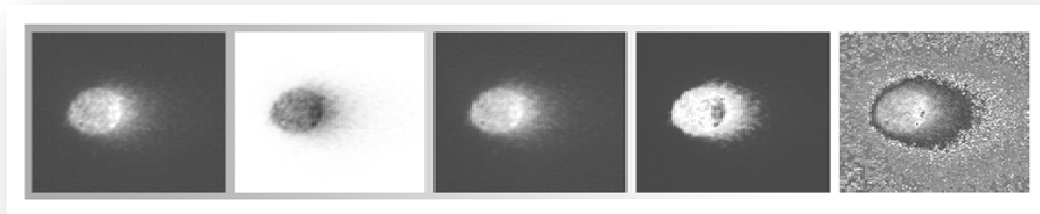




Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Biociències
Departament de Genètica i de Microbiologia
Grup de Mutagènesi

Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana



TESIS DOCTORAL

Liliana A. Zúñiga Venegas

2009

Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Genética por Liliana Andrea Zúñiga Venegas.

El presente trabajo ha sido realizado en el *Grup de Mutagènesi* de la *Unitat de Genètica* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, bajo la dirección de los Doctores Ricard Marcos y Amadeu Creus.

Bellaterra, Octubre de 2009.

Liliana Andrea Zúñiga Venegas

V°B°

Los directores del trabajo de Tesis

Dr. Ricard Marcos Dauder

Catedrático de Genética

UAB

Dr. Amadeu Creus Capdevila

Catedrático de Genética

UAB

Agradecimientos

Por fin, los agradecimientos. La primera página que verá el lector, pero la última que he escrito. El trabajo está hecho, y ya sólo queda dejar constancia de todo lo que debo a tanta gente. Por otra parte, como no soy capaz de escribir nada original sobre agradecimientos, no me preocuparé de que quede una página interesante. Sólo intentaré transmitir mis sentimientos hacia todos los que han hecho posible que esté ahora terminando este trabajo.

Casi todo lo que hacemos, y entre ello lo relacionado con la investigación, es fundamentalmente una labor colectiva, aunque muchas veces los que han contribuido no sean en absoluto conscientes de ello. En el caso de esta tesis, aún debería decir más: yo, como autora, he sido únicamente quien ha dado forma concreta a un esfuerzo realizado, en distintos grados, por mucha gente.

En primer lugar, he podido realizar este trabajo gracias a los directores de esta Tesis, Amadeu Creus y Ricard Marcos; gracias por la confianza depositada y apoyo.

Expresar mis agradecimientos a la Generalitat de Catalunya por haberme otorgado la beca (2005FI 00745) que ha hecho posible mi estancia y dedicación exclusiva a este trabajo, y al Proyecto de Investigación NewGeneris: Newborns and Genotoxic exposure risks (FOOD-CT-2005-016320)

Por supuesto, también me debo (y debo este trabajo) a mis padres Edmundo Zúñiga y Carmen Venegas, a mis hermanos, cuñados, sobrinos, a toda mi familia en general, que me han dado el apoyo incondicional y la oportunidad de descubrir lo que me gusta y de dedicarme a ello.

Mis más enormes agradecimientos también a Glòria Umbert, a Lourdes Alarcón, a María José Ramírez y a Susana Pastor por la capacidad innata de solucionarnos la vida, por su incondicional apoyo y amistad durante estos años de trabajo.

A las "cometeras" Emma Guillaumet por haberme enseñado la técnica con mucha paciencia y minuciosidad y, a Naouale El Yamani, Eliza Stoyanova y Danae Liviác por haberme aportado valiosos conocimientos.

A cada uno de los integrantes del grupo "Mutas", con los que he trabajado todo este tiempo, por su apoyo y amistad, especialmente a Naouale, Berenice, Jeny y Wilser, y a todos ellos por conseguir que los momentos difíciles se hicieran más amenos (L.U.M).

A todos mis amigos que me han tenido geográficamente lejos, pero que gracias a sus e-mails y llamadas han minimizado las distancias (Coty, Marcía, Isa, Angie, Sílvia...)

A tí, Ian Acuña, muchas gracias por apoyarme en el trayecto de este largo camino, por decir la palabra exacta en el momento indicado. Que puedo decir que sea nuevo para tí. Simplemente dejaré escrito lo que ya sabes: "nadie hay para mí como tú".

Finalmente, cabe citar a todos aquellos que me animaron a embarcarme en esta aventura, y a los que me apoyaron una vez estaba en ella. A todos los que me preguntaron una y mil veces cómo iban las cosas, a los que se interesaron por cuándo acababa (o cuándo empezaba), a los que hacían lo que podían por presionar mi perezosa voluntad para que avanzase, y a todos los que han comprendido el significado de estos 4 años. Todos ellos han hecho posible que me sienta razonablemente orgullosa de este trabajo.

Liliana A. Zúñiga Venegas

A mis padres
A Nelicita

Índice

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tablas.....	v
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ensayo del cometa: desarrollo histórico de la técnica.....	2
2. Mecanismos de formación del cometa.....	7
3. Diferentes versiones del ensayo y daño detectado.....	12
3.1. Versiones neutra y alcalina del ensayo.....	13
3.2. Introducción de enzimas de reparación, detección de una amplia gama de daño.....	14
3.3. Ensayo del cometa más hibridación <i>in situ</i> fluorescente (COMET- FISH).....	15
3.4. Ensayo del cometa en la evaluación de la reparación del DNA.....	15
4. Metodología y consideraciones técnicas.....	17
4.1. Preparación de los portaobjetos.....	17
4.2. Lisis celular.....	19
4.3. Desnaturalización y electroforesis.....	20
4.4. Neutralización.....	22
4.5. Otras variables experimentales.....	24
4.5.1. Tinción del DNA y visualización de los cometas.....	24
4.5.2. Obtención de los resultados.....	25
4.5.2.1. Evolución de los sistemas de medición del daño.....	25
4.5.2.2. Análisis de imágenes como sistema masivo de obtención de resultados.....	29
4.5.2.3. Análisis, interpretación y presentación de los resultados de los ensayos <i>in vitro</i>	35
4.5.2.4. Análisis, interpretación y presentación de los resultados de los ensayos <i>in vivo</i>	37
5. Ventajas e inconvenientes del ensayo.....	39
6. Aplicaciones.....	42
6.1. Estudios de genotoxicidad.....	43

6.2. Aplicaciones clínicas.....	44
6.3. Estudios de reparación del DNA.....	48
6.4. Estudios de biomonitorización ambiental.....	51
6.5. Estudios de biomonitorización de poblaciones humanas.....	52
6.5.1. Muestras humanas.....	53
6.5.1.1. Linfocitos de sangre periférica.....	54
6.5.1.2. Criopreservación de linfocitos.....	56
6.5.2. Biomarcadores.....	58
7. Ensayo del cometa en estudios de biomonitorización humana (HBM).....	59
7.1. Ensayo del cometa como indicador de estrés oxidativo.....	64
7.1.1. Origen e importancia del daño oxidativo en el DNA.....	64
7.1.2. Ensayo del cometa como biomarcador de daño oxidativo...	67
7.1.3. ¿Cómo mide el ensayo del cometa el daño oxidativo?.....	69
II. OBJETIVOS.....	71
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. Ensayo del cometa: descripción del protocolo estándar.....	73
1.1. Preparación de los microgeles de agarosa.....	73
1.2. Lisis de membranas celulares.....	74
1.3. Desnaturalización y electroforesis.....	74
1.4. Neutralización y fijación.....	75
1.5. Tinción y visualización.....	75
2. Optimización del ensayo del cometa.....	76
2.1. Optimización 1: incremento del número de muestras por unidad de soporte.....	77
2.1.1. Portaobjetos conteniendo dos muestras.....	77
2.1.2. Cuarenta y ocho geles por soporte: Gelbond® film.....	78
2.2. Optimización 2: utilización de enzimas de reparación; protocolo para la detección de bases oxidadas.....	81
2.3. Optimización 3: utilización de células congeladas.....	83
2.3.1. Protocolo de aislamiento de linfocitos de sangre periférica.....	84
2.3.2. Protocolo de congelación de linfocitos de sangre periférica.....	86
2.3.3. Protocolo de descongelación de linfocitos de sangre	

periférica.....	87
3. Validación de las variaciones introducidas.....	90
3.1. Portaobjetos vs. Gelbond film: hacia el procesamiento rápido de muestras múltiples.....	90
3.2. Detección de daño oxidativo utilizando enzimas de reparación.....	93
3.2.1. Cultivo celular en monocapa.....	93
3.2.2. Inducción de oxidación de bases.....	94
3.3. Ensayos de congelación: una buena herramienta para el almacenamiento masivo de muestras.....	96
4. Aplicación del ensayo del cometa en dos grandes áreas de la genotoxicología.....	96
4.1. Construcción de una curva de calibración.....	97
4.2. Biomonitorización de dos cohortes de madres e hijos: estudio piloto para la determinación de daño basal y oxidativo.....	98
4.2.1. Caracterización de las poblaciones.....	99
4.2.2. Obtención de las muestras de sangre.....	100
4.2.3. Diseño experimental.....	101
5. Estadística.....	102
5.1. Estadística utilizada en los ensayos de validación.....	102
5.2. Estadística utilizada para los estudios de aplicación del ensayo.....	103
5.2.1. Construcción de una curva de calibración.....	103
5.2.2. Biomonitorización de dos cohortes de madres e hijos: determinación del daño basal y oxidativo.....	103
IV. RESULTADOS.....	107
1. Resultados de las modificaciones introducidas.....	107
1.1. Portaobjetos vs. Gelbond®.....	107
1.2. Ensayos de validación de la utilización de enzimas.....	109
1.3. Ensayo de congelación.....	111
2. Resultados de las aplicaciones del ensayo del cometa.....	112
2.1. Resultados de la construcción de la curva de calibración.....	112
2.2. Resultados del estudio de biomonitorización en cohortes madre-hijo.....	119

V. DISCUSIÓN.....	137
VI. CONCLUSIONES.....	161
VII. BIBLIOGRAFIA.....	163
ANEXO I.....	193
ANEXO II.....	205
ANEXO III.....	215

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Imágenes de cometas obtenidos de linfocitos aislados utilizando la versión alcalina descrita por Singh <i>et al.</i> , 1988.....	5
2	Esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas, propuesto por Shaposhnikov <i>et al.</i> , 2009.....	12
3	Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich.....	18
4	Clasificación visual sugerida por Collins <i>et al.</i> , 1995. Imágenes de cometas de linfocitos humanos teñidos con DAPI. Se representan las 5 categorías utilizadas en el análisis visual.....	28
5	Clasificación visual esquemática utilizada por Kobayashi <i>et al.</i> , 1995. Se muestra la clasificación de las 5 clases de cometas.....	29
6	Modelo de la imagen de un cometa. La luz emitida desde el cometa ubicado en la preparación es detectada como una imagen.....	31
7	Conversión de la intensidad de luz a “valores grises”.....	31
8	Segmentación de la imagen pixelada.....	32
9	Valores grises de la cabeza, de la cola y del ruido de fondo de la imagen modelo.....	33
10	Posición de los centros de masa de la cabeza y de la cola mostrando la distancia entre ellos. Medida que se utiliza para calcular el OTM.....	35
11	Diagrama esquemático de la aplicación del ensayo del cometa para la evaluación del daño en el DNA en distintos modelos desde bacterias a humanos.....	43
12	Usos del ensayo del cometa en diferentes estados de la biomonitorización.....	60

13	Reacciones de oxidación de la 2'-desoxiguanosina mediante el radical hidroxilo (OH·), un electrón libre $-e^-$ y mediante el oxígeno singlete 1O_2 , generando el principal producto de oxidación de bases con potencial mutagénico.....	67
14	Bases lesionadas del DNA que actúan como sustrato de la endonucleasa formamidopirimidina DNA glicosilasa FPG.....	70
15	Esquema simplificado de portaobjetos con a) una muestra y b) dos muestras. Se indican las dimensiones en milímetros de los geles resultantes en cada caso.....	77
16	Secuencia fotográfica de las principales etapas del ensayo del cometa utilizando como soporte portaobjetos precubiertos.....	78
17	Ubicación de los orificios de las esquinas, el corte inferior de orientación y la disposición de los 48 microgeles.....	79
18	Secuencia fotográfica de las principales etapas del ensayo del cometa utilizando como soporte las láminas de Gelbond.....	81
19	Capas de las fases formadas después de la centrifugación sangre periférica.....	85
20	Distribución de las capas celulares formadas en el tubo vacutainer CPT después de la centrifugación para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica.....	86
21	Protocolos del ensayo del cometa de la versión alcalina descrito por Singh <i>et al.</i> , 1988.....	89
22	Fórmula estructural del Ro 19-8022 (1-((10-cloro-4-oxo-3-fenil-4H-benzo(a)quinolizin-1-il)carbonil)-2-pirrolidinmetanol).....	95
23	Mapa de la provincia de Barcelona donde figuran las localidades de procedencia de las dos poblaciones estudiadas. Población I: Sabadell; población II: Barcelona.....	100
24	Distribución de los microgeles de agarosa a) Versión convencional; b) Versión Gelbond film.....	101
25	Representación gráfica de los valores obtenidos (media \pm EE) mediante ambas técnicas con concentraciones crecientes de H_2O_2	108
26	Gráfico de correlación entre las medias de % de DNA en la	109

	cola obtenidas utilizando la metodología convencional y con el film Gelbond ($P < 0,01$).....	
27	Daño oxidativo basal e inducido detectado con el ensayo del cometa utilizando las enzimas de reparación FPG y EndoIII.....	110
28	Experimento dosis-respuesta en linfocitos. Daño oxidativo basal e inducido detectado con el ensayo del cometa utilizando enzimas de reparación FPG y EndoIII.....	111
29	Curvas dosis-respuesta inducidas por radiación ionizante (radiación γ) en el rango de 0 a 8 Gy para cada donante. El daño genético se indica mediante el parámetro % DNA en la cola.....	114
30	Curva general dosis-respuesta. Los valores son expresados en % DNA en la cola neto (el nivel basal corresponde a la dosis = 0, y fue sustraído a cada uno de los valores de irradiación).....	115
31	Curva general de la frecuencia neta de roturas por cada 10^9 Da de DNA según dosis.....	116
32	Nivel basal de daño en el DNA en linfocitos de la población en estudio. Gráfico de la distribución de la frecuencia de roturas / 10^9 Da de DNA obtenida de la curva de calibración.....	117
33	Resultados del estudio de validación. Gráfico de la frecuencia de roturas / 10^9 Da de DNA de los dos individuos y los valores en la curva de calibración.....	118
34	a) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) de las madres y los hijos de la población II evaluadas utilizando Gelbond film antes de ser corregidos. b) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) del control negativo externo (0 Gy) incluido en cada uno de los experimentos. c) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) de las madres y los hijos de la población II evaluadas utilizando Gelbond film después de ser	

	corregidos.....	127
35	Daño basal de madres v/s hijos.....	130
36	Daño oxidativo neto de madres vs. hijos detectado con la enzima FPG.....	130
37	Daño oxidativo neto, detectado con al enzima EndoIII, de madres vs. hijos.....	131

