

Algunas consideraciones sobre el desarrollo de la técnica para el ensayo cometa in vivo en leucocitos de sangre periférica y células del hígado.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{}**

^{*}Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

^{**}Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Teléfono: 057(2716911). Correspondencia a: Daniel Francisco Arencibia Arrebola

E-mail: darencibia@finlay.edu.cu

Resumen

En 1988, Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual. Este artículo tuvo como objetivo proporcionarles a los investigadores que trabajan realizando evaluaciones genotóxicas algunas consideraciones sobre la técnica experimental del ensayo cometa a partir de leucocitos de sangre periférica y células del hígado. Tuvimos en cuenta para cada procedimiento las soluciones a preparar, el procedimiento experimental y evaluación.

Palabras clave: Ensayo cometa *in vivo*, técnicas, leucocitos de sangre periférica, células del hígado.

Abstract

Some considerations about the development of technique for the in vivo comet assay in leukocytes of peripheral blood and liver cells.

In 1988, Singh and collaborators developed the alkaline variant of the individual cells electrophoresis (comet assay), providing for the first time the data at level of individual cell. This article had as objective to provide of the researchers that they work carrying out the genotoxic evaluations some considerations about the experimental technique of the comet assay starting from leukocytes of peripheral blood and liver cells. We kept in mind for each procedure the solutions to prepare, experimental procedure and evaluation.

Key words: *in vivo* comet assay, technique, leukocytes of peripheral blood, liver cells.

Introducción

En 1988, Singh y colaboradores desarrollaron la variante alcalina de la electroforesis de células individuales (ensayo cometa), proporcionando por primera vez datos a nivel de célula individual.

Las rupturas de simple cadena y la formación de sitios lábiles al álcali en el ADN han sido parámetros ampliamente utilizados para la detección de genotoxicidad y han sido demostradas sus implicaciones en enfermedades degenerativas, el cáncer, y vinculadas al estrés oxidativo.¹

El ensayo cometa consiste en embeber las células en agarosa de bajo punto de fusión para formar un microgel, someterlas a lisis para remover todas las proteínas celulares y permitir el posterior desenrollamiento² por la interrupción de los enlaces por puentes de hidrógeno entre las dobles cadenas del ADN bajo condiciones alcalina/neutras.^{3, 4}

Al someter al ADN desenrollado a una electroforesis en tampón alcalino, los fragmentos negativamente cargados de ADN o cromatina relajada migran fuera del núcleo en dirección al ánodo⁵ para formar un halo,² apreciándose una estructura parecida a la de un cometa⁶ al teñir el ADN luego de la electroforesis. Las células con un aumento de su ADN dañado muestran un incremento de la migración microsomal del ADN⁷ siendo los rompimientos de doble cadena los causantes de mayor frecuencia de migración del material genético.

Por otra parte las células controles tienen un bajo número de roturas, estas exhiben cometas de nivel 0 de acuerdo con la clasificación del grado de daño al ADN, es estas células el ADN tiene cierta migración,⁸ encontrándose un 10% de este en la cola. Para detectar y cuantificar el daño al ADN este puede ser teñido con diferentes agentes como el nitrato de plata siendo mas frecuentemente usados los agentes fluorescentes.

Este artículo tuvo como objetivo proporcionarles a los investigadores que trabajan genotoxicidad algunas consideraciones sobre la técnica experimental del ensayo cometa a partir de leucocitos de sangre periférica y células del hígado.

Desarrollo

Estos primeros procedimientos son válidos para ambos tipos de técnicas:

-Selección los niveles de dosis, sexo, momento del sacrificio, vía de administración y tamaño de los grupos experimentales.

- Los criterios para la selección de las dosis se basa en los valores de la LD50 encontrados. El mayor nivel de dosis debe demostrar cierta toxicidad. A partir de este nivel se deben incluir al menos otros dos inferiores para tratar de demostrar la existencia de un efecto relacionado con las dosis. Cuando no sea determinada la LD50 ó estudios precedentes en este ensayo no den positividad se recomienda utilizar las dosis máximas recomendadas para este ensayo (2 000 mg/kg/día para tratamientos de hasta 14 días y 1 000 mg/kg/día para tratamientos de más de 14 días). Si hay evidencias de que la sustancia no es tóxica se puede emplear un solo nivel de dosis (la máxima).

- Ambos sexos pueden ser utilizados en los ensayos con el objetivo de detectar posibles diferencias sexo específicas en la respuesta al agente, no menos de cinco animales por grupo pueden ser utilizados.

