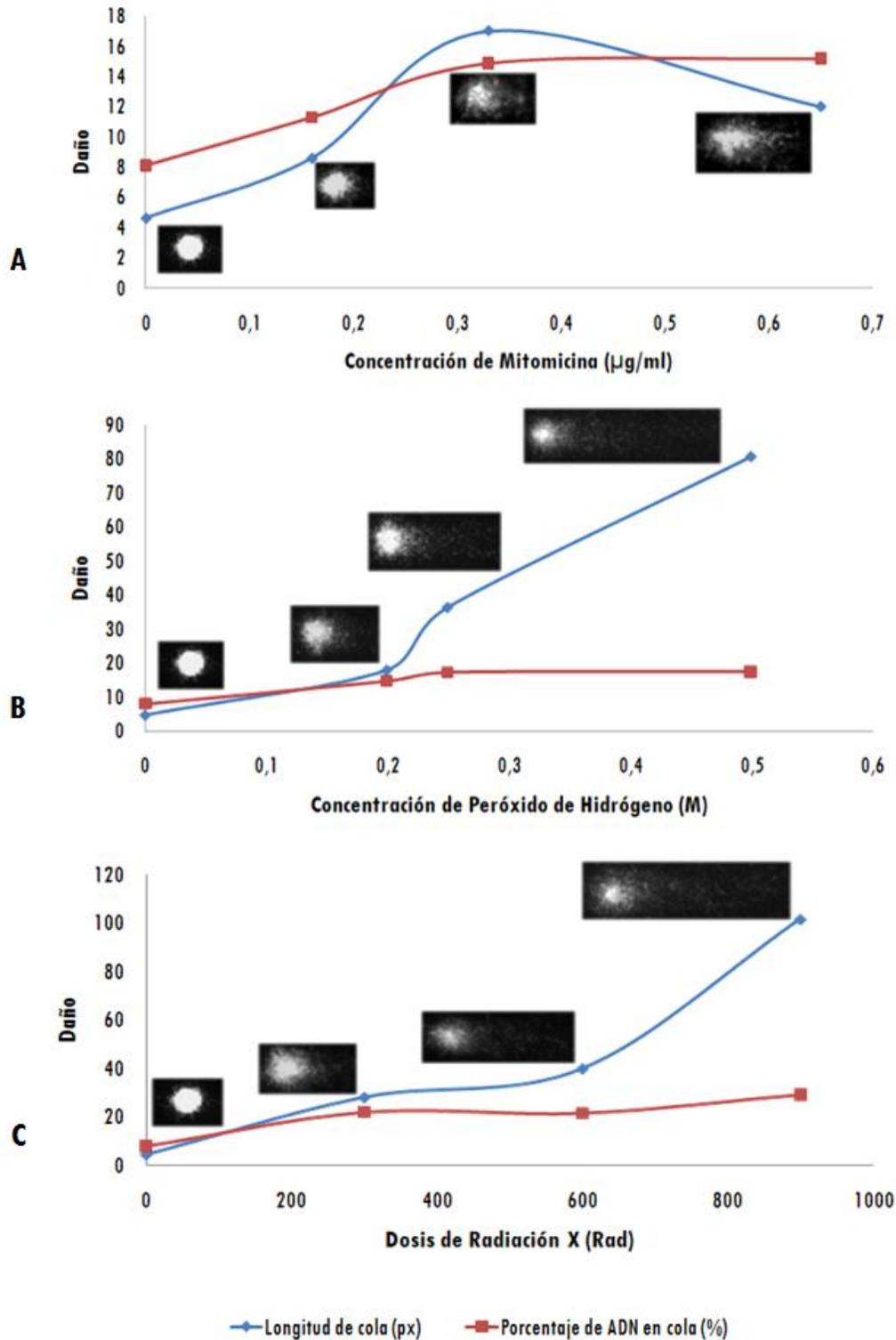


Figura 7. Daño evidenciado en los cometas por el efecto de un agente genotóxico. **A.** Mitomicina. **B.** Peróxido de Hidrógeno. **C.** Rayos X.

Finalmente, después de analizar todos los ensayos de verificación se propuso una escala cualitativa de daño a partir de los cometas observados en los ensayos hechos, tal y como se aprecia en la figura 8.

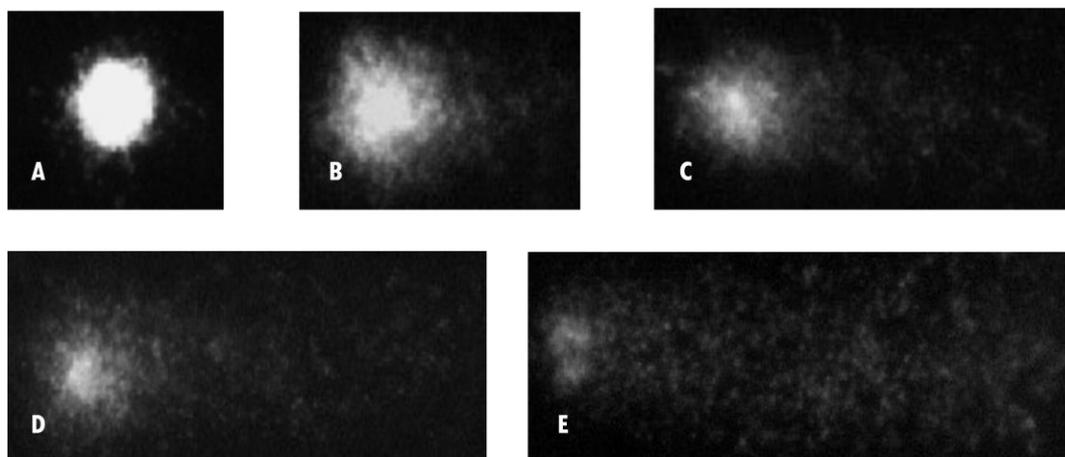


Figura 8. Escala de Daño Cualitativo Obtenida a partir de los diferentes ensayos de verificación realizados. A. Sin daño. B. Poco daño. C. Daño medio. D. Daño alto. E. Máximo daño.