Índice de Tablas

Tabla	Descripción	Página
I	Logros relevantes y nuevas aplicaciones en los 25 años de historia del ensayo del cometa.....	6
II	Descripción general de los diferentes modelos utilizados en el ensayo del cometa, sus características y aplicaciones.....	16
III	Pequeñas variaciones en la metodología principal del ensayo del cometa.....	23
IV	Sustracción de la señal del ruido de fondo para cada columna de píxeles del cometa de la imagen modelo.....	34
V	Estudios que han utilizado el ensayo del cometa en células extraídas mediante biopsias de tumores en humanos. Todos los estudios aquí citados utilizaron la versión alcalina, a menos que se indique otra versión.....	47
VI	Diseño de los experimentos de estandarización del ensayo del cometa utilizando portaobjetos y Gelbond® film.....	92
VII	Diseño experimental para la validación de los ensayos de determinación de daño oxidativo en el DNA mediante la utilización de endonucleasas en el ensayo del cometa.....	94
VIII	Efecto de los procesos de aislamiento y criopreservación en los niveles de daño endógeno y oxidativo en linfocitos humanos de 4 voluntarios (valores medios \pm EE).....	112
IX	Valores promedio del % de DNA en la cola.....	113
X	Resultados de validación. Valores indicativos de las dos dosis validadas con referencia a los obtenidos en la curva de calibración general.....	118
XI	Características de las madres de la población I. Edad, algunas características nutricionales y hábitos de consumo durante el periodo de gestación. Datos expresados mediante medias (\pm EE) o % según corresponda.....	120

XII	Características de las madres de la población II. Edad, algunas características nutricionales y hábitos de consumo durante el periodo de gestación. Datos expresados mediante medias (\pm EE) o % según corresponda.....	121
XIII	Características de los hijos de la población I. Datos del parto y mediciones típicas del neonato. Los resultados son expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda.....	123
XIV	Características de los hijos de la población II. Datos del parto y mediciones típicas del neonato. Los resultados son expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda.....	123
XV	Valores medios de %DNA en la cola de las dos poblaciones utilizando el ensayo del cometa.....	124
XVI	Valores de daño basal y oxidativo de madres y de hijos de ambas poblaciones utilizando la versión alcalina del ensayo del cometa y expresado en % DNA en la cola. La población II ha sido corregida (Comparación entre poblaciones).....	128
XVII	Valores de daño basal y oxidativo de madres y de hijos de ambas poblaciones utilizando la versión alcalina del ensayo del cometa y expresado en % DNA en la cola. La población II ha sido corregida (Comparación dentro de cada población).....	129
XVIII	Modelos de regresión múltiple que mejor se ajustan al daño genético basal y oxidativo de madres e hijos de la población I, según sus características.....	132
XIX	Modelos de regresión múltiple que mejor se ajustan al daño genético basal y oxidativo de madres e hijos de la población II, según sus características.....	134

I. Introducción

La integridad de nuestro DNA es un aspecto fundamental para la salud y el buen funcionamiento de nuestro organismo. Sin embargo, sabemos que el material genético es susceptible a ser dañado por numerosos agentes y/o procesos; así, por ejemplo, la guanina es especialmente susceptible a las especies reactivas de oxígeno producidas durante el metabolismo normal de la célula (Collins, 1999; Halliwell, 2000; Møller y Loft, 2002).

En relación al ejemplo anterior, se ha estimado que en el cuerpo humano se producen diariamente alrededor de 10.000 puntos de oxidación en el DNA por célula, y se han encontrado más de 35 formas diferentes de bases oxidadas en el DNA *in vitro* (Halliwell, 2000).

Aunque la mayoría del daño que se produce en nuestro material genético es reparado eficientemente por una compleja maquinaria enzimática de reparación (Jackson y Loeb, 2001), parte de él escapa a este proceso (acumulándose con la edad) constituyendo uno de los sustratos para el potencial desarrollo de un proceso carcinogénico (Hollander *et al.*, 1995). Estas lesiones no reparadas, o mal reparadas, pueden afectar diversos mecanismos tales como el control del ciclo celular, la expresión génica y la comunicación citoplasma-mitocondria, entre otros (Halliwell, 1996; Singh, 1996; Wiseman y Halliwell, 1996).

Si se acepta que el daño en el DNA es perjudicial, la prevención del mismo o, en su defecto, el incremento en la eficiencia de reparación, cabe considerarlos como beneficiosos; así, surge la necesidad de contar con herramientas sensibles y fiables que nos permitan profundizar en los aspectos relacionados con la detección de daño en el DNA, así como con su protección y reparación.

En los últimos treinta años, se han desarrollado con éxito nuevas metodologías capaces de evaluar el daño en el DNA, metodologías que han sido exhaustivamente investigadas, diseñándose técnicas que permiten medir directamente roturas de cadena simple (SSB) y de doble cadena (DSB) en el

DNA. Sin embargo, existen muy pocas técnicas capaces de hacerlo en células individualizadas, este aspecto es importante sobre todo para aquellos investigadores interesados en evaluar la heterogeneidad de la respuesta en poblaciones celulares, como sucede en el área de la radiobiología, donde hace aproximadamente 20 años Singh y colaboradores desarrollaron una técnica versátil capaz de medir niveles bajos de roturas en el DNA de células individualizadas, con una gran sensibilidad. Esta metodología se basaba en los resultados previos de dos científicos suizos quienes desarrollaron un método rápido y sensible para el análisis del daño en el DNA adoptando la palabra “cometa”, del campo de la astronomía, para bautizarlo, de acuerdo con la morfología que mostraban las células con su DNA dañado (Östling y Johanson, 1984). Actualmente, el ensayo del cometa se ha convertido en uno de los métodos más populares para la evaluación de daño en el DNA, con unos 5.000 artículos publicados en más de 150 revistas diferentes.

El ensayo ha tenido un gran impacto en numerosas áreas del conocimiento científico, especialmente en bioquímica, genética y biología molecular. Actualmente el uso del ensayo, tanto para su optimización como para sus aplicaciones, sigue desarrollándose continuamente.

1. Ensayo del cometa: desarrollo histórico de la técnica

Es ampliamente reconocido que el ensayo del cometa fue descrito como un nuevo método para la detección del daño en el DNA a mediados de la década de 1980, aunque la detección de daño en el DNA en células embebidas en agarosa ya había sido descrita con anterioridad.

Así, en 1976, Cook *et al.* publicaron un artículo donde se investigaba la estructura nuclear basándose en la lisis de células usando detergentes no iónicos y una alta molaridad de cloruro de sodio. Este tratamiento eliminaba membranas, citoplasma y nucleoplasma, y alteraba los nucleosomas dejando casi todas las histonas solubles en la alta concentración de sales contenidas en la solución de lisis. El resultado de esta reacción es una estructura a la que denominaron “nucleoide” y que consiste en una matriz (o andamiaje) nuclear

compuesto de DNA, RNA y proteínas. Esta matriz posee un superenrollamiento negativo como consecuencia de las torsiones de la doble hélice alrededor de las histonas que conforman los nucleosomas.

La permanencia de este superenrollamiento implica que la libre rotación del DNA no es posible; así, estos investigadores propusieron un modelo en el cual el DNA está anclado a intervalos a la matriz, organizado en una serie de lazos. Cuando los nucleoides fueron sometidos a la acción de un agente intercalante (bromuro de etidio), se relajó el superenrollamiento negativo y los lazos de DNA se expandieron fuera del nucleoide, visualizándose mediante la formación de un halo alrededor del mismo.

Efectos similares fueron observados cuando se utilizó radiación ionizante. Así, en 1978, Rydberg y Johanson describieron un método para el análisis de células individuales basado en la lisis alcalina de las células previamente irradiadas. Posteriormente, esta técnica fue adaptada a la metodología de citometría de flujo mediante la encapsulación de las células en agarosa antes de la irradiación, seguido de una lisis alcalina (Rydberg, 1984). El tratamiento de las células con cloruro de sodio 2 M mezclado con detergentes aniónicos produjo los ya descritos "nucleoides". Estas estructuras estaban compuestas por lazos de DNA de entre 50 y 100 kb que permanecían anclados a una red de naturaleza proteica (Cook *et al.*, 1976), lo que condujo al desarrollo del "ensayo del halo" (Roti Roti y Wright, 1987), estructura que se visualizaba alrededor del nucleoide después de un tratamiento alcalino. En este ensayo, las roturas en el DNA producían el relajamiento del superenrollamiento de la molécula de DNA, lo que permitía la expansión del halo anclado a una matriz de proteínas en cada una de las células. Esto permite interpretar que una sola rotura en un lazo de DNA es suficiente para relajar el superenrollamiento del mismo (Rydberg y Johanson, 1978).

En 1984, Östling y Johanson presentaron una idea nueva que consistió en la utilización de microgeles de electroforesis. Así, las células embebidas en agarosa fueron lisadas para la formación de los halos descritos anteriormente y sometidas luego a un campo eléctrico, lo que permitió la migración del material que había sido expulsado desde el nucleoide. Esta migración de las moléculas

de DNA, cargadas negativamente, desde dicho nucleoide hacia el ánodo permitió, tanto un evidente incremento de la sensibilidad en la detección del daño, como un aumento en la resolución de subpoblaciones de células que mostraban diferente magnitud de daño (Östling y Johanson, 1987).

El tipo de daño más simple detectado con este ensayo correspondió a roturas de cadena doble (DSB), que resultaron en fragmentos de DNA que pudieron ser fácilmente revelados sometiéndolos a la movilidad en una electroforesis a pH neutro, como lo realizaron Östling y Johanson. Las roturas de cadena simple (SSB) no producen fragmentos de DNA a menos que exista una separación (desnaturalización) de las hebras, lo que se logra sometiendo el material a condiciones alcalinas con un pH superior a 12.

A raíz de estos hallazgos, es como después de varios intentos de algunos autores por aumentar la sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad del ensayo, se consolidan dos versiones diferentes: Singh *et al.* (1988) y Olive (1989).

Los primeros describieron la versión del ensayo en la que aumentaron considerablemente el pH de la electroforesis ($\text{pH} > 13$), lo que les permitió detectar SSB, sitios álcali-lábiles (ALS) y SSB asociados a la reparación incompleta por escisión. Debido a que la producción de SSB y/o ALS por parte de los agentes genotóxicos es varias veces mayor en orden de magnitud, comparado con la producción de DSB, esta versión del ensayo brindó un notable incremento de la sensibilidad para identificar agentes genotóxicos. Es en este trabajo donde se denomina formalmente a la técnica como "Electroforesis de geles de células individualizadas" (SCGE del inglés *Single Cell Gel Electrophoresis*), más popularmente llamada ensayo del cometa (**Figura 1**). Esta técnica alcalina es la que ha sido adoptada por la mayoría de laboratorios frente a la versión neutra de Olive (1989), que sólo detecta DSB. Una idea de la aceptación de la versión alcalina la da el número de trabajos publicados que la utilizan (1650), respecto a los que utilizan la versión neutra (44), tal y como se obtiene en la Web of Science, Octubre 2005 (<http://wok.mimas.ac.uk/>).

Este método ha sido recomendado como la versión óptima del ensayo para la identificación de agentes con potencial actividad genotóxica en el

“International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP)” (Tice *et al.*, 2000).

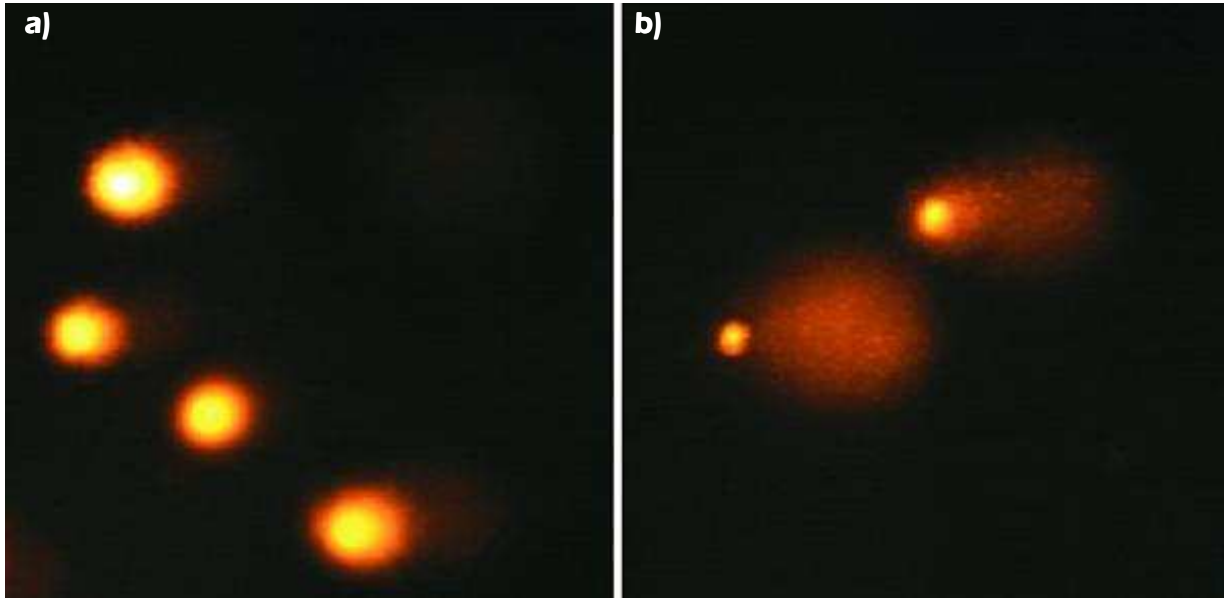


Figura 1. Imágenes de cometas obtenidos de linfocitos aislados utilizando la versión alcalina descrita por Singh *et al.*, 1988. a) controles mostrando igualmente una pequeña migración que corresponde al daño basal. b) tratados con radiación gamma donde se observa la forma típica de un cometa: cabeza y cola.

Por otro lado, Olive en 1989, introdujo otra modificación en el ensayo, realizando la electroforesis del DNA a $\text{pH} \sim 12,3$ y lisando las células en un medio débilmente alcalino. Esta versión fue exitosa para detectar subpoblaciones de células con diferente sensibilidad a los compuestos genotóxicos o a la radiación.

Varios autores han descrito protocolos del ensayo del cometa con recomendaciones y discusiones sobre las numerosas variaciones técnicas (Olive, 2002; Collins, 2004). Una de las modificaciones ampliamente adoptada ha sido la inclusión de enzimas de reparación con actividad glicosilasa/endonucleasa específica, las cuales detectan un amplio rango de lesiones en el DNA (Collins *et al.*, 1993; Dusinská y Collins, 1996). En principio, cualquier lesión que tenga su enzima para ser reparada puede ser detectada utilizando este método. Así, es posible detectar, por ejemplo, el mayor producto de la oxidación, la 8-

hidroxiguanina (8-OHG) considerada una alteración mutagénica, y otras purinas alteradas mediante digestión con la enzima formamidopirimidina-DNA glicosilasa (FPG); también se pueden detectar pirimidinas oxidadas mediante la digestión con la enzima endonucleasa III (EndoIII).

Otras modificaciones del ensayo del cometa permiten la identificación de enlaces cruzados DNA-DNA y la detección de daño en genes específicos mediante la aplicación de la reconocida técnica de hibridación *in situ* fluorescente (Comet-FISH) (Anderson *et al.*, 1997a; Santos *et al.*, 1997).

El ensayo del cometa también ha sido modificado para poder evaluar la eficiencia en la reparación de extractos celulares en sustratos de DNA embebidos en agarosa y dañados con lesiones específicas conocidas. Collins *et al.*, (2001a, b) diseñaron por primera vez esta clase de experimentos para medir la capacidad de reparación de un extracto de linfocitos humanos mediante la escisión de lesiones específicas, las que en una primera instancia fueron bases oxidadas.

La **Tabla I** detalla los eventos históricos más relevantes en el desarrollo del ensayo del cometa y las modificaciones más importantes durante los 25 años de utilización de la técnica.

Tabla I: Logros relevantes y nuevas aplicaciones en los 25 años de historia del ensayo del cometa (Møller, 2006a; Liao *et al.*, 2009).