- Se realizarán catorce administraciones separadas 24 horas por la vía que resulte común a la que será utilizada en humanos. Debe incluirse además la vía intraperitoneal como aquella que no presenta factores modificadores del compuesto.

- Se formarán tres grupos de la sustancia de ensayo (tres niveles de dosis), es necesario incluir un grupo control de vehículo por la misma vía y se acepta como control positivo la utilización de sustancias de referencias las cuales pueden ser administradas por una vía diferente, priorizar sobre todo la bleomicina o la ciclofosfamida, también es posible utilizar los datos históricos del laboratorio.

1. Electroforesis alcalina de células individuales de leucocitos de sangre periférica.

Objetivo: Determinar si la sustancia de prueba produce aumento ó disminución de las rupturas de simple cadena y sitios abásicos en el ADN de los leucocitos de sangre periférica como criterio de genotoxicidad, mediante la electroforesis alcalina de células individuales.²

- Soluciones.⁹

-Solución de agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.5 %.

-Solución de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 0.5 %.

-Solución de lisis celular (NaCl+HCL+ EDTA (Na₂) + Tritón × 100 + DMSO + NaOH + Tris).

-Solución tampón de electroforesis (EDTA (Na₂) + NaOH + HCL).

-Solución tampón de neutralización (Tris + NaOH + HCL).

- Procedimiento experimental.

1. Prepare las soluciones previamente.

2. Rotule las láminas a razón de 2/muestra.

3. Añada APFN al 0.5% sobre las ¾ partes de la lámina.¹⁰

4. Deje secar a temperatura ambiente.

5. A partir de este paso trabaje bajo luz atenuada para evitar el daño adicional al ADN.

6. Tome 10 µL de sangre periférica y resuspéndala en 150 µL de ABPF al 0.5% en un tubo eppendorf.¹¹

7. Extender a partes iguales en las ¾ partes de dos láminas previamente preparadas con APFN al 0.5% colocando un cubreobjetos y dejar solidificar a 4°C durante 5 minutos.

8. Retire con mucho cuidado los cubreobjetos.

9. Introduzca las láminas en un vaso porta-láminas, con 50 mL de solución de lisis fría por 1 hora como mínimo. Mantener a 4°C.

10. Coloque las láminas en la cámara de electroforesis con cantidad suficiente de tampón de electroforesis para cubrir las láminas, a 4°C por 20 minutos exactos.¹²

11. Transcurrido este tiempo escoja el campo eléctrico que va a emplear (0.8-1.25 V/cm), fíjelo y ajuste el amperaje a 300 mA regulando el volumen de tampón a utilizar.

12. Mantenga las condiciones de corrida durante 20 minutos exactos.

13. Saque las láminas con una pinza y lave con cuidado cada lámina tres veces con tampón de neutralización a intervalos de 5 minutos.

14. Aclare las láminas con agua destilada y elimine el exceso de agua colocándolas en una incubadora por una 1 hora a 37° C.¹³

15. Para teñir utilizamos el método del nitrato de plata (carbonato de sodio + nitrato de plata + nitrato de amonio + ácido tungstosilícico + formaldehído con 37% de pureza).¹⁴

- Fije los geles a las láminas durante 10 minutos utilizando una solución fijadora de ácido tricloroacético/sulfato de Zinc/glicerol y carbonato de sodio. Use 50 mL para 10 microgeles, siendo recuperada esta solución, por lo general rinde de 4-6 fijaciones.
- Lave 1 vez con agua destilada y repita una o dos veces más con agua bidestilada.¹⁵
- Seque los geles a 37 °C durante 1 a 1 ½ horas.
- Prepare la solución de tinción el mismo día en que se va a teñir.
- Sumerja las láminas en la solución de tinción durante 35-40 minutos y protéjalas de la luz.
- Lave los geles cuidadosamente de 10 a 20 segundos, sumergiéndolos en agua bidestilada.¹⁶
- Sumerja las láminas durante 5 minutos en ácido acético al 1% para detener la tinción.
- Lave los geles sumergiéndolos y seguidamente sacándolos en agua destilada. Repita esta operación de 4 a 6 veces en agua.
- Drene los geles durante una hora a temperatura ambiente.
- Conserve en condiciones adecuadas para ser observados al microscopio óptico.