7.3. Protocolo Final

El protocolo final se logró establecer al finalizar las fases de estandarización y verificación. En él se hace una descripción detallada de cada uno de los pasos y procedimientos que se deben llevar a cabo para la obtención de resultados adecuados con el ensayo cometa, como se muestra en el Anexo 1. Asimismo se muestra de forma complementaria una guía visual del desarrollo de la técnica en el anexo 2.

8. DISCUSIÓN

8.1 Fase de estandarización

Preparados

Con respecto a la primera capa de agarosa (punto de fusión normal) de los preparados se estableció la ejecución de un proceso de deshidratación previa a la aplicación de la segunda capa (Figura 6.), ya que de no ser así, se manifestaba el fenómeno de desprendimiento de geles, tal y como se expuso en los resultados. Por lo anterior es posible presumir que entre más delgada sea la primera capa, mayor será la adhesión al portaobjetos, así como también será mejor la estabilidad proporcionada a la segunda capa del preparado (Zúñiga 2009).

En el caso de la segunda capa de agarosa, lo único importante a mencionar es que al ser embebidas las células a estudiar, la agarosa de punto de fusión normal debe mantenerse a 37°C, de lo contrario se comete el error experimental de denaturar por calor el ADN de las células.

Lisis

De acuerdo a lo evidenciado en la Figura 3 (A, B y C) es posible establecer que la mejor solución de lisis corresponde a la conformada por NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% y Tritón X-100 1%, nueva (Figura 3C). La solución de lisis conformada por Tris HCl pH 8, EDTA 0,5M y SDS 10%, no es óptima pues con su uso la membrana celular no es degradada (Figura 3A). Esto posiblemente se debe a que el SDS no es un detergente tan fuerte como el Tritón X-100, lo cual no garantiza la lisis de los eritrocitos y linfocitos, sin afectar el ADN de estos últimos (Jiménez y Martínez 2000). Adicionalmente el Buffer de lisis con SDS no contiene DMSO, fundamental para limpiar los radicales generados por el hierro liberado de la hemoglobina (Tice y Vásquez 1999).

Por otra parte, el buffer de lisis conformado por NaCl 2.5M, EDTA 100mM, Trizma base 10mM, DMSO 10% y Tritón X-100 1%, reutilizado, no mostró resultados óptimos. Se llegó a la conclusión de que el buffer de lisis bajo ninguna circunstancia debe ser reutilizado, pues este habiéndose utilizado aunque sea solo una vez con anterioridad, genera un daño agregado en el

ADN (Figura 3B). Esto puede explicarse potencialmente por el daño oxidativo que causa en el ADN la liberación de hierro ocasionada durante la lisis de los eritrocitos (Mudry y Carballo 2006). Este daño no se evidencia en un primer uso del buffer por la acción del DMSO en su concentración adecuada (10%), sin embargo puede plantearse que para un segundo evento de uso o posteriores eventos de uso el DMSO no cumple con este fin, debido a que la concentración de este en la solución ha disminuido o se ha agotado, encontrándose el buffer de lisis contaminado por radicales oxidantes.

Por la evidencia mostrada en la figura 3 (D, E y F), también se puede establecer que para los estudios con sangre entera los mejores tiempos de lisis son los prolongados (Figura 3E y 3F). El buffer de lisis por un tiempo prolongado, permite evidenciar los resultados esperados, debido a que en este caso es necesario la degradación no solo de la membrana de los linfocitos, sino también de otras células como los glóbulos rojos y fragmentos citoplasmáticos, tal como lo exponen Güerci *et al.* 2006, Mudry y Carballo 2006, Sotil *et al.* 2007 y Zúñiga 2009. De los dos tiempos de lisis prolongados examinados, se estableció el de 17 horas para el protocolo final, únicamente con el fin de agilizar la consecución de resultados; pues las medidas cuantitativas evaluadas para lisis de 17 horas y 22 horas, en ambos casos, tuvieron gran similitud al compararse con los controles trabajados por Henderson *et al.* 1998.

Denaturación y Electroforesis

Con base a lo apreciado en la Figura 4B se implementó el uso de tiempos cortos de reposo alcalino y corrido electroforético, pues para periodos largos (Figura 4A), una muestra control negativo presentaba núcleos concéntricos más no compactos. Esto indica que la denaturación ha sido tal, que se ha afectado negativamente el ADN, ocasionando que posterior a un proceso de neutralización no se vuelva a condensar el material genético, como es el proceso normal esperado. Debido a que se comprobó experimentalmente que el tiempo no es un factor que afecte la corrida electroforética, este se disminuyó con el fin de agilizar la obtención de resultados, además de evitar la exposición de las láminas a mayor tiempo en el buffer a pH > 13, al cual se lleva a cabo la descondensación del ADN por efecto de la denaturación.

