

DETERMINACIÓN DE 8-HIDROXIGUANOSINA EN EL ADN MITOCONDRIAL MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL EN MUESTRAS DE NIÑOS DE SALAMANCA

Alcalá González, Paul Pascual (1), Alegría Torres, Jorge Alejandro (2)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: paulpascual92@hotmail.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

El genoma mitocondrial es pequeño, circular y cerrado, en seres humanos mide cerca de 16 kbp y actualmente se conocen todos los genes que codifica, se encuentra en la mitocondria, centro de la respiración en la célula, la cual es heredada solo por herencia materna y está muy expuesta a mutaciones siendo la más común la 8-oxo-guanina generada por las especies reactivas de oxígeno (ROS). Para medir este daño se puede usar la enzima hOGG1 (oxoguanina glicosilasa). En este trabajo se trataron 6 muestras de ADN con la Enzima hOGG1 y se comparó el retardo en el ciclo umbral de amplificación (Cq) del fragmento mitocondrial con la misma muestra no tratada con la enzima hOGG1. El retardo en la amplificación (Delta Ct) se considera proporcional al nivel de oxidación en el genoma mitocondrial por el efecto de la enzima hOGG1 la cual genera sitios abásicos los cuales retrasan la amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real.

ABSTRACT

The mitochondrial genome is small, round and closed, in humans measures about 16 kbp and all genes encoding are now known, is found in the mitochondria, breathing center in the cell, which is inherited only through the maternal inheritance and it is highly exposed to the most common mutations guanine 8-oxo-generated by reactive oxygen species (ROS). This damage can be measure by hOGG1 enzyme (glycosylase oxoguanine). In this paper 6 samples of DNA was treated with the enzyme hOGG1 and these showed delay on the threshold amplification cycle (Cq) of mitochondrial fragment, this was compared with the same sample not treated with hOGG1. The delay in the amplification (Delta Ct) is considered proportional to the level of oxidation in the mitochondrial genome by the effect of the enzyme hOGG1 which generates abasic sites which delay the amplification of fragment de DNA mitonchondrial by real time PCR.

Palabras Clave

Biomarcador ; genoma mitocondrial; genotoxicidad.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos continuamente están expuestos a sustancias y eventos que pueden dañar la integridad del ADN, como es el caso de metales pesados, compuestos orgánicos, luz UV, radiactividad, entre otros.

Debido al aumento en la demanda de recursos por el rápido crecimiento de la población humana, se han incrementado las actividades industriales como es el caso de la explotación de metales, industrias textiles, fabricación de plásticos y las refinerías de petróleo. Los contaminantes generados se movilizan principalmente en agua y aire, afectando a todos los seres vivos que habitan en las zonas inmediatas. El ser humano no está exento de este daño, siendo los grupos más vulnerables que incluye a los niños, los que requieren mayor atención.

A pesar de que el ADN nuclear posee mecanismos de reparación. El ADN mitocondrial es más pequeño y no está superenrollado en histonas, tampoco presentan las regiones pseudogénicas que le permiten “absorber” las mutaciones por ello cuando está expuesto a un agente genotóxico es muy probable que éste no se repare. El ADN mitocondrial se encuentra en la mitocondria, centro de la respiración en la célula, la cual es heredada solo por herencia materna en el caso de los humanos, por ello un daño en la integridad de su material genético repercute en toda la descendencia más allá de la F1.

Los mecanismos de reparación del ADN más estudiados son 1) Reparación por escisión de nucleótidos (NER), repara el daño de 2 a 30 nucleótidos. 2) Reparación de errores (MMR), corrige nucleótidos no apareados. 3) Reparación por escisión de bases (BER) actúa sobre un solo nucleótido.

Dentro de este último sistema de reparación se encuentra la enzima hOGG1 (oxoguanina glicolasa) que se encarga de remover la 8-oxoguanina, un derivado oxidado de la guanina; representando el daño más común en el ADN el cual es debido principalmente a las ROS (especies reactivas de oxígeno), éstas se generan en los procesos celulares pero cuando el organismo está expuesto a diferentes situaciones de estrés ambiental aumentan considerablemente

provocando por lo tanto más lesiones que pueden derivar en mutaciones.