16. Para observar la lámina proceda según el método de sixa.¹⁷

17. La cuantificación del daño puede realizarse por dos métodos:

- Método 1. Se analizan 50 células por lámina y se les mide la longitud total de ADN migrado desde el comienzo del halo celular hasta los últimos 3 fragmentos de ADN perpendiculares a la dirección de migración (ver Figura 1) con una escala ocular.¹⁸ La variable a procesar es la longitud total de ADN migrado (LT). Al análisis estadístico las pruebas paramétricas más utilizadas son ANOVA y t-student, y de ser necesario una prueba no paramétrica por no cumplir tales supuestos se usa la U de Mann Whitney.
- Método 2. Se analizan 100 células por lámina y se clasifican por niveles de migración: ninguna, corta, media, larga y muy larga. A estos niveles se les dan valores numéricos (0, 1, 2, 3 y 4), ver figura 2.^{2,19}

Además a partir de ellos se analizan las unidades arbitrarias:

$$UA = 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4.$$

*TCG0= Total de células grado 0 (células no dañadas).

*TCG1= Total de células grado 1 (mínima frecuencia de lesiones en el ADN).

*TCG2= Total de células grado 2 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN).

*TCG3= Total de células grado 3 (daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN).

*TCG4= Total de células grado 4 (células totalmente dañadas con cometas visibles).

- Para el procesamiento estadístico se comparan las frecuencias de aparición de células en cada uno de los niveles empleando el test de Chi cuadrado o la U de Mann Whitney de reflejarse los resultados promedios en cada grupo de tratamiento analizado según el % existente en cada una de estas clasificaciones.

2. Electroforesis alcalina de células individuales de órganos sólidos.

Objetivo: Determinar si la sustancia de prueba produce aumento ó disminución de las rupturas de simple cadena y sitios abásicos en el ADN de células eucariotas *in vivo* como criterio de genotoxicidad, mediante la electroforesis alcalina de células individuales, en este caso de órganos sólidos.^{2, 20}

- Soluciones (igual que en la técnica anterior).⁹
- Procedimiento experimental.
 1. Rotule las láminas al menos 2/muestra.
 2. Añada APFN al 0.5% sobre las $\frac{3}{4}$ partes de la lámina.
 3. Deje secar a temperatura ambiente.
 4. A partir de este paso trabaje bajo luz atenuada para evitar el daño al ADN.
 5. Obtenga una sección del órgano escogido y colóquela con medio de cultivo de células (3 mL/g) a 4°C en un beaker.
 6. Procese las muestras simultáneamente por separado e incluya siempre órganos de animales tratados con un mutágeno de referencia (bleomicina, ciclofosfamida, etc).²⁰
 7. Córtelo en pequeños pedazos y obtenga una suspensión celular creando flujo con una pipeta automática.
 8. Deje reposar unos 10 segundos y extraiga 1 mL de esta suspensión.
 9. Añádala a un tubo eppendorf.

10. Tome 10 μL de esta suspensión y realice un conteo de células en un hemocitómetro. Si la concentración de células está por exceso fuera del rango de 1×10^6 - 5×10^6 células/mL añada cantidad suficiente de medio de cultivo para llegar a este rango de concentración. Si la concentración es menor repita desde el paso 4.²¹ En todas las muestras trabajadas se debe partir con la misma concentración celular.
11. Tome 10 μL de la suspensión celular (1×10^6 - 5×10^6 células/mL) y resuspéndala en 150 μL de ABPF al 0.5% en un tubo eppendorf.
12. Extender a partes iguales en las 3/4 partes de dos láminas previamente preparadas con APFN al 0.5% colocando un cubreobjetos y dejar solidificar a 4°C.²²
13. Retire con mucho cuidado los cubreobjetos.
14. Introduzca las láminas en un vaso porta-láminas, con 50 mL de solución de lisis fría por una hora como mínimo, trate que el vaso utilizado permita introducir la mayor cantidad de láminas posibles para ahorrar esta solución.
15. Coloque las láminas en la cámara de electroforesis con cantidad suficiente de tampón de electroforesis para cubrir las láminas, a 4°C por 20 minutos exactos.
16. Transcurrido este tiempo escoja el campo eléctrico que va a emplear (0.8-1.25 V/cm), fije el voltaje necesario y ajuste el amperaje a 300 mA regulando el volumen de tampón.
17. Mantenga las condiciones de corrida durante 20 minutos exactos.
18. Saque las láminas con una pinza y lave con cuidado cada lámina tres veces con tampón de neutralización a intervalos de 5 minutos.
19. Aclare las láminas con agua destilada y elimine el exceso de agua colocándolas en una incubadora por una hora a 37°C.¹³
20. Teñir con nitrato plata de la misma forma que en el procedimiento anterior.¹⁴
21. Para observar la lámina proceda según se indicó en el procedimiento anterior.
22. La cuantificación del daño es por los mismos métodos que en el procedimiento anterior según la figura 1 o 2.