Año	Desarrollo y logro
1978	Rydberg y Johanson introducen un método para la detección de roturas del DNA en células individualizadas y embebidas de agarosa bajo condiciones alcalinas ($\text{pH} \geq 12$). La cantidad de roturas de cadena simple (SSB), relacionadas con la de roturas doble del DNA (DSB), fueron visualizadas mediante la tinción con naranja de acridina que emite luz verde y amarilla, respectivamente.
1984	Östling y Johanson describen una modificación del método de las células embebidas en agarosa. Esta consiste en someterlas a un campo eléctrico y a un pH neutro (9,5). Cuando el DNA de las células sometidas a la microelectroforesis fue previamente dañado con radiación, el material genético presentaba migración hacia el ánodo mientras que el DNA con poco daño permanecía circular. Se detectaron DSB a nivel de células individuales.

- 1988** Singh *et al.* modificaron la electroforesis a un pH>13. Se detectaron SSB. Esta modificación es a menudo considerada como la publicación original del ensayo del cometa. Hasta Octubre del 2005, la publicación ha sido citada 1650 veces (Web of Science).
- 1989** Olive describe una versión diferente del ensayo del cometa con la electroforesis bajo condiciones neutras. Las imágenes son llamadas "cometas". Sorpresivamente esta publicación se ha citado en pocas ocasiones (44 citas hasta octubre de 2005, Web of Science).
-
- 1990^a** Olive *et al.* introdujeron otra versión alcalina a pH ~ 12,3. Eficaz para detectar subpoblaciones de células con diferente sensibilidad a algún agente genotóxico.
- 1992** Gedick *et al.* describen la versión del cometa que consiste en la utilización de enzimas modificadas para la detección de bases dañadas. Los nucleoides son digeridos con enzimas bacterianas, que reconocen un amplio rango de daño en el DNA.
- 1993** Collins *et al.* utilizan la enzima EndoIII para detectar pirimidinas oxidadas.
- 1995** Olive y Banáth describen por primera vez la visualización de células necróticas o apoptóticas como cometas con cabeza pequeña o sin cabeza y una cola larga y difusa.
- 1996** Pfuhrer y Wolf describen que el ensayo del cometa es una herramienta útil para la detección de agentes que producen enlaces cruzados DNA-DNA.
- 1997** Santos *et al.*, introducen la técnica de hibridación *in situ* para la localización de roturas en genes específicos.
-
- 2000** Tice *et al.* publican las primeras normas internacionales para la aplicación del ensayo en toxicología genética y biomonitorización.
- 2001b** Collins *et al.* miden la capacidad de reparación del DNA de un extracto celular. La eficacia de incisión del extracto obtenido de donantes es medido en un substrato de DNA embebido en agarosa y que contiene tipos específicos de lesiones.
- 2003** Rundell *et al.* encuentran que los cometas sin núcleo se deben a fragmentación nuclear o apoptosis, con la consiguiente migración del DNA. Los cometas con poca cabeza son llamados "*hedgehogs*" (del inglés "erizos"), donde el DNA extremadamente dañado no llegó a perderse por completo durante la migración.
- 2006** Smith *et al.* describen que la enzima HOGG1 reconoce daño oxidativo usando el ensayo del cometa con una mayor especificidad que las enzimas FPG y EndoIII.
-

2. Mecanismos de formación del cometa

El mecanismo por el cual se forman los cometas es un aspecto que después de 25 años, todavía no se ha podido dilucidar completamente. Desde

las dos primeras versiones del ensayo descritas (versión neutra descrita por Östling y Johanson, 1984, y versión alcalina descrita por Singh *et al.*, 1988), se ha intentado establecer la naturaleza de la cola del cometa según las características de ambas versiones. Östling y Johanson (1984) propusieron que las roturas en el DNA permitirían el estiramiento de los lazos durante la electroforesis, formándose la cola del cometa.

Klaude *et al.* (1996) presentaron una excelente aproximación para demostrar que la cola del cometa, bajo condiciones neutras, corresponde a lazos relajados, mientras que bajo condiciones alcalinas consiste en fragmentos de DNA. Estas hipótesis fueron propuestas después de estudiar el comportamiento del DNA en diferentes condiciones de electroforesis en células de mamíferos irradiadas con rayos gamma. La cola de los cometas observados después de una electroforesis neutra, parecía estar formada por lazos enganchados a la matriz nuclear debido a que no presentaban migración después de someterlas a una segunda electroforesis, cambiando la dirección de la migración en 90° con respecto a la primera. Además, se observó que el aspecto de la cola era compacto. Posteriormente, cuando evaluaron el comportamiento de las células sometidas a electroforesis alcalina, toda la cola formada después de la primera electroforesis fue capaz de migrar hacia la nueva dirección durante la segunda electroforesis y presentaba un aspecto mucho más difuso, en comparación con las colas obtenidas después de una electroforesis neutra. Esta observación llevó a pensar que la cola estaba formada por fragmentos de DNA que no estaban sujetos a la matriz nuclear. Para justificar esta afirmación asumieron que, después del tratamiento alcalino, existen dos tipos de fragmentos de DNA, los que se forman entre roturas cercanas de la misma hebra y son capaces de desnaturalizarse por completo, resultando en fragmentos totalmente independientes del resto del DNA; y por otro lado, si las roturas ocurren alejadas, se producirá la formación de fragmentos parcialmente desnaturalizados ya que la desnaturalización cesará, impidiendo que este fragmento se libere. Las porciones de DNA a medio desnaturalizar poseen una alta probabilidad de enredarse con otras moléculas dentro del núcleo lisado, disminuyendo la posibilidad de migrar, lo que sugiere

que la cabeza y la cola del cometa están claramente separadas en contraste con al continuidad observada en condiciones neutras.

Cuando se aumentó la dosis de radiación, la cola bajo condiciones neutras, tendió a comportarse de manera similar a la cola formada en condiciones alcalinas; es decir, el material de la cola se movió con el cambio de dirección de la migración, ya que el aumento de la dosis produjo un aumento del daño generando fragmentos originados por DSB. El aumento de la dosis en condiciones alcalinas aumenta la proporción de fragmentos monocatenarios capaces de migrar.

Un año después, la teoría de la relajación de los lazos de DNA se propuso como principio básico para la explicación de la cola del cometa en la versión alcalina del ensayo (Collins *et al.*, 1997a). Esta propuesta se basa en la comparación de las características de la electroforesis en el ensayo del cometa con las características de una electroforesis convencional. Es obvio que el DNA durante la electroforesis no migra a modo de fragmentos como sucede en una electroforesis ordinaria, donde la distancia atravesada está inversamente relacionada con el tamaño de los fragmentos. El ensayo del cometa alcalino posee una capacidad de resolución de unas pocas miles de roturas por célula, por lo que la distancia entre dichas roturas está dentro del orden de 10^9 Da de DNA, definitivamente mucho más allá del rango de tamaño de los fragmentos para los cuales la electroforesis convencional es adecuada.

El tamaño de un "fragmento" resuelto por la electroforesis del ensayo del cometa ronda el mm; sin embargo, la longitud de la cola de un cometa es de unas dos centésimas de mm. Entonces, ¿se estarán visualizando sólo los extremos libres producidos por roturas del DNA que han sido expulsados hacia la cola? Una buena analogía puede ser una enmarañada madeja de hilo donde unos pocos cortes pueden hacer que se desenrolle más fácilmente. Pero el núcleo de DNA es mucho más que una bola de hilo enmarañada. Incluso después del tratamiento con detergentes y sales fuertes, como en el proceso de lisis estándar del ensayo, el núcleo (o nucleóide) aún conserva su estructura; el DNA está organizado en lazos que mantienen el superenrollamiento que conformaron los nucleosomas. La presencia del superenrollamiento de los lazos

fue deducida por Cook *et al.* (1976), al observar que cuando en el DNA se producen roturas mediante radiación, el superenrollamiento se relaja y los lazos difunden formando un halo alrededor del nucleoide. Por analogía, se asume que la cola del cometa está formada de lazos relajados y que el número de lazos en la cola (o simplemente la intensidad relativa de la misma) indica el número de roturas en el DNA. Este modelo concuerda con las observaciones realizadas al aumentar la cantidad de daño, donde se incrementa la intensidad de la cola, pero no la longitud de la misma. Con esto, se interpreta que la longitud de la cola estaría determinada por la longitud de los lazos y no por la distancia de la migración de supuestos fragmentos.

Para comprobar si la cola consiste en fragmentos de DNA relajado o en extremos libres, los autores antes mencionados proponen la observación de la distribución de los extremos utilizando la técnica de incorporación de nucleótidos marcados con su subsiguiente detección mediante inmunofluorescencia, ya que diferentes patrones han predicho ambos modelos.

La versión alcalina del ensayo detecta roturas de cadena simple y también doble del DNA, pero las roturas de cadena simple no son las más interesantes, ya que son fácilmente reparadas y no son consideradas como lesiones significativamente letales o mutagénicas. Muchos agentes mutagénicos no introducen roturas directamente, pero pueden producir sitiosapurínicos/apirimidínicos (AP) los cuales son álcali-lábiles (ALS) y probablemente se rompen mientras el DNA es sometido a la electroforesis a pH alto. Además, otras lesiones pueden estar presentes transitoriamente durante la reparación celular por escisión de bases (BER) y, por lo tanto, un alto nivel de roturas puede indicar un gran daño o una eficiente reparación. De hecho, se puede obtener mucha información útil mediante la explotación de la reparación celular que produce roturas del DNA y así revela o amplifica los efectos de las genotoxinas que, de otra manera, podrían no mostrar efectos positivos en el ensayo del cometa.

Otra aproximación interesante la proponen Singh y Stephens (1997), describiendo que, durante una electroforesis neutra, las moléculas individuales de DNA están ancladas a la matriz nuclear por un extremo, mientras que el otro

extremo migra fuera del núcleo por acción del campo eléctrico. En otras palabras, es como si cada hebra perteneciente a un cromosoma estuviese fuertemente unida a proteínas cada cierto intervalo, incluso después de la electroforesis.

Con el fin de apoyar o refutar estas hipótesis, Shaposhnikov *et al.* (2008) han utilizado la hibridación *in situ* fluorescente mediante sondas genómicas de ~100 kb de largo (equivalente a una considerable fracción de la longitud de la cola) con el fin de estudiar si la formación de la cola del cometa se explica simplemente por la relajación de los lazos de DNA superenrollados. Estos investigadores llegaron a la conclusión que, después de la electroforesis en condiciones neutras, donde el DNA tanto de la cabeza como de la cola no está desnaturalizado, la fluorescencia de la secuencia de la sonda se dispone linealmente a lo largo de la cola desde un punto fijo de la matriz nuclear. Sin embargo, después de la electroforesis en condiciones alcalinas, la apariencia de la fluorescencia emitida por la sonda se muestra de manera aglomerada, lo que induce a pensar en una interpretación fragmentada de la cola; sin embargo, igualmente puede representar que el DNA lineal se ha conglomerado mostrándose en forma de gránulos.

Para estos autores sólo queda concluir que, después de una electroforesis alcalina, el DNA monocatenario se muestra en forma de gránulos distribuidos más o menos al azar sobre el área de la cola. Dilucidar si este proceso de condensación ocurre durante la electroforesis o la subsiguiente neutralización, y si los gránulos que han conformado los lazos continúan atados a la matriz nuclear, son cuestiones que permanecen sin respuesta. La inquietud de estos autores por averiguar la naturaleza de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas y, el empeño por demostrar la teoría de lazos, los llevó a diseñar un estudio donde marcaron las zonas adyacentes a la sonda utilizada anteriormente, pero con una señal de distinto color. Después de la electroforesis en condiciones alcalinas, observaron que el material que ha formado gránulos en la cola y que contiene las sondas de interés (sonda original de ~100 kb) está delimitada por las dos más pequeñas y aparecen muy cercanas, es decir en el mismo gránulo, por lo que se concluye que las aglomeraciones formadas

después de la electroforesis alcalina comparados con las líneas vistas después de la electroforesis neutra, tienen la misma longitud.

La **Figura 2** esquematiza la reciente propuesta de Shaposhnikov *et al.* (2009) acerca de la naturaleza de cometa.

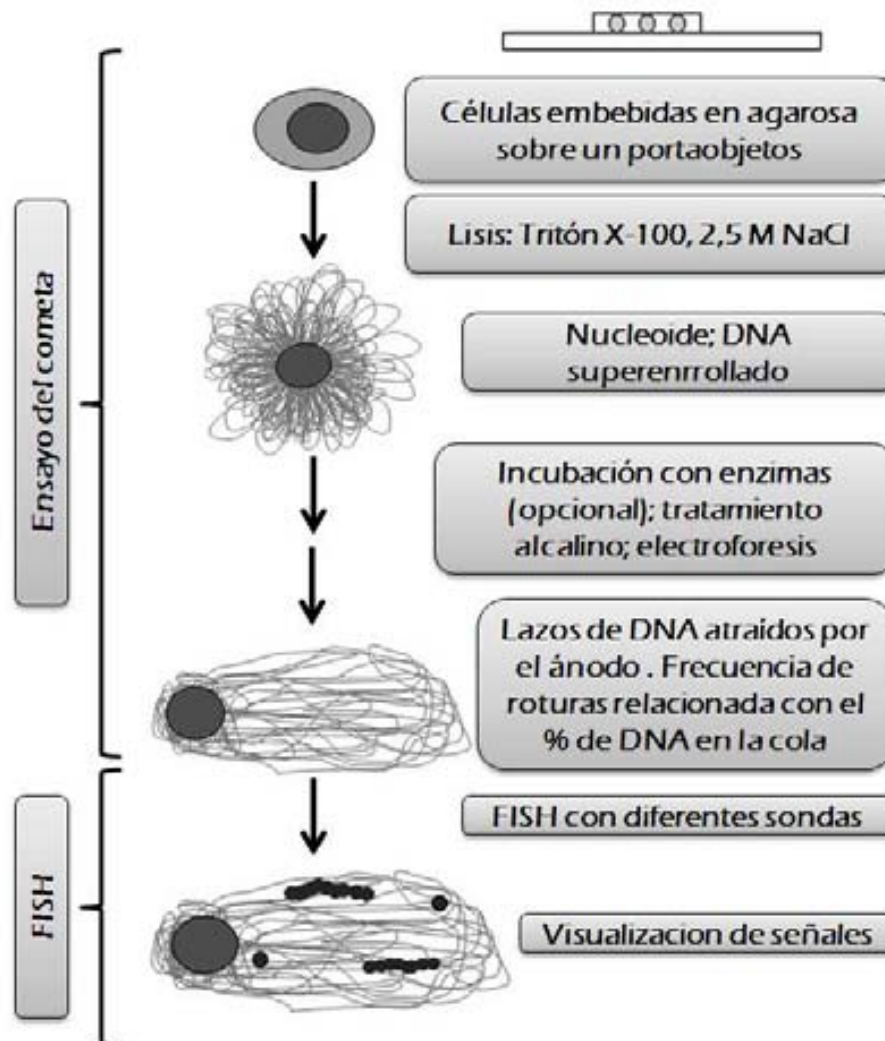


Figura 2: Esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas, propuesto por Shaposhnikov *et al.*, 2009.

3. Diferentes versiones del ensayo y daño detectado

Con la intención de lograr mayor sensibilidad y especificidad del ensayo, durante sus años de desarrollo se han incluido numerosas variaciones,

consiguiendo que la técnica pueda detectar una amplia gama de lesiones en el DNA. Esto ha tenido gran éxito ya que hoy en día el ensayo es capaz de detectar una gran parte de las lesiones producidas por la mayoría de los agentes genotóxicos. Como se mencionó anteriormente, se han establecido dos principales versiones del ensayo del cometa dependiendo de las características del pH, tanto de la lisis como de la electroforesis.