Por otro lado en el proceso de electroforesis, se fijó para el protocolo final un nivel bajo del buffer en la cámara electroforética, ya que de lo contrario la corriente se escapa a través del buffer y no de los geles, evidenciándose en muestras de un control positivo el daño en la periferia de la cabeza de los cometas y no en la existencia de cola, como se observa en la Figura 5A. Se atribuye la ausencia de cola en estos casos a una electroforesis no óptima.

Neutralización y Tinción

En estos procesos no se presentó mayor discrepancia o variabilidad. Sin embargo se recomienda aumentar el número de lavados en el proceso de neutralización, únicamente si se observa mucho background en los controles negativos de un determinado estudio y mayores concentraciones de bromuro de etidio en el caso de no contar con un microscopio que posea un buen filtro de excitación.

8.2. Fase de verificación

Ensayo con Mitomicina

La Mitomicina C es un antibiótico de carácter genotóxico muy usado en el control de tumores debido a la capacidad de inhibición de la síntesis de ADN (Chávez 2006). Está demostrado que causa efectos de clastogenicidad y aneuploidías en células germinales y somáticas, además de incrementar el intercambio meiótico y mitótico (Baldev 1977). Fue utilizado durante el proceso de verificación por ser un agente alquilante productor de rupturas cromatídicas, evidentes después de los procesos de lisis, denaturación y electroforesis, llevados a cabo en el ensayo cometa.

De los resultados obtenidos, es posible afirmar que la medida cualitativa de daño (Tabla 2.) concuerda con las medidas cuantitativas referentes a la longitud de cola y al momento de cola (Tabla 3.), en donde se observó mayor grado de daño en los cometas a la dosis de 0,33 μ g/ml y menor grado de daño en la dosis de 0,16 μ g/ml, quedando la dosis de 0,65 μ g/ml en un grado intermedio. A diferencia de lo anterior el porcentaje de ADN en cola aumentó a medida que se

incrementó la dosis, aunque es de destacar que entre las dosis de 0,33 μ g/ml y 0,65 μ g/ml, el daño no se acrecentó considerablemente.

También es importante destacar que la longitud de cola y el porcentaje de ADN en cola son medidas independientes la una de la otra, ya que como se puede ver en la figura 7A, aún cuando entre las dosis de 0,33 μ g/ml y 0,65 μ g/ml disminuye el largo de cola, aumenta el porcentaje de ADN en esta.

A nivel general es posible concluir que el daño causado por la acción de la Mitomicina es dependiente de la concentración en la cual ésta se encuentre en un medio celular, pues es mayor el porcentaje de ADN que migra de la cabeza hacia la cola cuando se aumenta la concentración. Las dosis de 0,33 μ g/ml y 0,65 μ g/ml manejadas en el ensayo tuvieron diferencias significativas para $P < 0.05$ en las tres medidas cuantitativas evaluadas (Tabla 3.). Por el contrario la menor dosis estudiada está más relacionada con el tratamiento control.

Los resultados positivos del ensayo confirman lo ya planteado por Rojas *et al.* (1999) en su revisión acerca de estudios genotóxicos en los que se aplicó el ensayo cometa como método diagnóstico. Aunque es de mencionar, que en estos mismos estudios se desarrolló la técnica del cometa en células de sangre periférica de ratones y líneas celulares de murinos, en donde ya se ha comprobado la inducción de carcinogénesis por mitomicina. En otros estudios de genotoxicidad diferentes al ensayo cometa también se ha evidenciado el poder de la mitomicina para ocasionar lesiones en el ADN de varios modelos biológicos dentro de los que se encuentran los bivalvos, para los que se reporta un incremento en la frecuencia de micronúcleos a partir de las 48 horas de exposición (Sotil 2007).

Aunque es bastante conocida la capacidad de la mitomicina para incrementar el intercambio de cromátides hermanas y el número de aberraciones cromosómicas, existen pocos estudios en los que se publiquen resultados positivos para el ensayo cometa. Ejemplo de esto, se encuentra en el trabajo llevado a cabo por Henderson *et al.* (1998) en el que incluso cuando se trabaja con una viabilidad celular de aproximadamente el 70%, no se presentan diferencias significativas para las dosis trabajadas. Cabe anotar también que las dosis trabajadas para mitomicina por Henderson *et al.* (1998) son mayores a las empleadas en este trabajo. Posiblemente la razón por la cual en este

ensayo se obtuvieron resultados positivos, radica en que a diferencia de Henderson *et al.* (1998) la mitomicina se dejó actuar por 48 horas en lugar de 30 minutos y a 37°C en vez de a 4°C, lo que nos asegura una mayor penetración en la célula y una mayor probabilidad de contacto con el ADN; puesto que la mitomicina no es un agente de efecto inmediato como algunos otros genotóxicos.

La temperatura empleada en este ensayo es un punto de discusión adicional, debido a que aunque a 37°C se presenta una mayor posibilidad de penetración de la mitomicina al interior celular, y por tanto se aumenta la posibilidad de contacto con el ADN, a 37°C está comprobado que las células pueden llevar a cabo una mejor y más rápida reparación de los daños inducidos en el material genético, independientemente del agente causante del daño (Cossio *et al.* 2004). Con lo cual también es posible concluir que aunque en este ensayo se evidenció daño significativo, es probable que los mecanismos de reparación hayan disminuido el daño neto ocasionado. Se recomienda para próximos estudios con mitomicina evaluar el tiempo mínimo al que la penetración celular es máxima u óptima, para disminuir el error experimental por reparación.

