

DETERMINACIÓN DE 8-HIDROXIDEOXIGUANOSINA EN EL ADN MITOCONDRIAL POR PCR EN TIEMPO REAL

Hernández Ramírez María Guadalupe (1), Jorge Alejandro Alegría Torres (2)

1 [Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [mg.hernandezramirez@outlook.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [giorgio_alegretto@hotmail.com]

Resumen

Introducción. El estrés oxidativo daña al ADN por la oxidación de la base guanina y la subsecuente formación de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG). Debido a que el genoma mitocondrial no cuenta con los sistemas de reparación del ADN nuclear, el ADN mitocondrial (ADNmt) es más susceptible a sufrir daños los cuales se asocian al riesgo de desarrollar enfermedades como la diabetes y el cáncer.

Materiales y métodos. A partir de una genoteca de niños de Salamanca, se estandarizó el método para la determinación de 8-OHdG el cual se llevó a cabo mediante la amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial utilizando los oligos MTF3212 y MTR3319 en muestras tratadas y no tratadas con la enzima reparadora 8-oxoguanina ADN glicosilasa de humanos (hOGG1), la cual remueve los residuos de 8-OHdG retardando los ciclos de amplificación (Cq); este valor de diferencia entre los Cq se definió como Delta Cq. **Resultados.** Se amplificó un fragmento de ADN mitocondrial con los oligos utilizados, MTF3212 y MTR3319; y el valor de Cq mostró un decremento después de tratar el ADN con la enzima hOGG1 a diferentes concentraciones (1 – 10 U por reacción; $P < 0.05$). Las muestras se trataron por triplicado aceptando solo aquellos promedios de Cq cuyos coeficientes de variación (C.V.) fueran menores al 1 %. **Conclusiones.** La 8-hidroxideoxiguanosina es un biomarcador del estrés oxidativo que puede ser cuantificado por qPCR permitiendo reconocer este impacto a nivel del genoma mitocondrial.

Abstract

Introduction. Oxidative stress DNA damage induces the formation of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG). The mitochondrial genome doesn't have repair systems of nuclear DNA, mitochondrial DNA (mtDNA) is more susceptible to damage which are associated with risk of developing diseases such as diabetes and cancer. **Materials and methods.** The standardized of 8-OHdG were done with samples of gene bank's Salamanca children, a fragment of mitochondrial DNA was amplified by qPCR using the MTF3212 and MTR3319 primers in treated and non-treated samples with repair enzyme human 8-oxoguanine glycosylase 1 (hOGG1), it removes 8-OHdG residues, the amplification cycles (Cq) were relayed; this difference value between Cq was defined as Delta Cq. **Results.** The fragment of mitochondrial DNA was amplified with MTF3212 and MTR3319 primers, The Cq value showed a decrease when the DNA samples were treated with different concentrations hOGG1 (1 – 10 U for reaction; $P < 0.05$). The samples were treated in triplicate, we accepted only samples featuring average Cq with Coefficient of Variation (C.V.) were less than 1%. **Conclusions.** The 8-hydroxydeoxyguanosine is a biomarker of oxidative stress that can be quantified by qPCR, we can recognize the impact at level mitochondrial genome.

INTRODUCCIÓN

El ADN mitocondrial (mtDNA) consiste en una doble cadena circular de 16 569 pb, codifica para 13 polipéptidos de la cadena transportadora de electrones, 22 RNAs de transferencia y 2 RNAs ribosomal [1]. La mitocondria genera gran cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS), se calcula que más del 5% del oxígeno consumido por la cadena transportadora de electrones se convierte en ROS por la reducción incompleta del oxígeno. El mtDNA es altamente propenso al daño oxidativo debido a que se localiza en la membrana interna de la mitocondria en las proximidades de la cadena transportadora de electrones, los niveles de bases oxidadas generadas en el mtDNA son dos o tres veces más altos que en el ADN nuclear [Citado por [2]].

El mtDNA es de 10 a 20 veces más vulnerable al daño oxidativo que el ADN nuclear, más de 50 mutaciones en el mtDNA están asociadas a varias fisiopatologías tales como el cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas [3].

Uno de los productos formados por la oxidación del ADN es 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) el cual se acumula hasta tres veces más en el ADN mitocondrial que en el ADN nuclear [4]. La formación de 8-OHdG se genera por la oxidación de la guanina, si el daño del mtDNA no se repara la adenina se aparea incorrectamente con la 8-OHdG en lugar de la citosina dando lugar a la transversión de G:C a T:A, esta mutación es muy común en varios tipos de cáncer [5].