3.1 Versiones neutra y alcalina del ensayo

La versión neutra del ensayo fue desarrollada por primera vez por Östling y Johanson (1984) utilizando un pH de 9,5 tanto para la lisis como para la electroforesis. Pero no fue hasta 1988 cuando Singh *et al.*, evidenciaron que este pH estaba justo por debajo del punto de desnaturalización de DNA, por lo que con dichas condiciones sólo era posible detectar DSB y que eran necesarias condiciones más alcalinas para detectar SSB. Así, utilizaron la lisis a pH~10 y la electroforesis a pH>13. Esta versión fue capaz de detectar SSB en el DNA de células individualizadas.

Olive *et al.* utilizaron un pH medianamente alcalino durante la lisis celular, seguido de una electroforesis neutra (1990a) o alcalina (1990b) para la detección de DBS o SSB, respectivamente.

Collins (2004) llega a la conclusión que el pH neutro o medianamente alcalino de la lisis y la electroforesis permiten tener el mismo límite de detección que el pH alcalino; por lo tanto, las SSB también pueden ser detectadas en condiciones neutras, aunque el uso de un pH neutro afecta la imagen del cometa obtenido, ya que la cola del cometa es menos pronunciada, perdiendo sensibilidad. Esto puede ser una ventaja cuando no se necesita una alta sensibilidad, por ejemplo, cuando se investigan células con una gran cantidad de daño basal, o cuando el daño inducido es alto (Angelis *et al.*, 1999).

Tice *et al.* (2000) utilizando las condiciones altamente alcalinas de Singh *et al.* (1988), concluyeron que no sólo se detectan SSB sino también otros tipos de daño como los ALS. Así, los ALS se transforman en SSB revelando otro tipo de daño enmascarado. Empleando una alcalinidad media (pH=12,3) se previene la

conversión de ALS a roturas. Por lo tanto, la modificación del pH de la lisis (desnaturalización) y/o electroforesis en un rango de 9,5-13,5, pueden aplicarse obteniendo así diferentes modalidades del ensayo (Collins *et al.*, 1997a; Angelis *et al.*, 1999).

3.2 Introducción de enzimas de reparación, detección de una amplia gama de daño

El uso de enzimas supone una versión del ensayo de una alta sensibilidad, pudiendo alcanzar una alta especificidad. Además de las SSB, DSB y ALS, pueden ser identificados otros tipos de daño, tales como bases oxidadas y dímeros inducidos por UV, que son daños que no producen roturas, por lo que si no se detectan conducen a una subestima del daño genotóxico inducido. Estos daños no pueden ser detectados sin la ayuda de enzimas específicas, capaces de generar roturas en el sitio del daño. Las enzimas más popularmente utilizadas hasta la fecha son la endonucleasa III (EndoIII), que detecta pirimidinas oxidadas (Collins *et al.*, 1993), la formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG), que detecta purinas oxidadas (Dusinská y Collins, 1996), la uvrABC una compleja enzima utilizada para detectar daños voluminosos producidos por la luz UV (Dusinská y Collins, 1996), la metiladenina DNA glicosilasa II (AlkA) que revela sitios 3-metiladenina (Collins *et al.*, 2001a) y la uracil glicosilasa (UDG) que detecta sitios donde debió incorporarse uracilo (Duthie y Hawdon, 1998). Además del uso de enzimas para revelar lesiones específicas, la proteinasa K ha sido usada para relajar el DNA altamente condensado, como el que se encuentra en las células espermáticas (Duty *et al.*, 2002). La alta densidad del DNA encontrada en células espermáticas obstaculiza la migración del mismo durante la electroforesis, es aquí donde la proteína quinasa K ayuda a la relajación del material y a la remoción de las histonas (Singh, 1996). La proteinasa K también elimina enlaces cruzados DNA-DNA o DNA-proteínas, que puedan estar generando algunos agentes potencialmente genotóxicos como, por ejemplo, los radicales libres de oxígeno (Lloyd *et al.*, 1997). Los enlaces son detectados y removidos dando como resultado roturas en el DNA.

3.3 Ensayo del cometa más hibridación *in situ* fluorescente (COMET-FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es otra herramienta que puede ser utilizada para identificar cromosomas, regiones de interés dentro de un cromosoma, detectar genes en particular o daño en los mismos. La combinación de estas dos técnicas ha sido descrita por Santos *et al.* (1997) y por McKelvey-Martin *et al.* (1998). Esta combinación también provee la oportunidad de investigar dominios específicos de reparación del DNA, y puede ser utilizada para localizar genes específicos en la estructura tridimensional de un cromosoma. También han sido investigadas, mediante esta modificación del ensayo del cometa, las diferentes tasas de reparación de genes específicos respecto al genoma completo (Horváthová *et al.*, 2004).

3.4 Ensayo del cometa en la evaluación de la reparación del DNA

La reparación del DNA es la segunda línea de defensa contra los efectos de los agentes genotóxicos. Muchos de los daños son eliminados antes que la célula entre en el proceso de replicación, estado en el que los daños producidos pueden ser fijados como mutaciones. Es evidente que la capacidad de reparación puede influir en el riesgo de cáncer y, de hecho, algunas enfermedades raras con defectos en los genes que codifican para proteínas de reparación (*e.g.*, *xeroderma pigmentosum*) se caracterizan por poseer una elevada incidencia en el desarrollo del cáncer.

Se ha introducido en el ensayo del cometa la capacidad de poder evaluar la eficiencia de la reparación mediante dos aproximaciones (Collins y Horváthová, 2001). La primera consiste en cultivar células que han sido dañadas *in vitro*, durante intervalos de tiempo, y sometidas al ensayo del cometa para evaluar el daño remanente a lo largo del tiempo. La segunda aproximación, mucho más sofisticada, consiste en evaluar la capacidad de reparación de un extracto celular (por ejemplo, linfocitos humanos) sobre un sustrato dañado *in vitro*. Así, conociendo el tipo y la magnitud de daño inducido a los sustratos, se incuban con los extractos de interés para determinar así su capacidad de

reparación. La **Tabla II** describe las principales variaciones de la técnica realizadas con el objeto de aumentar su sensibilidad y especificidad.

Tabla II: Descripción general de los diferentes modelos utilizados en el ensayo del cometa, sus características y aplicaciones (Wong *et al.*, 2005).

Versión	Descripción/características	Ventaja/aplicación	Referencia
Neutra	Lisis y electroforesis a pH 9,5; menos desnaturalización y colas menos pronunciadas; detecta SSB y DSB; límite de detección similar, pero menos sensible que la versión alcalina	Útil en situaciones donde es necesario no contar con tanta sensibilidad (<i>e.g.</i> , cuando el daño basal o el inducido es alto)	Östling y Johanson, 1984; Angelis <i>et al.</i> , 1999; Collins, 2004.
Alcalina	Lisis/desnaturalización/ electroforesis en condiciones alcalinas (pH>13), los ALS son convertidos a roturas. Cambiando el pH entre 9,5 y 13 se puede cambiar la sensibilidad.	Imágenes más claras de los cometas; gran respuesta al daño comparada con la versión neutra; comúnmente llamado ensayo “estándar” del cometa, usualmente adoptado cuando se investiga protección frente a daño inducido <i>e.g.</i> , H ₂ O ₂ .	Singh, 1988; Angelis <i>et al.</i> , 1999; Tice <i>et al.</i> , 2000.
Con enzimas de reparación	Enzimas específicas usadas inmediatamente después de la lisis transforman los sitios susceptibles en SSB; las enzimas utilizadas incluyen EndoIII (revela pirimidinas oxidadas) FPG (revela purinas oxidadas); se ha incrementado la sensibilidad y reforzado la especificidad para distintos tipos de lesiones en el DNA.	Se pueden detectar distintos tipos de daño; se ha reforzado la sensibilidad; es útil por ejemplo, para detectar diferencias en daño basal después de alguna suplementación.	Collins <i>et al.</i> , 1993; Dusinská y Collins, 1996.
Con proteinasa K	Refuerza la desnaturalización de DNA altamente condensado permitiendo que el daño sea detectado.	Permite que la detección de daño en el DNA en células espermáticas sea posible.	Duty <i>et al.</i> , 2002.
Cometa-FISH	Utiliza genes marcados con fluorescencia, y también puede ser usado para localizar y visualizar genes dentro de la estructura tridimensional del cromosoma.	Permite la investigación de dominios específicos de reparación; pueden ser localizados genes específicos en la estructura tridimensional del cromosoma; puede medirse la tasa de reparación de un gen relativo al genoma completo.	Santos <i>et al.</i> , 1997; McKelvey-Martin <i>et al.</i> , 1998; McKenna <i>et al.</i> , 2003; Horváthová <i>et al.</i> , 2004.

4. Metodología y consideraciones técnicas

Actualmente se están aplicando numerosas versiones del ensayo del cometa con mayor o menor frecuencia. Debido a que la versión alcalina ($\text{pH} > 13$) es superior en cuanto al espectro de lesiones que reconoce en el DNA y en su mayor sensibilidad para la detección de bajos niveles de daño, en comparación a la neutra ($\text{pH} = 9,5$) o a la medianamente alcalina ($\text{pH} \sim 12,3$), se ha elegido como versión estándar, tanto para la descripción en detalle de su proceso como para la comparación con otras versiones.

Después de la obtención de las células de interés (**ANEXO I**), los pasos básicos en el ensayo del cometa incluyen la preparación de los portaobjetos precubiertos con las células a evaluar embebidas en agarosa, la lisis de membranas para liberar el DNA, la desnaturalización del DNA, la electroforesis, la neutralización de la alcalinidad, la tinción y la visualización. El aumento del rendimiento de cada una de estas etapas permite una detección muy fiable del daño en el DNA.

4.1 Preparación de los portaobjetos

Los dos objetivos principales de una buena preparación de las capas de agarosa son asegurar un soporte estable para la manipulación de las células a evaluar durante todo el proceso, y permitir una fácil y buena visualización con un mínimo ruido de fondo. Generalmente, se preparan las capas de agarosa a modo de sándwich, en cuya capa central se encuentran las células (**Figura 3**). Las células son suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión (LMP), generalmente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, y depositadas sobre una primera capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) que cubre el portaobjetos. Se deposita una tercera capa de agarosa sobre la capa de células una vez la segunda se haya solidificado.

La primera capa es utilizada para asegurar una buena adherencia de la capa celular y de la tercera capa al portaobjetos. Existen métodos más antiguos que sólo utilizaban una capa, la celular, depositada directamente sobre

portaobjetos totalmente esmerilados, los llamados “fully frosted”, pero requerían de un extremo cuidado durante la manipulación de las preparaciones y además dificultaban la visualización de los cometas.

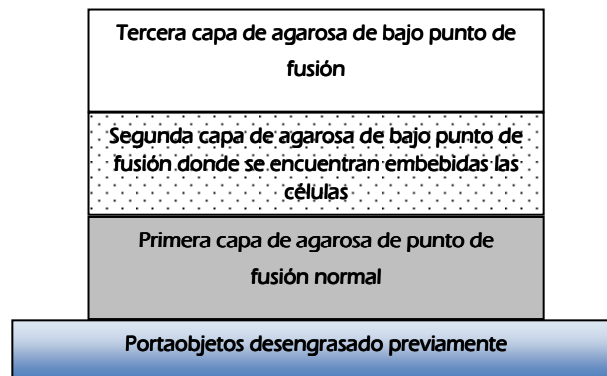


Figura 3: Esquema típico de un portaobjetos con las capas de agarosa dispuestas tipo sándwich. Las células son embebidas en agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y depositadas en un portaobjetos previamente desengrasado con etanol:éter (70:30) y precubierto con agarosa de punto de fusión normal (NMP). Se deposita una tercera capa de agarosa LMP sobre la capa celular que llenará los posibles orificios que contenga la superficie del gel (Ex: Liao *et al.*, 2009).

Una notable mejoría en la preparación de los portaobjetos fue introducida por Singh y Khan (1995) cuando deshidrataron la primera capa de agarosa incubándola entre 40 y 50 °C por unos pocos minutos, obteniendo portaobjetos permanentes.

En la segunda capa (la que contiene las células), la concentración de agarosa y la dilución celular son parámetros de mucha importancia para un análisis eficiente. Aproximadamente entre 10.000 y 50.000 células son suspendidas en 10 μ L de PBS o medio de cultivo y son mezcladas con 75 μ L de agarosa LMP a una concentración final de entre 0,5 y 1% y gelificada entre 35 y 45 °C (la cantidad de agarosa puede ser modificada en relación con el tamaño del gel). Si se utiliza una mayor densidad de células, puede verse dificultada la visualización, sobre todo en aquellos tratamientos donde se ha producido un alto nivel de daño (alta tasa de migración del DNA), ya que se corre el riesgo de

solapamiento de las colas imposibilitando la medición del daño. Por otro lado, concentraciones altas de agarosa pueden afectar la migración del DNA.

La tercera capa cumple sólo un papel protector; es más, muchos laboratorios han decidido prescindir de ella, ya que se ha visto que los resultados no se ven afectados, pudiendo también facilitar la neutralización del tratamiento alcalino (Liao *et al.*, 2009). Su ausencia también facilita la acción de las enzimas cuando se realizan experimentos con incubación enzimática.

Con respecto a los cubreobjetos utilizados para nivelar la agarosa, debe usarse un tamaño apropiado para que las capas de agarosa fundida logren una adecuada gelificación y, así, facilitar la remoción de éstos evitando la alteración de las capas.

4.2 Lisis celular

Se utilizan soluciones de lisis neutra y alcalina para la detección de DSB y SSB, respectivamente. La selección del pH de la solución dependerá de los objetivos del estudio. Como ya mencionamos, la lisis alcalina es mucho más frecuentemente utilizada, en comparación con la lisis neutra, ya que detecta una amplia gama de daños que, además, son los más comúnmente producidos por los agentes genotóxicos, y consiste en someter las células ya embebidas en una solución con una alta concentración de sales y detergentes a un pH entre 10 y >12, durante al menos una hora. No existe mucha diferencia entre las soluciones de lisis utilizadas en los distintos laboratorios en cuanto a su composición, sin embargo existen tipos celulares que requieren de un segundo detergente para lograr la completa lisis de las membranas. Esto debe ser evaluado caso a caso.

Algunos autores han probado algunas modificaciones poco relevantes en la composición de la solución. Por ejemplo, McKelvey-Martin *et al.* (1993) concluyeron que no existen diferencias en los resultados obtenidos en presencia o ausencia de *N*-laurilsarcosinato entre la mezcla de detergentes.

Otra modificación consiste en que en algunas situaciones, la proteína quinasa K (PK) puede ser de mucha utilidad a la hora de remover proteínas

residuales o remanentes de tratamientos enzimáticos o de anticuerpos entre la lisis y la desnaturalización.

Por último y no menos importante, la solución de lisis debe ser refrigerada antes de su uso para lograr una máxima estabilidad de los geles de agarosa.