Por último, en este ensayo a diferencia de otras pruebas de genotoxicidad no se llevó a cabo un cultivo celular de linfocitos, pues a diferencia de otras técnicas, el ensayo cometa no necesita la replicación del ADN y posterior división celular para que el daño se manifieste. En el ensayo cometa las rupturas cromatídicas causadas por la mitomicina, quedan expuestas al descondensarse el ADN en la denaturación y migran más rápido hacia el ánodo durante la electroforesis, formando la cola.

Ensayo con Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es un compuesto químico conocido ampliamente por su poder oxidante. En el material genético produce alteraciones que se expresan a manera de rupturas de cadena sencilla y doble, además de modificaciones de bases sensibles al álcali (Marnett 1987). La inestabilidad que causa el peróxido de hidrógeno en el ADN es generada por la formación del radical OH (Fairbairn *et al.* 1995), el cual está considerado como la principal especie derivada del oxígeno que contribuye a la oxidación endógena a nivel celular.

Aunque la exposición al H_2O_2 también puede dar origen a reacciones en cadena en donde se forman diferentes intermediarios reactivos, son las rupturas de cadena sencilla, de cadena doble y los sitios sensibles al álcali, los puntos de interés por la sensibilidad de la versión alcalina del ensayo cometa (Cossio *et al.* 2004).

Se escogió el peróxido de hidrogeno para la verificación de la estandarización llevada a cabo, pues es un compuesto altamente utilizado como control positivo en estudios de genotoxicidad dentro de los que se encuentra el ensayo cometa (Sotil *et al.* 2007, Soler *et al.* 2008) y además, es bien conocido su efecto en linfocitos humanos, monocitos, fibroblastos neonatales humanos, hepatocitos, sangre periférica humana y líneas celulares de mamíferos roedores (Rojas *et al.* 1999).

Por los resultados obtenidos se puede establecer que la medida cualitativa de daño evaluada (Tabla 2.) corresponde en su totalidad con las tres medidas cuantitativas de daño estudiadas (Tabla 3.). Se aprecia un efecto dosis dependiente, en donde a medida que se incrementa la concentración varía de forma creciente el daño. Entre las dosis 0,249M y 0,499M el porcentaje de ADN en cola es prácticamente el mismo, sin embargo la longitud de cola se incrementa notablemente (Figura 7B.). Esto permite plantear que la misma cantidad de ADN, se encuentra más afectada a una concentración más alta, lo que se evidencia en fragmentos más pequeños que migran más rápido que la cabeza del cometa y por tanto recorren una mayor longitud hacia el polo positivo, formando la cola.

Las tres dosis de concentración de peróxido de hidrogeno estudiadas en el ensayo presentaron diferencias significativas con el tratamiento control para $P < 0.05$, por lo que se concluye que los resultados de esta verificación son positivos.

Las concentraciones de peróxido de hidrogeno aplicadas en este ensayo se tomaron del trabajo realizado por Henderson *et al.* (1998), quienes reportan daño, citando medidas como la longitud de cola y el momento de cola. A diferencia de Henderson *et al.* (1998), los valores de los momentos de cola y de las longitud de cola obtenidos en el presente ensayo son más altos. Esto pudo deberse a que en este ensayo se dejó actuar el H_2O_2 por una hora en lugar de 30 minutos y además se evaluó el daño en sangre periférica en lugar de en línea celular de linfoblastos. La

diferencia entre evaluar linfocitos de sangre periférica y línea celular de linfoblastos, es que estos últimos tienen capacidad de división y por lo tanto están activas las enzimas que participan en los mecanismos de reparación celular (O'Donovan 1995), incluso en muestras que permanecen a 4°C (Cossio *et al.* 2004).

Adicionalmente, en este ensayo se presentó una alta heterogeneidad entre los cometas expuestos a una misma dosis, lo cual se refleja en el valor de las desviaciones estándar de cada concentración por medida cuantitativa examinada (Tabla 3.). En la Tabla 2 también es posible observar que para las tres dosis evaluadas, se encontraron al menos entre uno y dos cometas por grado de daño, en una escala de 1 a 5. Esta particularidad posiblemente tiene origen en que los leucocitos en sangre periférica se encuentran en diferentes tiempos de vida, por lo que es más probable que el daño ocasionado afecte en mayor proporción a las células senescentes o viejas, que a las células más jóvenes (Ramana 1998).

Ensayo con Rayos X

Los rayos X son un agente físico muy conocido por su poder ionizante. A nivel genético puede llegar a producir mutaciones precursoras de cáncer, esterilidad e incluso teratogénesis. Esto ocurre debido a que es un clastógeno físico capaz de inducir rupturas de cadena doble en las hebras de ADN y rupturas a nivel cromosómico (He *et al.* 2000). Fue usado dentro de los ensayos de verificación por su conocida acción en células humanas tales como linfocitos, fibroblastos neonatales, células sexuales, sangre periférica, entre otras líneas celulares humanas y animales (Fairbairn *et al.* 1995, Rojas *et al.* 1999).