Por lo tanto la 8-OHdG es el biomarcador de daño al ADN que podría asociarse a la exposición a agentes genotóxicos, presentes en el ambiente.

Una de las ventajas de utilizar biomarcadores moleculares es la posibilidad de detectar en forma precoz, los efectos nocivos de los contaminantes antes de que se evidencien cambios en los niveles de organización superior.

Los biomarcadores se utilizan fundamentalmente para: 1) detectar una exposición 2) determinar las consecuencias biológicas de la exposición, 3) detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, 4) identificar a los individuos sensibles de una población, 5) fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental.

En este estudio se evaluó la 8-OHdG mitocondrial de forma indirecta, en muestras de niños de Salamanca expuestos a Benceno medido como ácido trans,trans-muconico en orina, amplificando por PCR en tiempo real (qPCR) un fragmento de ADN mitocondrial rico en guaninas. Para ello, cada muestra de ADN se trató con la enzima hOGG1 y se comparó el retardo en el ciclo umbral de amplificación (Cq) del fragmento mitocondrial por el tratamiento con la enzima hOGG1. El retardo en la amplificación (Delta Ct) se considera proporcional al nivel de oxidación en el genoma mitocondrial por el efecto de la enzima hOGG1 la cual genera sitios abásicos los cuales retrasan la replicación por parte de la polimerasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon muestras de ADN de niños de Salamanca expuestos a benceno para la determinación de la 8-OHdG. La mezcla de reacción para tratar las muestras con la hOGG1 (Biolabs) consistió en: Buffer NE, BSA, agua libre de nucleasas, enzima hOGG1 y ADN total, los volúmenes utilizados están indicados en la tabla 1.

Tabla 1: Componentes para el tratamiento con hOGG1

Componente	Volumen por reacción (µL)
Buffer NE 10X	1.5
BSA 100X	0.15
H ₂ O libre de nucleasas	2.35
hOGG1 (1600 unidades/ml)/ H ₂ O	7
ADN de hígado de salamánca (7 ng/ml)	4

Figura 1: Amplificación de ADN mitocondrial. Muestra tratada con hOGG1 por triplicado (Azul). Muestra no tratada con hOGG1 por triplicado (Naranja). Control sin templado (Negra).

Después se procedió a incubar esta mezcla a 37°C 1 hora, posteriormente se inactivó la enzima a 65°C por 15 minutos para después llevar a cabo una PCR en tiempo real de acuerdo a la descripción de la tabla 2. La secuencia de los oligos se muestra a continuación:

Oligo directo (F3212):
5'CACCCAAGAACAGGGTTTGT3'

Oligo reverso (R3319):
5'TGGCCATGGGTATGTTGTTA 3'

Tabla 2: Componentes para la amplificación.

Reactivo	Volumen (µL)
Evagreen Supermix 2X (BIORAD)	5
Oligo Reverso (10 µM)	0.4
Oligo Directo (10 µM)	0.5

H ₂ O libre de nucleasas	0.1
ADN sin tratar /ADN previamente tratado con la enzima hOGG1 diluido 1/4 (7ng/ml)	4

Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3.

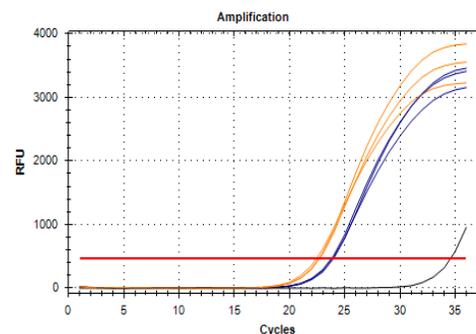
Tabla 3: Condiciones de la qPCR

T	Tiempo	No. Ciclos
95°C	3 min.	1
98°C	15 s	35
58°C	1 m	
95°C	15 seg	1
60°C	15 s	
45°C	15 s	
4°C	infinito	