4.3 Desnaturalización y electroforesis

Antes de la electroforesis, las preparaciones son incubadas durante un tiempo en la solución de electroforesis alcalina (pH > 13, baja concentración de sales y sin detergentes), con lo que se consigue la separación de la doble cadena de DNA y, con esto, la producción de SSB y la expresión de ALS como SSB y SSB transitorias relativas al proceso de reparación. La solución de electroforesis desarrollada por Singh *et al.* (1988) consistió en 1 mM de EDTA y 300 mM de hidróxido de sodio a un pH = 13,0. Esta solución es una de las más frecuentemente utilizadas en el ensayo del cometa, ya que maximiza la expresión de ALS en SSB. De acuerdo con el protocolo de Singh *et al.* (1988) generalmente el tiempo de desnaturalización en estas condiciones es de tan sólo 20 minutos; sin embargo, un método para dilucidar el tiempo adecuado de desnaturalización se basa en medir la extensión de la migración de los controles (si las células tratadas muestran la misma migración que los controles el tiempo debe ser replanteado, pero sometiendo las células a un agente genotóxico conocido como por ejemplo H₂O₂) bajo diferentes condiciones de desnaturalización y manteniendo idénticos al resto de los pasos del experimento. Green *et al.* (1996) observaron que el incremento del tiempo de desnaturalización más allá de 40 minutos provoca un aumento de la migración de los cometas en los controles. Este largo periodo de tiempo permite que la desnaturalización del DNA sea iniciada desde las roturas, pero el principal proceso que podría estar ocurriendo es la difusión de la sal de la solución de lisis desde la agarosa hacia el tampón, la que si no difunde, podría actuar como electrolito y por ende facilitar la migración del DNA.

La electroforesis de las células para producir los cometas ha mostrado ser uno de los parámetros más complejos de validar, por lo que en la literatura es el paso descrito con más variaciones. Las propiedades de la electroforesis son muy analizadas a la hora de estudiar la naturaleza de la formación de los cometas.

La elección del voltaje y del tiempo de electroforesis debe estar relacionada con los niveles de daño en el DNA expresados y con la concentración de sales del tampón.

La electroforesis en el ensayo del cometa es diferente de una electroforesis convencional, ya que el DNA necesita migrar sólo una fracción de milímetros para obtener una significativa movilización del DNA y, por ende, la formación de cometas. Esto se puede conseguir con un breve tiempo de electroforesis (5 - 30 minutos) y con voltajes bajos (0,5 - 5 V/cm). Originalmente, las condiciones de electroforesis descritas en el protocolo de Singh fueron de 25 V y de 300 mA, con una duración de 20 minutos, condiciones descritas por la mayoría de los estudios, aunque también se han citado numerosas variaciones incluyendo estudios provenientes del laboratorio original (Singh *et al.*, 1994).

La duración, tanto de la desnaturalización alcalina como de la electroforesis, pueden variar dependiendo tanto del tipo de célula que se quiera analizar como del tipo de daño que se quiera detectar. Siempre es importante considerar variaciones en esta etapa del ensayo; así, se pueden obtener largos cometas sometiendo las preparaciones a altos voltajes y a largos periodos de tiempo durante la electroforesis.

Las condiciones óptimas de voltaje/amperaje y de duración de la electroforesis generalmente dependen de la migración visualizada en los controles, y el rango de migración que está siendo evaluado en las células tratadas.

El tampón durante la electroforesis continúa con el mismo pH (>13) utilizado durante la desnaturalización y, con respecto a la temperatura, se han llevado a cabo electroforesis en un rango entre 5 °C a temperatura ambiente, resultando que 15 °C parece ser la temperatura de máxima discriminación. Esta

temperatura, junto con 40 minutos de desnaturalización, proporciona una máxima sensibilidad pero también se está en el límite de producir controles aceptables. Algunos investigadores prefieren perder sensibilidad con el objeto de obtener un ensayo más potente. Otros, recomiendan que la solución esté refrigerada con antelación y realizarla a una temperatura entre 5 °C y 8 °C, y así incrementar la reproducibilidad del experimento.

Si bien se ha detallado en esta memoria de Tesis el protocolo mayormente usado en la historia del ensayo, la **Tabla III** resume las condiciones metodológicas más utilizadas en las tres versiones descritas: neutra, medianamente alcalina y alcalina. Se puede alcanzar una gran sensibilidad del ensayo mediante el incremento del tiempo desde que se sumergen las preparaciones en el tampón de electroforesis y la aplicación de la corriente, como demostraron Green *et al.* (1996).

4.4 Neutralización

Después de la electroforesis, se neutraliza la alcalinidad de las preparaciones mediante lavados en un tampón a pH 7,5. Comúnmente esta solución está compuesta de Tris y se continúa utilizando, pero una alternativa más económica es utilizar PBS 1x disuelto en agua bidestilada, conservando el mismo pH neutro. Típicamente se realizan tres lavados de 5 minutos; sin embargo, cuando se aprecia un alto ruido de fondo durante la visualización, realizar un mayor número de lavados y/o incrementar el tiempo de los mismos puede resultar de mucha utilidad en esta y otras situaciones.

Durante la neutralización, las hebras de DNA separadas anteriormente y ubicadas en la cabeza del cometa, se renaturalizan debido a que la estructura (superenrollamiento) de los lazos está intacta, mientras que el DNA contenido en la cola del cometa permanece como DNA monocatenario. Esto se ha confirmado mediante tinción con naranja de acridina (AO), donde la fluorescencia producida en los sitios de doble cadena es de color verde y roja en los sitios donde el DNA se encuentra desnaturalizado. Así, los cometas teñidos con AO muestran cabezas verdes y colas rojas (Collins *et al.*, 1997a).

Después de la neutralización, las preparaciones pueden ser teñidas y los cometas pueden ser visualizados. Alternativamente, los geles pueden ser deshidratados sumergiéndolos dos veces en etanol absoluto por 5 minutos cada vez y, así, las preparaciones pueden ser almacenadas y evaluadas cuando se estime conveniente (Singh *et al.*, 1995).

Tabla III: Pequeñas variaciones en la metodología principal del ensayo del cometa.

Variable técnica	pH 7	pH 12,3	pH >13
Número de capas de agarosa	2 a 3 capas	2 a 3 capas	1 a 3 capas
Concentración agarosa	0,75%	0,75%	0,5 a 1%
Tampón de lisis: composición y duración	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (0,0025 – 0,03 M) • SDS (0,5 – 2,5%) • Algunos autores agregan 10 mg/mL de PK • > 1h. 	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl (1,0 M) • NaOH (0,003 M) • En situaciones se agrega 0,5% de N-laurilsarcosina to y 2 mM de EDTA • > 1h. 	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (100 mM) • NaCl (2,5 M) • Tris (10 mM), pH 10 • Opcional 10 mM de N-laurilsarcosinato • Al momento de utilizar 1% de Titrón X-100 • Cuando las muestras contienen eritrocitos se recomienda añadir 10% DMSO • En situaciones se agrega PK 10 mg/mL • Mínimo 1h.
Desnaturalización: composición y duración	<ul style="list-style-type: none"> • Ac. bórico o acético (90 mM) • EDTA (2 – 5 mM) • Tris (40 – 117 mM) • 2 -16 h. 	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (1 – 2 mM) • NaOH (0,003 M) • 1 h. 	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA (1 mM) • NaOH (300 mM) • 20 – 60 min.
Electroforesis	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 – 0,57 V/cm • Duración depende del voltaje y el amperaje, pero generalmente es de 25 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 – 0,67 V/cm • Duración depende del voltaje y el amperaje, pero generalmente es de 25 min. 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,8 – 1,5 V/cm • Generalmente se utiliza 25V y 300 mA • La duración depende del protocolo y del tipo de célula, pero generalmente va de 20 a 60 min.

4.5 Otras variables experimentales

Los procesos de tinción y visualización son etapas que necesitan ser consideradas. Además, la evaluación e interpretación de los resultados es un tema muy controvertido en el ensayo del cometa ya que no existe un consenso en cuanto a qué parámetro se debe utilizar o de que manera se deben tratar los datos que se obtienen tras el recuento y medición del daño. A continuación se desarrollan estos aspectos con la esperanza de no producir más confusión de la que existe en relación al uso y desarrollo de esta técnica.

4.5.1 Tinción del DNA y visualización de los cometas

El último paso del ensayo alude a la tinción específica del DNA. Variables tales como el fluorocromo para la visualización y/o la metodología utilizada para la recolección de datos dependen principalmente de las necesidades específicas del investigador, lo que presumiblemente tendrá un pequeño efecto en la sensibilidad y en el poder de resolución.

Los aumentos que han sido utilizados varían desde 160X a 400X, pero usualmente el rango apropiado oscila entre 200X y 250X. La magnitud del aumento es importante dependiendo del tipo celular que está siendo evaluado, y también, del rango de migración y del contraste del microscopio y/o del sistema de imágenes utilizado. Del mismo modo, la elección del fluorocromo de tinción depende de las limitaciones del equipamiento y de la manera en que los datos serán obtenidos (*i.e.*, recuento visual o análisis de imágenes, metodologías que se detallarán en el siguiente apartado). Probablemente, la tinción más utilizada es el bromuro de etidio (EB), seguido por el yoduro de propidio (PI) y el 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Estas tinciones actúan de distinta manera sobre el DNA; el EB, que es un agente intercalante, se inserta entre los pares de bases adyacentes de doble cadena. El DAPI es conocido por su facilidad de formar complejos fluorescentes en los surcos menores de la doble hélice de DNA y es estabilizado por puentes de hidrógeno. El PI actúa intercalándose en el DNA entre las bases, con poco o ningún orden de preferencia, mediante uniones estequiométricas en una proporción de 1 molécula de tinción por 4 – 5

pares de bases. Para algunas tinciones fluorescentes es necesaria la utilización de compuestos que prevengan la pérdida de fluorescencia ("antifade"), permitiendo la visualización de una misma preparación en distintos tiempos. Otros autores han presentado alternativas de tinción tales como YOYO-1 (Singh *et al.*, 1994) y SybrGold/Green (Tice *et al.*, 1998), así como también técnicas no fluorescentes para la visualización de los cometas, basadas en la tinción con nitrato de plata (Kizilian *et al.*, 1999; García *et al.*, 2007). Cualquiera que sea el fluorocromo utilizado, la cantidad de tinción unida al DNA es proporcional a la cantidad de DNA presente y, por lo tanto, con la cantidad de luz emitida después de la excitación a una longitud de onda apropiada. Es importante el uso de concentraciones de tinción bajas ya que las concentraciones altas pueden conducir a la saturación del sistema de detección de fluorescencia.

Otros autores utilizan también microscopios con escáner laser para medir diferencias en el daño (O'Neill *et al.*, 1993).

4.5.2 Obtención de los resultados

Hoy en día, existen aproximadamente tantos métodos para la cuantificación del daño como investigadores dedicados a esta técnica. Se han realizado numerosos intentos para evaluar y cuantificar los patrones de formación de los cometas de una manera más fiable y exacta. Se dispone de una gran variedad de sistemas de análisis de imágenes de células individuales, siendo una de las aproximaciones más flexibles para la colección de datos; sin embargo, los métodos que no disponen de un sistema sofisticado de análisis, son igualmente útiles.

4.5.2.1 Evolución de los sistemas de medición del daño

La evolución de los parámetros comienza desde los orígenes del ensayo cuando Östling y Johanson (1984), con su versión neutra del mismo, empezaron con un sistema bastante sofisticado basado en el análisis de imágenes teñidas con AO. Presentaron sus resultados en términos de

proporción de fluorescencia en cola a una distancia de x μm del centro de la cabeza (F_x) *versus* la fluorescencia del centro de la cabeza (F_0). Basándose en sus propias observaciones, concluyeron que un F_x de 50 μm proporciona la mejor resolución del método usado. (Posteriormente, Kumaravel *et al.* (2009) señalan que esta medida no es suficientemente consistente).

Singh *et al.* (1988) con su versión alcalina, utilizan como parámetro principal la longitud de migración del DNA (longitud de la cola) para cuantificar la magnitud de daño. Posteriormente, algunos grupos de investigación han publicado artículos donde fueron utilizados una gran variedad de parámetros (área celular, coeficiente de variación del cometa, inercia del cometa, entre muchos otros). Sin embargo, con el paso del tiempo la mayoría de ellos han dejado de utilizarse.

Una aproximación de la evaluación del daño que ha marcado el desarrollo de los parámetros en el ensayo del cometa la describieron Olive *et al.* (1990a), quienes utilizaron el concepto de momento de la cola para describir la migración del DNA, parámetro que hoy es conocido como momento de la cola de Olive (OTM). Este parámetro se considera útil para describir la heterogeneidad de la respuesta dentro de una población celular, ya que su cálculo considera las variaciones de la distribución del DNA dentro de la cola.

En 1994, Anderson *et al.* desarrollaron un método basado en la clasificación del daño según la longitud de la migración expresada en μm . La distancia de la migración fue relacionada directamente con los tamaños de los fragmentos y, por consiguiente, con la magnitud del daño en el DNA. La longitud de migración pudo ser medida usando diferentes aproximaciones: con un micrómetro integrado en el objetivo del microscopio; con una regla métrica en la fotografía obtenida o en el monitor de la cámara; o mediante un sistema de análisis de imágenes. Pero los resultados obtenidos con los objetivos graduados son limitados, ya que estos son capaces de medir la distancia de migración desde el inicio de la cabeza (o centro de la misma), pero no proporcionan información sobre la cantidad de DNA en la cola, medida en la que se basan muchos parámetros para valorar el daño. Por esta razón, el uso de los sistemas de análisis de imágenes se ha ido generalizando.

Frecuentemente, el criterio utilizado para identificar los límites de la migración depende del investigador y/o del programa utilizado. Además, algunos investigadores utilizan el término “migración del DNA” para describir la longitud de la imagen total, mientras que otros aplican el mismo término para referirse sólo al DNA migrado. Una variante de este parámetro utiliza la proporción entre el largo y el ancho de la migración (Jostes *et al.*, 1993; Tice, 1995) o entre el ancho y el largo de la misma (Fairbairn *et al.*, 1993), donde en las células que no exhiben daño, esta proporción toma un valor que tiende a 1.

El método más sencillo desarrollado para la obtención de datos en el ensayo del cometa está basado en la determinación de la proporción de células con daño (*i.e.*, aquellas células que exhiben migración *versus* aquellas que no la exhiben (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 1996). Sin embargo, esta aproximación no proporciona información acerca de la medida del daño entre las células dañadas. Otra aproximación que fue ampliamente utilizada es la medición de la distancia de la migración desde el cuerpo nuclear, cuando se trata de células con bajo nivel de daño. Ahora bien, esta aproximación no es de mucha utilidad en situaciones donde el daño es relativamente alto, ya que el elevado nivel de daño está representado por el incremento de la intensidad de fluorescencia y no por el incremento en la migración.

Al observar las carencias inherentes a cada nuevo método, distintos científicos se dedicaron a buscar algún sistema más simple. Así, una nueva forma de conteo basada en la clasificación visual fue recomendada por Collins *et al.* (1995), método que resulta especialmente útil en aquellos laboratorios que no cuentan con experiencia previa en el ensayo del cometa, ya que no requiere ni de sistemas ni de programas sofisticados. El ojo humano es una herramienta capacitada para discernir distintos grados de daño, de acuerdo a la apariencia del cometa. El método consiste en clasificar el nivel de daño en 5 categorías que van de 0 (células sin migración) a 4 (casi todo el DNA en la cola), mostrando una muy buena resolución (**Figura 4**). Si se cuentan 100 cometas y cada uno es categorizado dentro del rango de 0 a 4 de acuerdo a su apariencia, el conteo total de la muestra (TCS) estará entre 0 y 400 unidades arbitrarias. Es decir, el TCS se calcula de la siguiente manera:

$$\text{TCS} = (\text{Porcentaje de células en clase 0}) \times 0 + (\text{porcentaje de células en clase 1}) \times 1 + (\text{porcentaje de células en clase 2}) \times 2 + (\text{porcentaje de células en clase 3}) \times 3 + (\text{porcentaje de células en clase 4}) \times 4$$

Este método, denominado conteo visual, se ha descrito como una aproximación rápida, simple y que no requiere de costosos sistemas de análisis, por lo que su uso ha sido ampliamente recomendado y utilizado (Collins *et al.*, 1997c).