En este ensayo la medida cualitativa analizada (Tabla 2.) coincide con las tres medidas cuantitativas obtenidas (Tabla 3.), para las que se observa un efecto de dosis- respuesta, con mayor daño a mayor exposición a la radiación. Sin embargo, es de destacar que en el análisis visual (cualitativo) se evidenció una menor compactación de las cabezas de los cometas al incrementar la radiación, aun cuando la medida del porcentaje de ADN en cola no presenta diferencias grandes entre las dosis. Situación similar se muestra en la Figura 7C entre las medidas de longitud de cola y porcentaje de ADN, en donde se puede observar que aun cuando el largo de

la cola muestra diferencias marcadas, el porcentaje de ADN en esta no cambia representativamente.

En la figura 7C la curva que representa la longitud de cola presenta dos pendientes pronunciadas, la primera de ellas entre los 0 Rad y 300 Rad, y la segunda, aún más creciente que la primera entre los 600 Rad y 900 Rad. Entre los 300 Rad y los 600 Rad la curva es creciente pero posee una pendiente ligeramente plana. El patrón de la curva observado en nuestro ensayo es consecuente con la curva obtenida por He *et al.* (2000) para individuos de sexo masculino, haciéndose importante resaltar que la muestra con la que se realizó este ensayo también fue masculina. Se debe aclarar sin embargo, que aunque la tendencia de las curvas para radiación X de ambos trabajos poseen una similitud cercana, He *et al.* (2000) a diferencia de este ensayo trabajó con dosis menores de radiación X y obtuvo medidas de la longitud de cola en μm en vez de px (pixel)⁵.

Las tres dosis trabajadas en el ensayo mostraron diferencias significativas para $P < 0.01$ en las tres medidas analizadas, con lo cual se concluye que el ensayo obtuvo resultados positivos, y los tratamientos con exposición a radiación presentaron diferencias contundentes en relación con el control negativo.

Es fundamental mencionar otros tres puntos característicos de este ensayo evaluados de manera cualitativa mediante el análisis visual. El primer punto hace referencia a la distribución intercelular homogénea del daño causado por la radiación X en cada dosis, es decir la baja heterogeneidad entre los cometas de un mismo tratamiento, entre los cuales se apreció un daño con pautas iguales o parecidas. De ninguna manera, esto excluye la posibilidad de encontrar en un mismo tratamiento cometas con grados de daño diferentes a la mayoría. Lo anterior permite suponer que los rayos X son un agente de daño con distribución uniforme.

El segundo punto es para resaltar la disminución de células encontradas por campo microscópico en las muestras de las diferentes dosis, en contraste con el tratamiento control. Por esta

⁵ Unidad de medida relativa.

observación se puede inferir que el daño proporcionado a la sangre por radiación para las dosis evaluadas es bastante agresivo y se refleja en la baja densidad celular (Di Giorgio *et al.* 2001).

El tercer punto, consiste en el gran número de células apoptóticas o cercanas a la apoptosis evidenciadas en este ensayo, en donde la cabeza del cometa casi que no presenta compactación alguna, y está tan fragmentada como la cola, que en estos casos es bastante extensa. Para este tipo de cometas la fluorescencia observada no se nota con especialidad en ningún punto, sino que por el contrario es uniforme y dispersa en toda el área. Está claro que este fenómeno se manifiesta por el desencadenamiento de un mecanismo radioinducido (Di Giorgio *et al.* 2001).

Es importante resaltar que al comparar las dosis evaluadas en este ensayo, expuestas a radiación X, con las mismas dosis expuestas a rayos γ (gamma) en el trabajo publicado por Güerci *et al.* (2006), es posible comprobar que la respuesta al daño por radiación X es mucho menor que el efecto apreciado por la exposición a rayos gamma.

Se sugiere que para próximos estudios de genotoxicidad dedicados a la Radiación X, se evalúen más individuos, para descartar el error experimental que se pueda llegar a producir por radiosensibilidad individual.

8.3. Protocolo Final

El protocolo final se estableció al finalizar las fases de estandarización y verificación. Con la fase de estandarización se obtuvo principalmente la caracterización de cada una de las etapas del ensayo cometa, las mejoras y precauciones dentro del proceso. La fase de verificación permitió asegurar que los pasos estandarizados eran correctos, al comprobar satisfactoriamente los resultados del efecto de los agentes genotóxicos analizados con las publicaciones encontradas.

9. CONCLUSIONES

Los tiempos establecidos, los reactivos y la forma en la que se llevaron a cabo los procesos de estandarización de cada una de las etapas del ensayo cometa, permitieron establecer el desarrollo adecuado de la técnica para la obtención de resultados verídicos, en los que no se aprecia el efecto negativo de ninguna de las variables examinadas.

En los tres ensayos de verificación llevados a cabo, se evidenció un comportamiento de dosis – efecto, con una escala de menor a mayor daño en el siguiente orden: mitomicina, peróxido de hidrógeno y radiación X. Esta escala de daño está íntimamente ligada a las propiedades intrínsecas de cada agente genotóxico evaluado.

De las medidas evaluadas en la fase de verificación, el porcentaje de ADN en cola fue la medida más rigurosa, puesto que se debió trabajar con un filtro de fluorescencia de mayor excitación para obtener datos más cercanos al daño real, que se evidenció por la escala cualitativa o por el dato cuantitativo de otras variables.