Sin embargo, la 8-OHdG puede ser removida del mtDNA por un sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER). La enzima 8-oxoguanina ADN glicosilasa de humanos (hOGG1) es una proteína de 38 – 44 KDa con actividad de ADN glicosilasa y de nucleasa. Por lo tanto, este sistema de reparación que genera un sitio abásico podría ser utilizado para cuantificar la 8-OHdG en el mtDNA por el retardo en la amplificación por PCR de un fragmento del genoma mitocondrial generado por la enzima reparadora.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de ADN previamente aislado de sangre periférica de niños de Salamanca, Gto., algunas muestras seleccionadas fueron tratadas con la enzima hOGG1 (BioLabs); y simultáneamente, fueron sometidas a condiciones sin la enzima, por triplicado. Se trataron 4 µL de ADN (7ng/µL) con 11 µL de mezcla de reacción (Tabla 1). Las muestras fueron incubadas durante una hora a 37 °C, para inactivar la hOGG1 las muestras fueron incubadas a 65°C por 15 min; y posteriormente, fueron diluidas 1:4 en agua libre de nucleasas.

Tabla 1. Componentes de la mezcla de reacción para muestras tratadas y no tratadas con la enzima hOGG1.

Buffer NE 10 X	1.5 µl
BSA 100 X	0.15 µl
hOGG1 (1600 U/mL) o Agua libre de nucleasas	0.7 -7.0 µl
Agua libre de nucleasas	c.b.p. 11 µl

Posteriormente, se amplificó un fragmento de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real (qPCR) utilizando los oligos:

F3212:5'-CACCCAAGAACAGGGTTTGT-3'
R3319: 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3'

Los componentes y condiciones de amplificación se muestran en las Tablas 2 y 3, respectivamente.

Tabla 2. Componentes de amplificación de un fragmento de genoma mitocondrial (108 pb).

Eva Green Supermix (BIORAD)	5 µl
Oligo Directo (F3212) (10 µM)	0.5 µl
Oligo Reverso (R3319) (10 µM)	0.4 µl
Agua libre de nucleasas	0.1 µl
ADN (Diluido 1:4) tratado/sin tratar	4 µl

Tabla 3. Condiciones de amplificación.

1 ciclo		35 ciclos			1 ciclo	
95°C	98°C	58°C	95°C	60°C	45°C	
3 min.	15 s	1 min.	15 s	15 s	15 s	

De cada muestra tratada por triplicado se obtuvo el promedio de Cq con una desviación estándar ≤ 0.25 (C.V. $\approx 1\%$) y se calculó la Delta Cq restando al Cq de la muestra tratada con la enzima hOGG1 el valor de Cq de la misma muestra sin tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras tratadas con diferentes concentraciones de la enzima hOGG1 mostraron un retardo en la amplificación por qPCR (Figura 1), debido a la eliminación de 8-OHdG por la enzima reparadora.

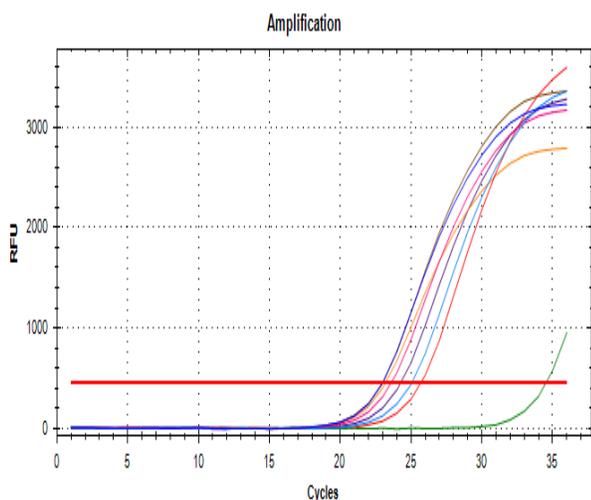


Figura 1: Amplificación de ADN Mitocondrial. Muestra no tratada con hOGG1 (Azul oscuro); muestra tratada con 1 unidad de hOGG1 (Naranja); muestra tratada con 2 U de hOGG1 (Café); muestra tratada con 4 U de hOGG1 (Rosa); muestra tratada con 6 U de hOGG1 (Morado); muestra tratada con 8 U de hOGG1 (Azul claro); muestra tratada con 10 U de hOGG1 (Rojo); control sin templado (Verde).