Otra publicación interesante que utiliza este sistema de obtención de datos es la de Kobayashi *et al.* (1995), quienes también utilizan 5 clases de daño (Figura 5) pero sin calcular el conteo total de cada gel.

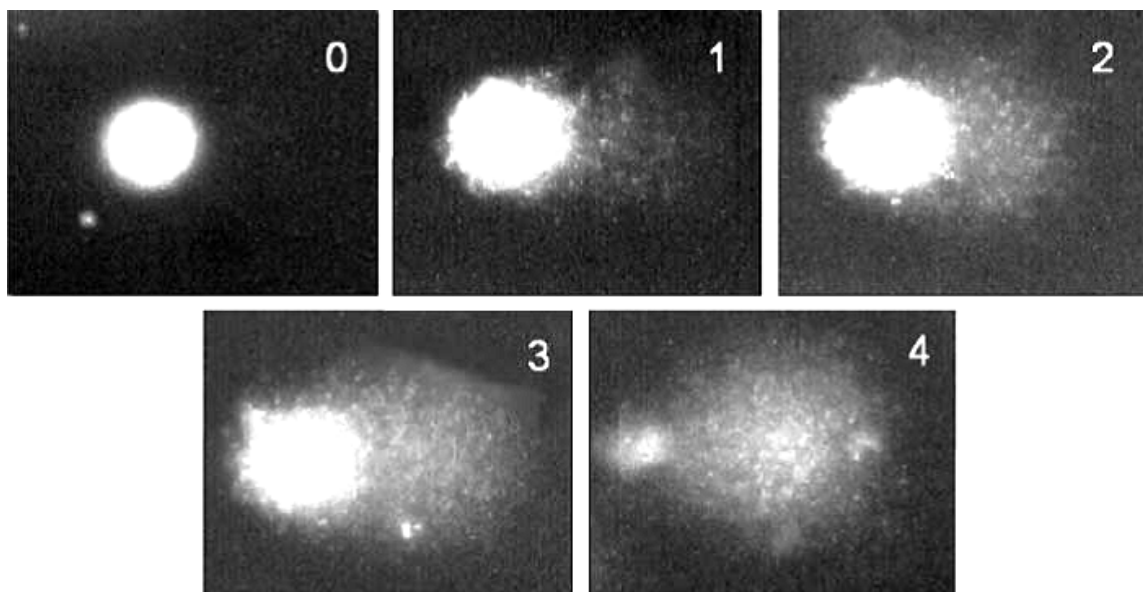


Figura 4: Clasificación visual sugerida por Collins *et al.*, 1995. Imágenes de cometas de linfocitos humanos teñidos con DAPI. Se representan las 5 categorías utilizadas en el análisis visual.

Estos dos últimos trabajos han demostrado que los resultados obtenidos con el sistema de conteo visual se correlacionan muy bien con las mediciones realizadas con el sistema de análisis de imágenes. Es interesante destacar que el sistema propuesto por Collins *et al.* (1995) se ha convertido en una metodología bastante popular, sobre todo en los estudios de biomonitorización y de

reparación de DNA, encontrándose alrededor de 70 publicaciones que indican haber usado este método (Møller, 2006b).

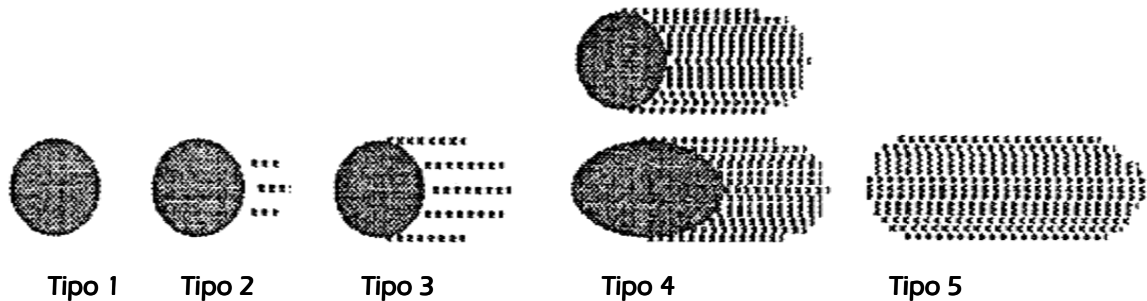


Figura 5: Clasificación visual esquemática utilizada por Kobayashi *et al.*, 1995. Se muestra la clasificación de las 5 clases de cometas.

En la actualidad, los parámetros más comúnmente utilizados son la longitud de la cola, la intensidad relativa de fluorescencia de la cabeza y de la cola, lo que normalmente se expresa como porcentaje de DNA en la cola (%DNA en la cola), y el momento de la cola (parámetros que se explicarán mas adelante). A pesar de que estos tres parámetros están bastante establecidos, todavía existe cierta discrepancia entre los autores que utilizan uno u otro.

4.5.2.2 Análisis de imágenes como sistema masivo de obtención de resultados

A pesar de que los métodos visuales desarrollados son útiles y válidos, el sistema de análisis de imágenes es hoy en día el método más utilizado ya que ha sido considerado como una forma fiable y reproducible, con un amplio rango de parámetros y que proporciona información adicional (*e.g.*, distribución del DNA dentro de la cola del cometa, contenido de DNA total). También puede aportar información acerca de las diferentes fases del ciclo celular, lo que puede resultar de gran utilidad a la hora de interpretar los resultados. Los programas específicos proporcionan herramientas como análisis estadísticos sencillos, elaboración de gráficos y plantillas para los datos.

Es difícil determinar cuál de los programas disponibles comercialmente se debe usar cuando se utiliza la técnica por primera vez. Existen diferentes paquetes de programas para medir un gran número de parámetros obtenidos mediante el análisis de imágenes. Estos parámetros se basan fundamentalmente en la intensidad de la fluorescencia emitida por el cometa (los llamados parámetros de intensidad de luz) de los cuales los dos más utilizados son el % de DNA en la cola y el OTM; y también en la geometría del cometa (los llamados parámetros geométricos) como, por ejemplo, la longitud de la cola. De cualquier manera, para entender qué mide y cómo se convierte la cantidad de fluorescencia emitida en nivel de daño, los principios de la metodología basada en la intensidad de la luz deben aclararse, ya que los distintos programas pueden diferir sutilmente en la manera de medir el daño (Vilhar, 2004).

El primer requisito para la visualización de los cometas es contar con un microscopio de fluorescencia equipado con los filtros apropiados y con un sistema de captura de imágenes (cámara). La cámara debe capturar la luz emitida desde cada punto del cometa y convertirla en señal eléctrica. Estas señales son posteriormente enviadas al computador junto con sus coordenadas y el computador descodifica las señales y muestra las correspondientes imágenes en la pantalla (**Figura 6**).

Una imagen está compuesta por pequeños puntos llamados píxeles y cada uno de ellos representa un elemento de luz sensible a la cámara. A cada píxel se le asigna un valor en una escala comprendida entre 0 y 225, que corresponde a la intensidad de luz detectada de cada píxel ("valores grises"), y se guardan en un archivo en el computador (**Figura 7**). Una vez que cada punto de la imagen es convertido en números, como se esquematiza en la **Figura 7**, se inicia el análisis de la imagen.

El siguiente paso es la definición de la cabeza y de la cola del cometa. Diferentes paquetes de *software* utilizan distintas aproximaciones para reconocer y delimitar estas estructuras (**Figura 8**).



Figura 6: Modelo de la imagen de un cometa. La luz emitida desde el cometa ubicado en la preparación es detectada como una imagen. En a) se muestra la imagen de un cometa real vista desde el microscopio. En b) se muestra que un modelo simplificado de la imagen del cometa que es usado para demostrar la medición de los parámetros del ensayo. En c) se muestra una imagen que esta construida de pixeles separados. El tamaño de esta imagen modelo del cometa es 35 x 25 pixeles. La imagen que captura la cámara tiene muchos pixeles (750 x 550, 1.300 x 1.030), por lo que no pueden ser discernidos los pixeles individualmente en a) a menos que el tamaño de la imagen sea enormemente distorsionada (Ex: Kumaravel *et al.*, 2009).

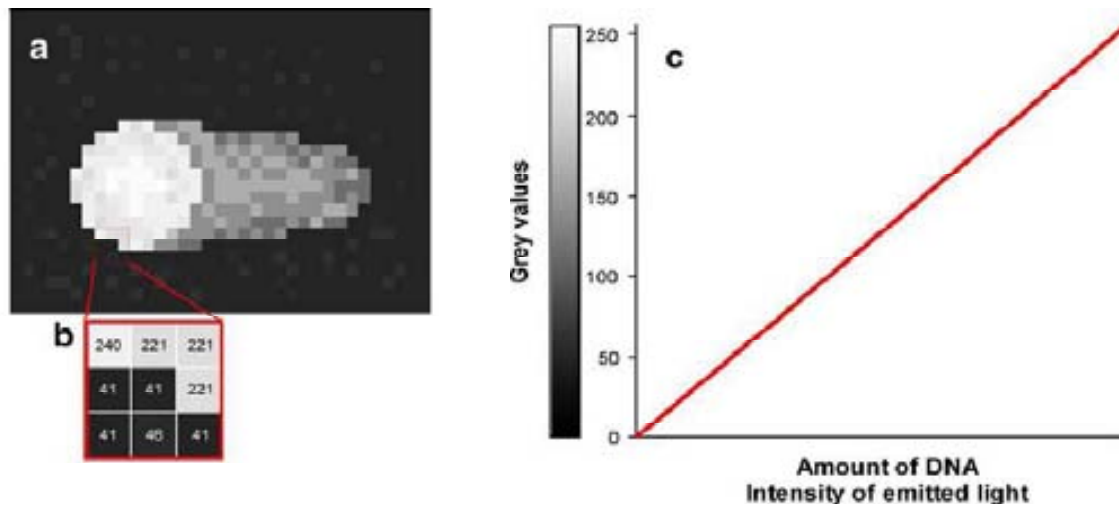


Figura 7: Conversión de la intensidad de luz a “valores grises”. La información de una imagen es codificada como valores grises. En a) se muestra una imagen del cometa compuesta por pixeles separados, donde cada pixel tiene un “valor gris” como se muestra en b) para cada pequeña área de la imagen delimitada en rojo en a). Un “valor gris” puede adoptar valores de 0 a 225, y la relación entre el valor gris de cada pixel de la imagen y la intensidad de la luz (fluorescencia) que la cámara detecta, es lineal (Ex: Kumaravel *et al.*, 2009).

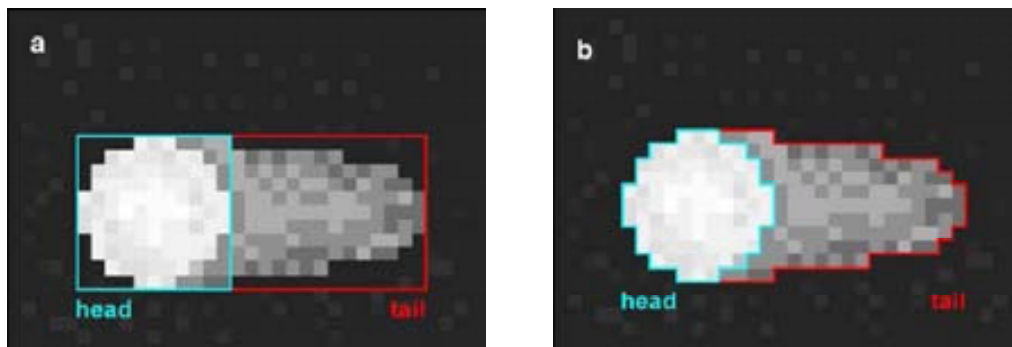


Figura 8: Segmentación de la imagen pixelada. Durante el paso de segmentación de la imagen son definidas las regiones de interés (ROI) para la medición de la cabeza y de la cola. En algunos programas, el usuario tiene la opción de interactuar con la imagen dibujando, según su propio criterio, cuadrados que definan la ROI de la cabeza y de la cola **(a)** cuadro de segmentación. En otros programas, las ROI son detectadas y delimitadas automáticamente **(b)** segmentación ajustada a la forma del cometa (Ex: Kumaravel *et al.*, 2009).

Una vez se han delimitado la cabeza y la cola del cometa, se mide la longitud de la última en términos de píxeles, que posteriormente son convertidos a micrones. La intensidad de la luz que se origina desde la cabeza y desde la cola se utilizan para calcular los diferentes parámetros **(Figura 8)**.

Para obtener la verdadera fluorescencia que emite la imagen, se sustrae la intensidad del ruido de fondo a la intensidad de la cabeza y de la cola, como se muestra en la **Tabla IV**. Los datos de los cuadros de segmentación de la imagen modelo mostradas en la figura 8 están resumidos tomando como ejemplo la columna del pixel 8 mostrada en azul. El rectángulo estrecho representado en la imagen modelo de 4 píxeles de ancho es usado como ruido de fondo (ver la **Figura 9**).

Basándonos en estos principios de transformación de luz a valores grises, a continuación se describen los dos parámetros mayormente utilizados en el sistema de análisis de imágenes **(Figura 10)**.

centros de masa no son más que el punto que deja la mitad de la intensidad a la derecha y la otra mitad a la izquierda de cada una de las partes (de la cabeza y de la cola). La posición de estos puntos también puede ser determinada utilizando la **Tabla IV**. El OTM es un parámetro absoluto, utilizándose el micrómetro como unidad de medida.

Tabla IV: Sustracción de la señal del ruido de fondo para cada columna de pixeles del cometa de la imagen modelo.

ROI	Número de columnas de pixeles	Intensidad registrada del cometa (suma de 11 pixeles)	Intensidad del ruido de fondo registrada (suma de 4 pixeles)	Media de la intensidad del ruido de fondo (por pixel)	Intensidad general del ruido de fondo (por 11 pixeles)	Intensidad del cometa corregida (suma de 11 pixeles)	Intensidad del cometa acumulada
Cabeza	1	1010	169	42	465	545	545
	2	1801	174	44	479	1323	1868
	3	2165	164	41	451	1714	3582
	4	2215	164	41	451	1764	5346
	5	2593	164	41	451	2142	7488
	6	2646	164	41	451	2195	9683
	7	2604	164	41	451	2153	11836
	8	2443	169	42	465	1978	13814
	9	2336	164	41	451	1885	15699
	10	2213	169	42	465	1748	17447
	11	1877	164	41	451	1426	18873
Cola	12	1476	169	42	465	1011	1011
	13	1439	169	42	465	974	1985
	14	1471	164	41	451	1020	3005
	15	1379	169	42	465	914	3920
	16	1440	164	41	451	989	4909
	17	1349	164	41	451	898	5807
	18	1349	179	45	492	857	6663
	19	1310	164	41	451	859	7522
	20	1149	179	45	492	657	8179
	21	1210	164	41	451	759	8938
	22	1150	169	42	465	685	9623
	23	1062	164	41	451	611	10234
	24	929	164	41	451	478	10712
	25	658	164	41	451	207	10919

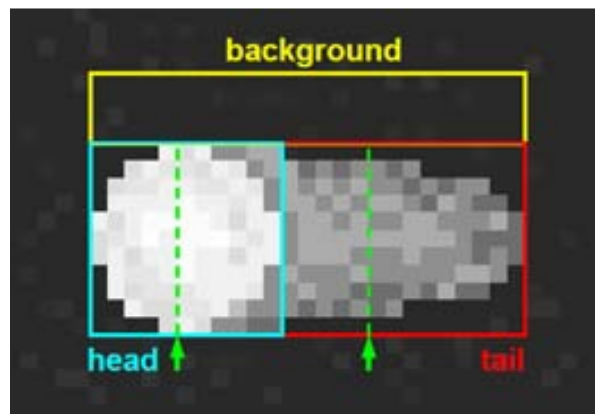


Figura 10: Posición de los centros de masa de la cabeza y de la cola mostrando la distancia entre ellos. Medida que se utiliza para calcular el OTM (Ex: Vilhar, 2004).