Al finalizar los procesos de verificación, se estableció la escala cualitativa de daño que se apreció en el desarrollo de este trabajo, tal y como se muestra en la figura 8 de los resultados. La escala se divide en 5 niveles partiendo del daño escaso o nulo (A) hasta el daño total (E).

Debido a que los ensayos llevados a cabo se realizaron en sangre entera o células en suspensión, el daño evidenciado en los leucocitos está posiblemente mermado por el efecto protector del plasma, en contraste con el daño que es posible demostrar cuando se trabaja con linfocitos aislados o líneas celulares.

La estandarización realizada del ensayo cometa se comprobó satisfactoriamente al comparar los resultados obtenidos en el proceso de verificación con las publicaciones existentes para cada uno de los tres agentes genotóxicos evaluados.

10. RECOMENDACIONES

Para posteriores ensayos de genotoxicidad se sugiere realizar pruebas de viabilidad celular, con el fin de disminuir el error experimental de diagnosticar un resultado falso positivo por citotoxicidad.

11. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aitken R, De Iuliis G, McLachlan R. 2008. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology* 32:46–56.
- Arencibia D, Rosario L. 2009. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*. *Revista de toxicología en línea* 20:24-41.
- Bajpayee M, Kumar A, Parmar D, Mathur N, Seth P, Dhawan A. 2005. Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: a study in healthy Indian females. *Mutation Research* 565:163–172.
- Baldev K. 1977. Genetic toxicology of mitomycin C, actinomycins, daunomycin and adriamycin. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Volume 39, Issue 2: 189-238.
- Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. 2009. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research* 681:51–67.
- Chavéz M. 2006. Aplicación de técnicas de citogenética molecular para la detección de aneuploidía y clastogenicidad en células humanas expuestas a arsénico. Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Ciencias. Departamento de Genética y de Microbiología. Sitio web: <<http://www.recercat.net/bitstream/2072/10356/1/Tesina+Magaly+J+Chavez.pdf>>. Consulta: 1 de Noviembre de 2010.
- Collins A, Dusinska M, Horvathova E, Munro E, Savio M, Stetina R. 2001. Inter – individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. *Mutagenesis* 16:297–301.
- Collins A, Duthie S, Dobson V. 1993. Direct enzymic of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735.
- Collins AR, AG Ma, SJ Dunthie. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*, 336:69–77.
- Cossio M, Gonzalez Y, García J, Prieto E. 2004. Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas. *Acta Farm. Bonaerense* 23(3):277-84.
- Di Giorgio M, Taja M, Nasazzi N, Bustos N, Cavalieri H, Bolgiani A. 2001. El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones

fuertemente localizadas. Memorias del 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety. Recife, Brasil, 29 abril al 4 mayo.

Dusinská M, Collins A. 1996. Detection of oxidized purines and UV – induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion – specific enzymes in the comet assay. *ATLA, Altern Lab Anim* 24:405–411.

Ejchart A, Sadlej N. 2003. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutation Research* 534:85–92.

Fairbairn D, Olive P, O’Neill K. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339:37-59.

Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker R, Mann M, Mersch V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research* 566:209–229.

Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681:80–92.

Glei M, Hovhannisyán G, Pool B. 2009. Use of Comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research* 681:33–43.

Goldberg M. 2008. In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Invest* 12:1–8.

Güerci A, Zúñiga L, Dauder R. 2006. El valor predictivo del ensayo cometa en la evaluación de la radiosensibilidad individual en sangre periférica. *Theoria* 15(2):41-52.

Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. 2003. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research* 536:27–38.

He J, Chen W, Jin L, Jin H. 2000. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutation Research* 469:223–231.

Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S. 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13(1):89-94.

Horváthová E, Dusinská M, Shaposhnikov S, Collins A. 2004. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. *Mutagenesis* 19:269–276.

- Hwang E, Bowen P. 2007. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement and Modulation by Diet and Environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47:27–50.
- Jiménez M, Martínez V. 2000. Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Rev Biomed* 11:161-168.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research* 363:89-96.
- Kobayashi H, Sugiyama C, Morikawa Y, Hayashi M, Sufuni T. 1995. Comparison between manual microscopic análisis and computerized image analysis in single gel cell electrophoresis assay. *MMS Commun* 3:103–115.
- Liao W, McNutt M, Zhu W. 2009. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48:46–53.
- Machado A, Lima P, Alves R, Rodríguez R. 2009. Evaluation of Genotoxic Effects of Xenobiotics in Fishes Using Comet Assay—A Review. *Reviews in Fisheries Science* 17(2):170–173.
- Marnett L. 1987. Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis* 8(10):1365-1373.
- Moller P. 2006. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutation Research* 612:84–104.
- Monroy C, Cortés A, Sicard D, Groot H. 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica* 25:335-45.
- Mudry M, Carballo M. 2006. Genética Toxicológica. De los Cuatro Vientos Editorial. Primera Edición. Buenos Aires.
- O'Donovan M, Johns S, Wilcox P. 1995. The effect of PHA stimulation on lymphocyte subpopulations in whole-blood cultures. *Mutagenesis* 10(4):371-374.
- Olive P, Banath J. 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA cross linking agent. *Exp Cell Res* 221:19–26.
- Olive P, Banath J, Durand R, Natl J. 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *Cancer Inst* 82:779–783.
- Ostling O, Johanson K. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123:291–298.