El promedio de los ciclos de amplificación obtenidos para las diferentes concentraciones de

la enzima hOGG1 presentan una diferencia significativa; en consecuencia, a partir de los valores obtenidos se determinó que la concentración óptima para observar un Delta Cq que permita valorar los niveles de 8-OHdG en el mtDNA es de 10 U por reacción (Tabla 4).

Tabla 4. Valores de Delta Cq a diferentes concentraciones de hOGG1

Concentración de hOGG1 (Unidades por reacción)	Promedio de Cq	Desviación estándar **	ΔCq
0	22.84	0.18	---
1	23.04	0.13	0.2
2	22.97	0.12	0.1
4*	23.50	0.05	0.7
6*	24.16	0.07	1.3
8*	24.93	0.14	2.1
10*	25.59	0.14	2.8

* Muestra seleccionada al azar de una genoteca de 104 niños de Salamanca, Gto.; ANOVA: $P < 0.001$.

** Desviación estándar ≤ 0.25 (C.V. $\approx 1\%$).

A partir de la estandarización de las unidades de hOGG1 necesarias para la reparación del mtDNA se seleccionaron al azar seis muestras y se obtuvieron los valores de Delta Cq (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de Delta Cq

Muestra*	Promedio de Cq (muestra tratada con hOGG1)	Promedio de Cq (muestra no tratada con hOGG1)	ΔCq	Valor de P
1	24.21	23.54	0.67	0.0132
2	25.14	23.36	1.78	< 0.001
3	24.99	23.31	1.68	< 0.001
4	24.59	23.08	1.51	< 0.001
5	24.56	23.34	1.23	< 0.001
6	25.34	24.30	1.03	< 0.001

* Muestras seleccionadas al azar de una genoteca de 104 niños de Salamanca, Gto.; t-student: $P < 0.05$, todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Los valores de Delta Cq son significativos por consiguiente, los niveles de 8-OHdG presentes en el ADN mitocondrial y reparados por la hOGG1 permite evidenciar el daño oxidativo presente en la mitocondria.

CONCLUSIONES

La 8-hidrodeoxiguanosina es un biomarcador del estrés oxidativo que puede ser cuantificado indirectamente por qPCR permitiendo reconocer este impacto a nivel del genoma mitocondrial debido a que un valor elevado en el Delta Cq refleja niveles altos de 8-OHdG y en consecuencia un alto daño oxidativo generado por ROS y cuya acumulación es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer y diabetes, por tanto este parámetro puede ser de gran utilidad en estudios epidemiológicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a la Universidad de Guanajuato por generar esta experiencia a través del Programa Veranos UG. Al Dr. Jorge Alejandro Alegría Torres y a la Mtra. Lizeth García Torres por el conocimiento compartido y las experiencias creadas en este corto tiempo. A la Universidad del Centro de México (UCEM-Othón, San Luis Potosí) por permitir el desarrollo experimental de este proyecto en el Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición (LIMON).

REFERENCIAS

- [1] Jinliang X. , Meng C. , Christopher G . W. , Jie L. , Margaret R . S., Jianzhong M. , Christopher I . A. , Peter G . S. , Neal L . B., Jian Gu , Mariza de Andrade , Gary E . S. & Xifeng Wu. (2008). Mitochondrial DNA Content: Its Genetic Heritability and Association With Renal Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*;100: 1104 – 1112.
- [2] de Souza-Pinto N.C., Eide L., Hogue B.A., Thybo T., Stevensner T., Seeberg E., et al. (2001). Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. *Cancer Res.*; 61(14):5378–81.
- [3] Kakimoto M, Inoguchi T, Sonta T, Yu HY, Imamura M, Etoh T, et al. (2012). Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. *Diabetes*, 51(5):1588–95.
- [4] Lotte G., Bram G. J., Charlotte V., Wouter L., Mirjam H., Valentina B. & Tim S. N. (2016). Mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. *Environmental Health*, 15:10.

- [5] Lee, H.-T., Lin C.-S., Lee C.-S., Tsai C.-Y. & Wei Y.-H. (2013). *Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in plasma and decreased mRNA expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, antioxidant enzymes, mitochondrial biogenesis-related proteins and glycolytic enzymes in leucocytes in patients with systemic lupus erythematosus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 176: 66–77.