4.5.2.3 Análisis, interpretación y presentación de los resultados de los ensayos *in vitro*

La unidad experimental de exposición para los experimentos *in vitro* es el cultivo, y todos los análisis estadísticos deben estar basados en la respuesta individual de cada uno de ellos. Para cada grupo de dosis se debe calcular la migración media del DNA junto con su error, así como también para cada cultivo dentro de un grupo de dosis. Normalmente, deben incluirse las medidas de citotoxicidad para todos los cultivos y grupos de dosis, incluyendo los controles negativos y positivos. Según las recomendaciones del panel de expertos (IWGTP, International Workshop on Genotoxicity Test Procedures) expuesto por Singh *et al.* (2000), los resultados de cada experimento deben ser verificados, al menos una vez, en un experimento independiente.

Existen numerosos criterios para la determinación de resultados positivos en el ensayo del cometa *in vitro*, los que incluyen incrementos de la respuesta en términos de migración del DNA, dependientes de la concentración, y un incremento significativo en uno o más grupos de dosis. Deben usarse métodos estadísticos como ayuda en la evaluación de los resultados, pero no debieran ser el único factor que determine que un resultado es positivo. Aunque el panel de expertos no ha llegado a un consenso sobre qué método estadístico es el

más apropiado, hay coincidencia en que el análisis debe estar basado en la respuesta individual de cada cultivo.

Los tests estadísticos utilizados deben ser de una cola si sólo está siendo evaluado un incremento o una disminución de la migración de DNA; y debe ser de dos colas si pueden ocurrir ambas, un incremento o una disminución de la migración del DNA.

En los casos donde se obtienen resultados positivos, es importante que el investigador evalúe la posibilidad de que el incremento en la migración no esté asociado a la genotoxicidad. Puede ser de mucha utilidad contar con información adicional, como la medida de la toxicidad asociada con cada grupo de dosis positiva, la naturaleza de la curva dosis-respuesta, la distribución intercelular de la respuesta del cometa en cada dosis y la presencia de DBS en la población de células tratadas.

Aunque en un experimento se obtengan claros resultados positivos o negativos, estos resultados deben ser confirmados en repeticiones independientes. La reproducibilidad de los resultados de los experimentos independientes se considera como una evidencia fuerte de los mismos, ya sean negativos o positivos. Sin embargo, los resultados pueden ser cuestionables cuando son poco reproducibles.

En la interpretación de los resultados, los valores repetidamente positivos indican que el agente evaluado induce daño en el DNA; por el contrario, si los resultados obtenidos son repetidamente negativos, el agente bajo las condiciones experimentales, no induce daño en el DNA.

Un buen informe sobre los resultados obtenidos en un experimento del cometa debe incluir la información que se menciona a continuación, pero no necesariamente limitarse a la misma:

- Agente evaluado: identificación y número CAS si es conocido; naturaleza física y pureza; propiedades fisicoquímicas relevantes que permitieron tomar decisiones al respecto del estudio y su estabilidad.
- Disolvente o vehículo: justificación de su elección; solubilidad y estabilidad del agente evaluado en el solvente utilizado.

- Células: tipo y fuente de las células y, cuando corresponda, número de pasajes celulares; método de mantenimiento del cultivo celular; ausencia de micoplasma; género de(los) donante(s) de las células, si procede.
- Condiciones de la evaluación: criterios de selección; número de cultivos por grupo de dosis; datos de citotoxicidad; límites de solubilidad; volumen de disolvente; temperatura y duración de la incubación; duración del tratamiento; densidad celular durante el tratamiento; tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluyendo criterios de aceptación; controles positivos y negativos; método de preparación de los portaobjetos, incluyendo la concentración de agarosa; condiciones de lisis; condiciones del tratamiento alcalino incluyendo pH y tiempo de duración; condiciones de electroforesis incluyendo pH, V/cm, mA y tiempo de duración; tinción utilizada y procedimiento; criterios de contabilización de los cometas; número de cometas analizados por muestra, por cultivo y por grupo de dosis; metodología empleada para la medición de la toxicidad; criterios para considerar el estudio positivo, negativo o inconcluyente.
- Discusión de los resultados.
- Conclusión final.

4.5.2.4 Análisis, interpretación y presentación de los resultados de los ensayos *in vivo*

La obtención de resultados en el ensayo del cometa *in vivo* debe estar basada en el conteo de 100 células por animal, o sea, 50 células por cada réplica. Además, los portaobjetos deben estar codificados independientemente, sin el conocimiento previo de estos códigos por parte del investigador.

Para los experimentos *in vivo*, la unidad experimental es el individuo. Por lo tanto, todos los análisis estadísticos deben estar basados en los datos obtenidos de la respuesta individual; la migración media del DNA con su respectivo indicador de error, debe ser calculada para cada grupo de dosis, así como también para cada animal. También se deben presentar las medidas de toxicidad para cada animal por cada grupo de dosis, incluyendo el disolvente y

el control positivo. Los experimentos que no arrojen resultados claramente positivos o negativos, deben ser verificados de manera independiente y debe ser tomada en cuenta cualquier modificación de parámetros (*e.g.*, escala del rango de concentraciones) en la repetición del experimento.

Los criterios para la determinación de resultados positivos y los métodos estadísticos a utilizar en la evaluación de los resultados obtenidos, son básicamente los mismos que en los estudios *in vitro*. Aunque el panel de expertos no ha llegado a un consenso, se considera que el análisis debe estar basado en la respuesta individual de cada espécimen.

Los tests estadísticos deben ser de una cola si sólo se evalúa un incremento o una disminución de la migración de DNA; o de dos colas si pueden ocurrir ambas cosas.

En los casos donde se obtienen resultados positivos es muy importante que el investigador evalúe la posibilidad de que el incremento en la migración no esté asociado a la genotoxicidad. Puede ser de gran utilidad contar con información adicional como la medida de la toxicidad para cada grupo de dosis positiva, la naturaleza de la curva dosis-respuesta, la distribución intercelular de la respuesta del cometa en cada dosis y la presencia de DBS en la población de células tratadas.

En cuanto a la interpretación, los resultados positivos obtenidos en el ensayo del cometa *in vivo* indican que el agente evaluado induce daño en el DNA en el tejido blanco; por el contrario, si los resultados son negativos, el agente no induce daño en el DNA en el tejido blanco evaluado bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Finalmente, un buen informe debe contener, además de los datos ya mencionados para los estudios *in vitro*, los siguientes:

- Animal de evaluación: especie/cepa; número; edad y género del animal; fuente y condiciones de mantenimiento; dieta; peso individual al inicio del experimento, incluyendo el rango, media y desviación estándar para cada grupo.

- Condiciones del experimento: detalles acerca de la administración del agente evaluado; análisis razonado de la ruta de la administración; métodos para verificar que el agente ha alcanzado la circulación general o el tejido blanco, si procede; conversión de la concentración del agente evaluado de partes por millón (ppm) a dosis expresadas en mg/Kg de peso por día; detalles sobre la calidad de la alimentación y agua; descripción de los tratamientos y de los momentos de muestreo; metodología de evaluación de la toxicidad; metodología detallada de la obtención de células aisladas; método de preparación de los portaobjetos, incluyendo las concentraciones de agarosa; condiciones de lisis; condiciones del tratamiento alcalino, incluyendo pH y duración; condiciones de electroforesis, incluyendo los datos de V/cm, mA, pH; proceso de tinción; criterios de visualización y recuento de las cometas; número de cometas analizados por portaobjeto, por tejido, por animal, por grupo de dosis; criterios utilizados para concluir si los resultados son positivos, negativos o inconcluyentes.
- Resultados: valores de migración del DNA por tejido individual, por animal y por grupo de dosis; relación dosis-respuesta, si se dispone; datos de los controles positivos y negativos concurrentes; datos históricos de controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos.
- Discusión de los resultados.
- Conclusiones finales.

5. Ventajas e inconvenientes del ensayo

Una técnica de evaluación del daño del DNA debe ser sensible y cuantitativa, ha de proporcionar datos a nivel individual y debe ser aplicable a poblaciones celulares diversas.

El ensayo del cometa ha demostrado ser una técnica muy sensible a la hora de evaluar daño en el DNA en una amplia variedad de células, dañadas por distintos agentes tanto físicos como químicos. Permite establecer relaciones dosis-respuesta a bajas dosis (*i.e.*, niveles bajos de daño), y respecto a otras técnicas genotoxicológicas tales como las de aberraciones cromosómicas (CA),

intercambios entre cromátidas hermanas (SCE), elución alcalina (AE) y micronúcleos (MN), el ensayo del cometa ha demostrado una gran sensibilidad, detectando entre 50 y 15.000 roturas por célula (Piperakis, 2009).

El ensayo es capaz de detectar daño genético y su reparación en moléculas de DNA altamente compactadas con eficacia y exactitud, en comparación con otras técnicas como la HPLC, la elución alcalina y la sedimentación de nucleoides, entre otras. En éstas, el daño que se detecta está estrechamente ligado al proceso de obtención del DNA, por lo que los daños basales obtenidos con dichas técnicas no se consideran completamente fiables (Green *et al.*, 1996; Collins, 2004; Gedik *et al.*, 2005).

El hecho de que el ensayo del cometa tenga la capacidad de detectar daño en células individualizadas y que se pueda medir en un gran número de ellas (cientos e incluso miles) de diferentes tejidos, constituye una de las principales ventajas del ensayo (Lovell y Omori, 2008). De esta manera, los datos que son obtenidos a nivel individual pueden aportar información sobre la heterogeneidad de una muestra (Strauss *et al.*, 1994). Así, el ensayo del cometa permite detectar diferencias intercelulares, tanto de la respuesta al daño como de su reparación. Además, se requiere un bajo número de células para realizar un ensayo.

Potencialmente cualquier tipo celular, tanto procariota (Singh *et al.*, 1999) como eucariota puede ser utilizado; sólo se requiere que las células estén en suspensión y aisladas. Existen técnicas para la obtención de células individualizadas a partir de tejidos compactos (Spanswick *et al.*, 1999), pudiendo realizarse el ensayo con células recién obtenidas (frescas) o con células criopreservadas por un largo periodo de tiempo.

Es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa una gran ventaja sobre otras técnicas citogenéticas. Además, en términos de biomonitorización humana, se puede aplicar el ensayo a células que son el primer sitio de contacto con sustancias mutagénicas/carcinogénicas (*e.g.*, mucosa oral y nasal).

El ensayo posee una gran flexibilidad. Tal como ya se ha comentado, es capaz de detectar una amplia variedad de lesiones en el DNA (SSB, DSB, ALS, roturas transitorias de reparación, enlaces cruzados y aductos) y es posible disponer de datos finales el mismo día de la obtención de la muestra.

Entre las desventajas, el tema de la sensibilidad es algo paradójico ya que está ligado a su gran variabilidad. Pequeñas variaciones en las condiciones del ensayo pueden verse reflejadas en los resultados; es por esta razón, que la validación del ensayo del cometa a nivel interlaboratorio ha sido una tarea ardua desde los inicios de su aplicación.

Dentro de las variables que más afectan a la técnica se encuentran: la concentración de la agarosa y de las disoluciones, el pH, la duración de cada etapa (principalmente de la desnaturalización y de la electroforesis) (Forchhammer *et al.*, 2008), el uso de enzimas, proceso de obtención de resultados, el observador, etc.

Un factor limitante del ensayo es que no detecta efectos aneugénicos, los cuales pueden ser eventos claves en el desarrollo de un proceso de carcinogénesis (COM, 2000).

Otra desventaja de la técnica es la introducción de sesgos; por ejemplo, el que se cuente con una cantidad determinada de células en un área de la muestra aumenta la probabilidad de sesgo y, por lo tanto, la variabilidad entre los observadores. McArt *et al.* (2009a) han investigado una opción de análisis para minimizar los sesgos de selección en el recuento y, al mismo tiempo, ofrece una mayor reproducibilidad entre usuarios, incorporando el método denominado muestreo sistemático aleatorio (SRS), que consiste en dar a todos los cometas de una preparación la misma probabilidad de ser contabilizados (McArt *et al.*, 2009b).

Otra de las limitaciones del ensayo es que no existe un acuerdo generalizado en cuanto al tratamiento estadístico de los datos, aunque numerosos autores han hecho contribuciones relevantes a este respecto (Ejchart y Sadlej-Sosnowska, 2003; Wiklund y Agurell, 2003; Lovell y Omori, 2008).

Un determinante importante, respecto de la sensibilidad, es la elección de la(s) línea(s) celular(es) adecuada(s) cuando se trabaja *in vitro*, ya que no todas responden de la misma manera a los diferentes agentes que se quiere evaluar. Por ejemplo, Moneef *et al.* (2003), detectaron diferencias en la radiosensibilidad y la radioresistencia de 6 líneas celulares, todas provenientes de tumor de vejiga.

Una de las desventajas más relevantes del ensayo radica en el desconocimiento de los principales mecanismos de formación del cometa y en saber hasta que punto la naturaleza del cometa refleja el daño genético ocurrido.

A pesar de esta serie de desventajas, la técnica del cometa ha sido ampliamente valorada y adoptada a nivel mundial, aplicándose a numerosas áreas, desde la genética toxicológica a la epidemiología molecular en humanos (Dhawan *et al.*, 2009).

6. Aplicaciones

Como ya se ha mencionado, dentro de las ventajas que el ensayo del cometa posee, destaca su aplicación a una amplia gama de tipos celulares. Esta ventaja ha conducido a que este ensayo sea ampliamente utilizado en el área de la toxicología ambiental, empleándose distintos modelos biológicos como se esquematiza en la **Figura 11**, pudiéndose evaluar, tanto *in vivo* como *in vitro*, el daño basal e inducido, como la cinética de reparación del mismo.

El **ANEXO II** resume, en forma tabulada, las aplicaciones del ensayo del cometa utilizando desde bacterias hasta humanos, para realizar estudios que van desde la toxicología ambiental hasta la epidemiología molecular, siendo en la biomonitorización de poblaciones humanas donde el ensayo del cometa ha sido mayormente aplicado en los últimos años.