- Palchaudhuri R, Hergenrother P. 2007. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology* 18:497–503.
- Pfuhler S, Wolf H. 1996. Detection of DNA – crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* 27:196–201.
- Prieto E, Llopiz N. 1999. Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa). *Rev Cubana Invest Biomed* 18(1):34-6.
- Ramana C, Boldogh I, Izumi T, Mitra S. 1998. Activation of apurinicapyrimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci* 95:5061–5066.
- Ritter D, Knebel J. 2009. Genotoxicity testing in vitro – Development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro* 23:1570–1575.
- Rojas E, Lopez M, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B* 722:225–254.
- Santos S, Singh N, Natarajan A. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* 232:407–411.
- Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider E. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- Soler W, Velásquez N, Miranda L, Zuluaga D. 2005. Ausencia de genotoxicidad del agua de mar de Coveñas: estudio in vitro en eritrocitos y leucocitos humanos: *Revista de la Facultad Nacional de Salud Pública* 23(2).
- Soler W, Velásquez N, Soler J. 2008. Baja genotoxicidad de extracto orgánico de agua de mar de Coveñas (Sucre, Colombia). *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 15(1):96-102.
- Sorsa M. 1998. Sustancias Químicas Genotóxicas. Control Biológico: herramientas y enfoques. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* 27.15-27.20.
- Sotil G, Alvis R, Francia J, Shiga B. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev peru biol* 13(3):249–253 (Julio).
- Speit G, Schütz P. 2008. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation Research* 655:22–27.

- Speit G, Vasquez M, Hartmann A. 2009. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mutation Research* 681:3–12.
- Speit G, Witton T, Heepchantree W, Trenz K., Hoffmann H. 2003. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research* 542:33–42.
- Spivak G, Cox R, Hanawalt P. 2009. New applications of the Comet assay: Comet–FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutation Research* 681:44–50.
- Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, Sasaki Y. 2000. Single cell gel/comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221.
- Tice R, Vasquez M. 1999. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells.
- Urrego R, Pareja A, Vásquez N, Márquez M. 2005. El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 18:3.
- Valverde M, Rojas E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 681:93–109.
- Zúñiga L. 2009. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis.

12. ANEXOS

ANEXO 1.

INSTRUCTIVO DE LABORATORIO: ENSAYO COMETA VERSIÓN ALCALINA

Objetivo

Visualizar el daño ocasionado al ADN por acción de un determinado genotóxico.

Reactivos

- Agarosa de punto de fusión normal 1%.
- Agarosa de bajo punto de fusión 0.5%.
- Buffer de lisis (NaCl 2.5M, EDTA 100Mm, Trizma base 10Mm, DMSO 10% y Tritón X-100 1%; Ph 10).
- Buffer de electroforesis y denaturación (300 Mm NaOH y 1 Mm EDTA; Ph > 13).
- Buffer de Neutralización (Trizma base 0.4 M).
- Bromuro de etidio 1X.

Materiales

- Bandeja de plástico o aluminio
- Cubreobjetos (Laminillas)
- Gasa
- Jarras Coplin
- Micropipetas
- Pinzas
- Pipetas plásticas
- Portaobjetos (Láminas)
- Puntas para micropipeta

Material biológico

Sangre entera o células en suspensión.

Equipos

- Cabina de extracción
- Cabina de flujo laminar
- Cámara de electroforesis
- Horno de 60°C
- Horno microondas
- Microscopio de fluorescencia
- Nevera
- Software

Procedimiento

1. Las laminas o portaobjetos que ya han pasado por el protocolo de limpieza deben pulirse fuertemente con una gasa y marcarse en la parte inferior con la nomenclatura manejada para el estudio.
2. Trasladar las láminas a la plancha del horno de 60°C durante 15 minutos. Ingresar la agarosa de bajo punto de fusión al horno de 60°C 15 minutos antes que las láminas.
3. Faltando 5 minutos para cumplirse el tiempo del paso 2, desgelificar la agarosa de punto de fusión normal con ayuda de un microondas. La desgelificación se consigue en aproximadamente un minuto.
4. Cubrir cada lámina con 150µl de agarosa de punto de fusión normal. La agarosa se debe aplicar directamente en las láminas sobre la plancha de 60°C y distribuir de manera uniforme con ayuda de otro portaobjetos (adicional al del estudio y disponible para este propósito). Si queda algún exceso de agarosa limpiar los bordes con una gasa.
5. Las láminas recubiertas por la primera capa de agarosa deben permanecer en el horno a 60°C por 20 minutos, tiempo en el cual se logra una deshidratación adecuada para fijar y adherir el gel al vidrio.
6. Trasladar las láminas y la agarosa de bajo punto de fusión a la cabina de flujo laminar. Dejar enfriar la agarosa de bajo punto de fusión hasta 37°C.
7. Agregar por cada lámina en un eppendorf 80µl de agarosa de bajo punto de fusión y 5µl de sangre entera. La mezcla de la agarosa y la sangre se realiza con puntas cortadas para micropipeta, evitando así ocasionar un daño mecánico en las células.