Figura 1. Primera forma de conteo y análisis (longitud del halo).

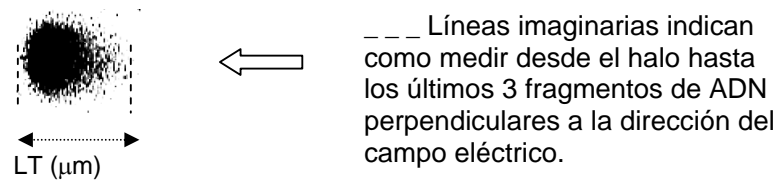
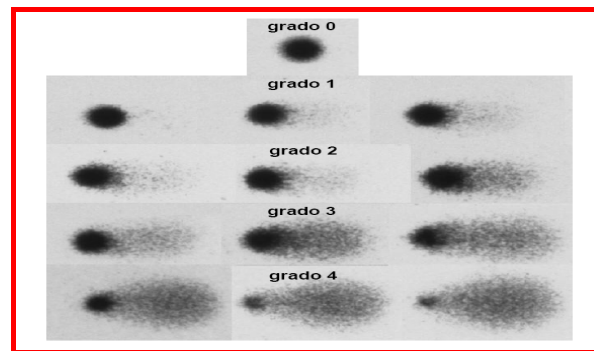


Figura 2. Segunda forma de conteo y análisis según la clasificación del grado de daño en el ADN.



Referencias Bibliográficas

1. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA Repair and Susceptibility to Cancer in Humans: an Epidemiologic Review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(11):874-897.
2. Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair. Principles. *Mol. Biotech* 2004; 26:249-261.
3. Lee R, Steinert S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in acuatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res* 2003; 544:43-64.
4. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206-221.
5. Nadin S, Vargas-Roig LM, Ciocca DR. A Silver Staining Method for Single-cell Gell Assay. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2001; 49(9):1183-1186.
6. Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 2003; 18(2):159-166.
7. Friauff W, Hartmann A, Suter W. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis* 2001; 16(2):133-137.
8. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 2003; 18(1):45-51.
9. Monroy C.M. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica* 2005; 25: 335-345.
10. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutat Res* 1997; 375:183-93.
11. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electroforetic technique for the detection of ADN damage and repair in individual cells. *Mutat Res* 1994; 271:243-52.
12. López N, Gutiérrez M, Cortés E, Zentella A, Konigsberg M. Daño al ADN y niveles de radicales libres en fibroblastos de ratones jóvenes y viejos. *Rev Cubana Invest Biomed* 2003; 22(2):107-116.
13. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988; 175:184-191.

14. Calderón L, Osnaya N, Ramirez L, Villareal A. DNA strand breaks in human nasal respiratory epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environ. Hlth. Persp* 1996; 104:160-168.
15. Tice RR. The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells, in: D.H. Phillips, S. Venitt (Eds.), *Environmental Mutagenesis*, Bios Scientific Publishers LTD, Oxford, UK; 1995.p.315-339.
16. Reinhardt P, McLean JR, Deslauriers Y, Gorman W, Cabat S, Rouabhia M. The use of silver-stained "comets" to visualize DNA damage and repair in normal and Xeroderma pigmentosum fibroblasts after exposure to simulated solar radiation. *Photochemistry and photobiology* 2000; 71(4):422-425.
17. Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Mutat. Res* 2003; 536:27-38.
18. Hartmann A, Schumacher M, Plappert-Helbig U, Lowe P, Suter W, Mueller L. Use of the alkaline in vivo comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 2004; 19:51-59.
19. Meintieres S, Nessler F, Pallardy M, Marzin D. Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure the apoptosis. *Envir. Mol. Mut* 2003, 41:260-269.
20. González JE, Gámez R, Rodeiro I, García H. Evaluación del efecto genotóxico del D-003 en ratas Sprague Dawley empleando la electroforesis alcalina de células individuales en gel (Ensayo Cometa). *Revista CENIC* 2004; 35(2):125-127.
21. Ueno S, Kashimoto T, Susa N, Natsume H, Toya M, Ito N. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. *Mutation Research* 2007; 634(1-2):135-145.
22. Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mut. Res* 2001; 497: 169-175.

Recibido: 27/01/10

Aceptado: 01/02/10