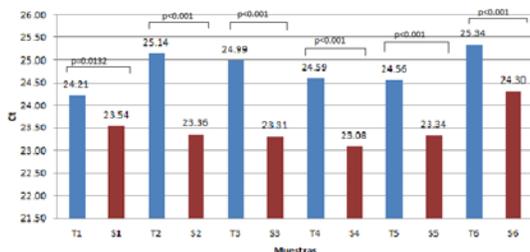
El análisis de datos se llevo a cabo en los programas OpenEpi e IBM SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las muestras tratadas con la enzima hOGG1 mostraron un retardo en el ciclo de amplificación de un fragmento de ADN mitocondrial de 108 pb (Figura 1), las diferencias entre los valores de Ct obtenidos para las muestras tratadas y no tratadas con la enzima hOGG1 son significativos ($P < 0.05$) (Figura 2), por consiguiente el valor Delta Ct evidencia el daño presente en el ADN mitocondrial.



Valor de Ct de muestras tratadas y no tratadas con hOGG1



Los contaminantes como el benceno se han asociado a la generación de especies reactivas de oxígeno las cuales causan estrés oxidativo y por consiguiente la formación de 8-OHdG en el ADN mitocondrial, el marcador de exposición temprana del benceno es el ácido trans, trans-muconico; en el presente trabajo se correlacionaron los valores de *t,t*-muconico (tabla 4) previamente cuantificado con el delta ct medido, sin encontrar una correlación significativa.

Figura 2: Valores de Ct. Muestras tratadas (T) con hOGG1 (azul). Muestras no tratadas, (S) con hOGG1 (rojo).
Tabla 4: Valores de delta Ct y ácido *t,t*-muconico.

Muestra*	Promedio de Ct** muestra tratada con hOGG1	Promedio de Ct** muestra no tratada con hOGG1	Delta Ct	Valor de P	Ácido <i>t,t</i> -muconico
1	24.21	23.54	0.67	0.0132	13.66
2	25.14	23.36	1.78	<0.001	31.87
3	24.99	23.31	1.68	<0.001	17.16
4	24.59	23.08	1.51	<0.001	13.73
5	24.56	23.34	1.23	<0.001	60.45
6	25.34	24.30	1.03	<0.001	35.04

* Muestras tomadas al azar y analizadas por triplicado.

**Desviación estándar ≤ 0.25

CONCLUSIONES

La determinación de la 8-OHdG permite evidenciar el daño oxidativo presente en el ADN mitocondrial sin embargo este daño no se asocia positivamente con la exposición a benceno debido a que la correlación con el ácido *t,t*-muconico no fue significativa a causa del número tan reducido de muestras analizadas; por consiguiente se sugiere aumentar el tamaño de muestra para encontrar una correlación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Guanajuato, a la División de Ciencias Naturales y Exactas por permitirme participar en el Verano de la Ciencia, al Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición de la UCEM por prestarnos sus instalaciones y equipo, así como al Doctor Jorge Alejandro Alegría Torres por su asesoría en este trabajo y a María Guadalupe Hernández Ramírez por su ayuda durante el verano.

REFERENCIAS

- [1] Díaz Báez, M. C. & Bustos López, M. C. (2004); Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos. Bogotá, Colombia. Unibiblos.
- [2] Singh, K.K. (1998); Mitochondrial DNA mutations in aging, disease and cancer; Estados Unidos; Springer.
- [3] Sagé, Evelyne; (2005); From DNA photolesions to mutations, skin cancer and cell death; Francia; RSC publishing.
- [4] Hou, L. (2010); Airborne particulate matter and mitochondrial damage: a cross-sectional study. Environmental Health. 9:48.
- [5] Grevendonk, L.(2016) mitochondrial oxidative DNA damage and exposure to particulate air pollution in mother-newborn pairs. Environmental Health. 1510