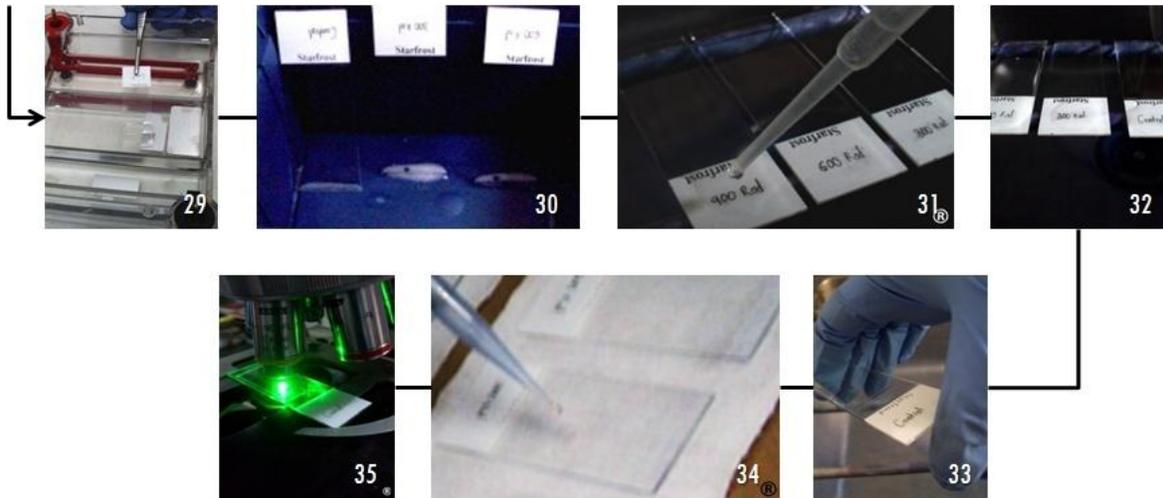
8. Depositar la mezcla de la agarosa y la sangre en cada lámina e inmediatamente cubrir con una laminilla o cubreobjeto.
9. Llevar las láminas a la nevera a 4°C por 10 minutos para permitir la solidificación de la segunda capa del preparado.
10. Pasados los 10 minutos, retirar la laminilla de cada lámina cuidando no alterar los geles.
11. Sumergir las láminas en un coplin opaco con buffer de lisis por 17 horas a 4°C. El buffer de lisis debe permanecer siempre en refrigeración, de no ser así debe enfriarse 30 minutos antes de su uso.
12. Finalizada la lisis, se debe transportar el Coplin a la zona de denaturación y electroforesis, en un cuarto oscuro. Sacar cada lámina del coplin, escurrir y limpiar el reverso con una gasa. Se debe tener mucho cuidado al limpiar el reverso, es vital saber con seguridad en qué lado de la lámina se encuentran los geles. Desde este paso en adelante las láminas deben ser protegidas de la luz, pues el ADN está expuesto y se debe evitar un daño adicional, al que se pretende evaluar, por efecto de la luz UV.
13. Colocar las láminas en una cámara de electroforesis horizontal y agregar el buffer de denaturación y electroforesis con mucho cuidado por las partes laterales. Cuando las laminas están recubiertas por aproximadamente 5mm de la solución, se dejan en reposo alcalino por 20 minutos.
14. Pasados los 20 minutos se realiza la electroforesis con el mismo buffer del paso anterior por 15 minutos a 25V y 300Ma. Si las láminas a estudiar no abarcan todo el ancho de la cámara, se deben llenar los espacios con otros portaobjetos limpios para asegurar el paso homogéneo de la corriente. Así mismo es fundamental que las láminas queden apenas cubiertas por la solución de denaturación y electroforesis, como ya se especificó en el paso anterior, con el fin de que no haya escape de la corriente por el buffer en vez de los geles.
15. Pasados los 15 minutos, sacar las láminas con mucho cuidado de la cámara electroforética y guardarlas en un estuche plástico protegido de la luz, para que se escurran los restos del buffer de denaturación y electroforesis.
16. Colocar las láminas sobre soportes metálicos y adicionar a cada una 2ml del buffer de neutralización durante 5 minutos. Este paso se realiza tres veces. Entre lavado y lavado se invierte con mucho cuidado cada lámina para eliminar la solución y volver a aplicarla.

17. Después de los procesos de lavado ingresar las láminas al estuche plástico cubierto de la luz.
Dejar escurrir las láminas por aproximadamente 3 horas.
18. Si el análisis no se lleva a cabo el mismo día de culminado el protocolo deshidratar las laminas con 5ml de metanol 100% frio y guardar en cajas plásticas cubiertas de la luz bajo refrigeración, al momento de ser requerido el análisis continuar con el paso 19. Si el análisis se efectúa el mismo día se continúa después de tres horas con el proceso de tinción.
19. Cuando las laminas estén secas, aplicar sobre cada una 40 μ l de bromuro de etidio 1X, cubrir el gel con una laminilla, secar los excesos y proceder a la observación en el microscopio de fluorescencia. Este paso debe hacerse con sumo cuidado y preferiblemente con doble guante de nitrilo para evitar el contacto con el bromuro.
20. Observar las láminas al microscopio de fluorescencia con un objetivo de 20X o más. Establecer el área en la que se desea realizar el análisis cualitativo o tomar la foto para el posterior análisis cuantitativo.
21. Si el análisis será cuantitativo evaluar las medidas de longitud de cola, porcentaje de ADN y momento de cola.

ANEXO 2.

INSTRUCTIVO VISUAL DEL ENSAYO COMETA VERSIÓN ALCALINA





Nota: El número de pasos mostrados en el instructivo visual no corresponde de forma exacta con los pasos enunciados en el Anexo 1.