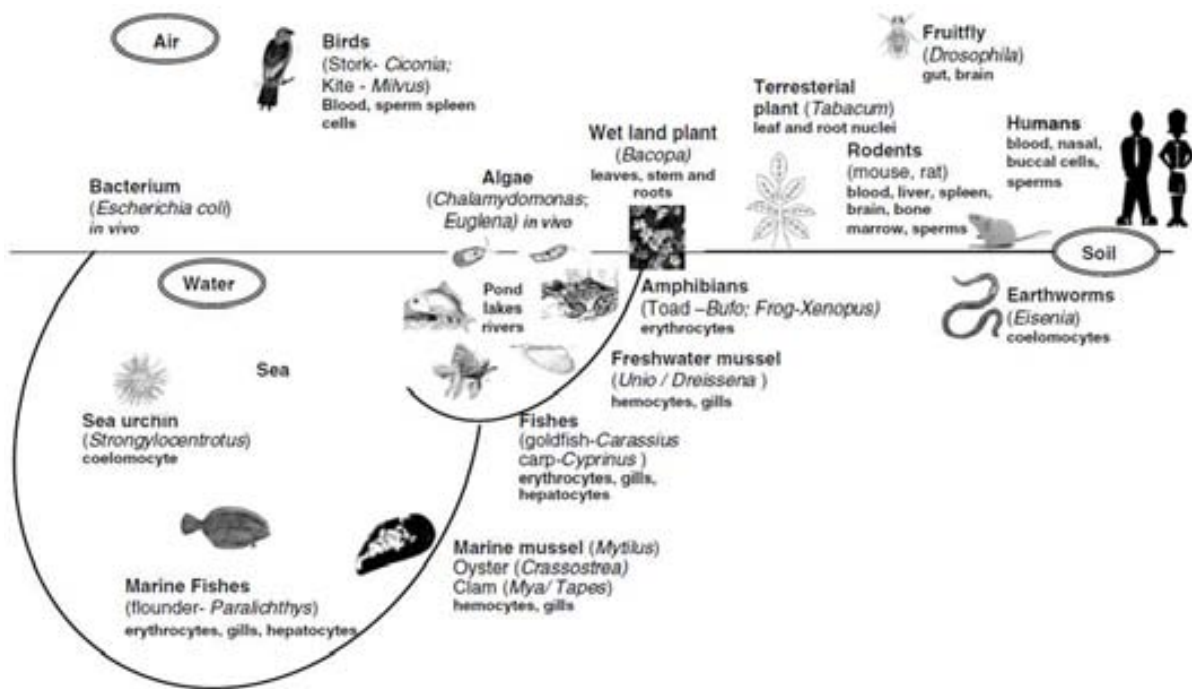


Figura 11: Diagrama esquemático de la aplicación del ensayo del cometa para la evaluación del daño en el DNA en distintos modelos, desde bacterias a humanos (Ex: Dhawan *et al.*, 2009).

6.1 Estudios de genotoxicidad

El ensayo del cometa ha logrado posicionarse en una situación privilegiada dentro de las baterías de ensayos utilizadas para evaluar la seguridad de nuevos productos farmacéuticos u otros agentes (Hartmann *et al.*, 2003). Se han realizado numerosos estudios en este ámbito utilizando células tanto vegetales como animales, ya que en principio, se pueden utilizar células de cualquier tejido u organismo. En animales, los más utilizados son: sangre, médula ósea, tejido cerebral, mucosa gastrointestinal, hígado, pulmón, riñón, mucosa nasal, piel, bazo, gónadas y gametos. En plantas, se utilizan principalmente las células de hojas, tallos y raíces, así como las de los meristemos apicales y radicales. El único requisito es obtener una cantidad suficiente de células para aplicar el ensayo, sin la introducción de daño adicional producido por la acción química y/o mecánica de la disgregación celular. Para la disgregación química, la colagenasa y la tripsina son los compuestos más recomendados (Pool-Zobel *et al.*, 1992). Para la disgregación mecánica del tejido se suele usar un tampón frío de NaCl y EDTA para obtener una

suspensión de núcleos (Sasaki *et al.*, 1997). Dependiendo de las condiciones intrínsecas del órgano o tejido, es posible mejorar el aislamiento de las células mediante la utilización de agentes específicos como la *N*-terbutil- α -fenilnitrona (Singh *et al.*, 1995). Algunos grupos utilizan la misma metodología para la obtención de células individualizadas pero al parecer, las condiciones óptimas son diferentes para cada tejido. Las líneas celulares animales usadas son principalmente de roedores, siendo las más utilizadas las siguientes: CHO, HIT-T15, V-79, L5178, SCCVII y cultivos primarios de hepatocitos.

El primer estudio de genotoxicidad que utilizó el ensayo del cometa evaluó el potencial mutagénico de agentes generados por el tratamiento de permanganato de potasio con soluciones ácidas (DeMeo *et al.*, 1991). Desde este primer estudio hasta hoy, se han evaluado numerosos compuestos tales como: metales pesados, pesticidas, nitrosaminas, fármacos antineoplásicos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, peróxidos, etc.

La mayoría de estudios *in vivo* para evaluar genotoxicidad utilizando el ensayo del cometa se han llevado a cabo en ratones. Los resultados obtenidos son particularmente llamativos ya que aportan información acerca de la distribución del daño en los tejidos. Hay que señalar que la actuación de los agentes genotóxicos no siempre produce resultados positivos, dependiendo del sistema del ensayo (Pool-Zobel *et al.*, 1992).

6.2 Aplicaciones clínicas

Las aplicaciones clínicas del ensayo del cometa fueron ya propuestas por Östling *et al.* (1987), quienes utilizaron la versión neutra para evaluar niveles del daño en el DNA en células tumorales de pacientes que estaban recibiendo radioterapia. Olive *et al.* (1993) utilizaron la versión a pH 12,3 para determinar el número de células hipóxicas en cáncer de mama, basándose en la insensibilidad relativa a la radiación X en un rango de dosis de 5 a 10 Gy. Las diferencias encontradas en la respuesta a la radiación de los tumores del mismo tipo, tamaño y grado se atribuyen principalmente a la heterogeneidad y, en particular, a diferencias intrínsecas de radiosensibilidad, cinética de crecimiento

del tumor y a la presencia de subpoblaciones resistentes, tales como las células hipóxicas. A este respecto, el ensayo del cometa puede proporcionar información sobre un amplio número de propiedades de las células tumorales que se sabe que influyen en tales respuestas como la inherente sensibilidad a un tratamiento en particular, la proporción de células en crecimiento y la presencia o carencia de oxígeno (Fairbairn *et al.*, 1995; McLaren *et al.*, 1997; Olive *et al.*, 1997; Olive, 1999, 2009).

Kleiman y Spector (1993) utilizaron la versión alcalina del ensayo para determinar el daño en el DNA en células epiteliales del cristalino de pacientes que padecían de cataratas y de controles sanos. Además, se han llevado a cabo otros estudios en células epiteliales de vejiga obtenidas a partir de orina de pacientes con cáncer de vejiga (McKelvey-Martin *et al.*, 1992).

Este ensayo ha sido propuesto para la predicción de la respuesta de las células sometidas a quimioterapia. Tice *et al.* (1992) evaluaron los niveles de daño en el DNA en linfocitos criopreservados obtenidos de 11 pacientes con cáncer de mama tratados con altas dosis de ciclofosfamida y cisplatino y que, después del tratamiento, se sometieron a un trasplante autólogo de médula ósea. La quimioterapia incrementó significativamente el daño en las células de todas las pacientes aunque con una amplia variabilidad. Vaghef *et al.* (1997) también observaron un incremento variable del daño en el DNA después de la quimioterapia con ciclofosfamida, 5-fluorouracilo y epirubicina en pacientes con el mismo tipo de cáncer.

Actualmente el ensayo del cometa cumple un papel muy importante en los estudios sobre los mecanismos de acción de nuevos fármacos, así como en el análisis de las interacciones entre los agentes antineoplásicos que actúan a nivel del DNA. Al respecto, Kasamatsu *et al.* (1996a, b) concluyeron que los mecanismos involucrados en la inducción de daño en el DNA pueden variar dependiendo del agente empleado. Algunos no requieren activación metabólica (agentes directos), otros sí, y otros inducen el daño afectando las funciones celulares.

Otro hallazgo interesante fue que el daño basal en los linfocitos de pacientes con diferentes clases de cáncer y sin ningún tipo de tratamiento fue

mayor que el daño detectado en linfocitos de personas sin cáncer. Esto refleja que las enfermedades cancerosas están asociadas a una mayor inestabilidad genética (Rao *et al.*, 1997; Vaghef *et al.*, 1997; Baltaci *et al.*, 2002; Palyvoda *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

En el Reino Unido, donde los dos principales tratamientos para el cáncer invasivo de vejiga son la radioterapia y la cistectomía, se observa que aproximadamente el 50% de los pacientes no responden positivamente a la radioterapia. En un estudio llevado a cabo por Moneef *et al.* (2003), se propone que el ensayo del cometa podría predecir si el tumor será sensible, posibilitando el control de crecimiento del tumor en aquellos pacientes donde la radioterapia sí es efectiva. El estudio se llevó a cabo en 6 líneas celulares de cáncer de vejiga con diferente radiosensibilidad. Mediante la utilización del ensayo del cometa en su versión alcalina se comparó la supervivencia celular con la manifestación de daño en el DNA inducido por la radiación, encontrándose una fuerte relación entre la magnitud de daño y la muerte celular, con una mayor respuesta en las células radiosensibles. Para 5 de las 6 líneas celulares evaluadas en este estudio, la reparación también presentó una fuerte correlación con el porcentaje de células sobrevivientes a 2 Gy. Así, Moneef *et al.* (2003) concluyeron, en concordancia con otros estudios (McKeown *et al.*, 2003), que el ensayo del cometa en su versión alcalina puede predecir la radiosensibilidad de las células de cáncer de vejiga obtenidas mediante biopsias, proponiendo el ensayo como una buena herramienta de aplicación clínica.

Hoy en día existen varios estudios que han utilizado el ensayo del cometa para investigar el daño en el DNA y las características de reparación en un amplio rango de células tumorales (tanto de líneas celulares como de material de biopsias), en respuesta a una variedad de agentes que inducen daño en el DNA (**Tabla V**).

Muchos de estos estudios muestran resultados que proporcionan una valiosa información acerca de la naturaleza de un cáncer en particular, la cual puede ser utilizada por los especialistas para escoger el tratamiento más adecuado para cada uno de los pacientes, teniendo en cuenta la susceptibilidad individual (McKenna *et al.*, 2008). Además, el hecho de que los resultados del

ensayo puedan ser obtenidos en el mismo día de su aplicación, lo convierte en un método útil para la valoración del daño genético en pacientes asociado a un régimen de tratamiento, que puede ser modificado convenientemente (Tice, 1995).

Tabla V: Estudios que han utilizado el ensayo del cometa en células extraídas de biopsias de tumores en humanos. Todos los estudios citados utilizaron la versión alcalina, a menos que se indique otra versión.

Tipo de tumor	Células examinadas	Resultados	Referencia
Esofágico	Biopsia de la mucosa de esófago de Barrett y adenocarcinoma esofágico.	Incremento significativo del daño en el DNA en el grupo con cáncer comparado con el grupo control.	Olliver <i>et al.</i> , 2005
Colorectal	Biopsia de adenocarcinoma colorectal.	Incremento significativo del daño en el DNA en el grupo con cáncer comparado con el grupo control.	Baltaci <i>et al.</i> , 2002
Colon	Células epiteliales aisladas de biopsia de colon.	El ensayo del cometa con BrdU detecta defectos en la replicación en tumores y en células del colon pre-malignas.	McGlynn <i>et al.</i> , 2003
Mama	Células tumorales obtenidas mediante aspiración con aguja fina.	Daño en el DNA relacionado con el metabolismo de la ifosfamida y la doxorubicina.	Johnstone <i>et al.</i> , 2000
Mama	Células tumorales obtenidas mediante aspiración con aguja fina, inmediatamente después de la radioterapia.	Se detectan células tumorales hipóxicas después del daño inducido por la radiación.	Olive <i>et al.</i> , 1993 Olive <i>et al.</i> , 1996
Pulmón	Células linfoides de pacientes con cáncer de pulmón.	Incremento significativo del daño en los pacientes en comparación con el grupo control.	Zhang <i>et al.</i> , 2002
Próstata	Células epiteliales y estromáticas aisladas de biopsia de adenocarcinoma de próstata.	Incremento de la apoptosis celular después del tratamiento con hormona análoga a gonadotropina.	Sánchez <i>et al.</i> , 2004; Castellón <i>et al.</i> , 2006
Cervical	Fibroblastos derivados de biopsia vaginal de pacientes, previa a la radioterapia.	El ensayo neutro del cometa mostró un rango de radioasensibilidad relacionado con el ensayo clonogénico SF2.	Eastham <i>et al.</i> , 1999
Cabeza y cuello	Biopsia de células epiteliales de carcinoma de células escamosas de la	Mutágenos ambientales causan incremento del daño en el DNA y en la	Kleinsasser <i>et al.</i> , 2000

	laringe y orofaringe.	genotoxicidad en el grupo de pacientes con cáncer comparado con el grupo control.	
Cabeza y cuello	Aspiración con aguja fina realizada 1, 2 ó 3 minutos después de radioterapia en la zona local del ganglio linfático mayor.	Variación entre tumores en la radiosensibilidad detectada debido a hipoxia.	Le <i>et al.</i> , 2003
Cabeza y cuello	Aspiración con aguja fina de ganglios linfáticos conteniendo metástasis de carcinoma de células escamosas.	Daño y reparación del DNA medidos adecuadamente después de la irradiación.	Terris <i>et al.</i> , 2002
Varios tumores metastásicos	Aspiración con aguja fina de tumores metastásicos accesibles.	Células tumorales hipóxicas detectadas después de la inducción de daño por irradiación.	McLaren <i>et al.</i> , 1997; Olive <i>et al.</i> , 2001
Varios tumores metastásicos	Aspiración con aguja fina de tumores metastásicos accesibles inmediatamente después de la radioterapia.	Células tumorales hipóxicas detectadas después de la inducción de daño por irradiación.	Aquino-Parsons <i>et al.</i> , 1999

6.3 Estudios de reparación del DNA

Sorprendentemente, se sabe relativamente poco acerca de la variación en la capacidad de reparación del DNA entre individuos, a pesar de que, probablemente, sea uno de los factores más importantes en cuanto a la susceptibilidad individual al cáncer. La reparación del DNA es la segunda línea de defensa contra la acción de los agentes genotóxicos y la mayoría del daño es eliminado antes de que la célula empiece la replicación, que es cuando los daños producidos pueden ser fijados como mutaciones. Es evidente que la capacidad de reparación puede influir en el riesgo de cáncer y, de hecho, algunas enfermedades raras con defectos en los genes que codifican proteínas de reparación (*e.g.*, *xeroderma pigmentosum*) se caracterizan por un incremento extremadamente elevado en la incidencia el desarrollo de cáncer. Sin embargo, es conocido que la amplia variación en la reparación del DNA en la población en general resulta de la modulación intrínseca o ambiental de la expresión de los genes o de la actividad enzimática. Se han explorado dos aproximaciones utilizando en ambas el ensayo del cometa. La primera (Collins y Horváthová,

2001) consiste en la incubación de células dañadas *in vitro* a diferentes intervalos y someterlas al ensayo del cometa para estimar la cantidad de daño remanente. Así, por ejemplo, los linfocitos pueden ser tratados con peróxido de hidrógeno o radiación ionizante y enseguida permitir que reparen; o bien permitir la eliminación de las lesiones en las bases mediante incubación con endonucleasas apropiadas.

El proceso de reparación de las roturas del DNA es bastante conocido en muchos tipos de células, se trata de un proceso rápido de pocos minutos de duración (Frankenber-Schwager, 1989), pudiéndose evaluar su cinética con el ensayo del cometa; sin embargo, los linfocitos asilados aparentemente reparan el daño producido por H₂O₂ lentamente, y es probable que se deba a la inducción de daño adicional por la repentina exposición al oxígeno atmosférico durante la incubación de reparación (Torbergsen y Collins, 2000).

El proceso de reparación por escisión de bases mediante enzimas específicas, como por ejemplo FPG o EndoIII, que reconocen las purinas y pirimidinas oxidadas, respectivamente, es un proceso lento que requiere de unas cuantas horas (Collins y Horváthová, 2001). La reparación de los dímeros de pirimidina inducidos por la radiación UV llevada a cabo mediante la reparación por escisión de nucleótidos (NER) puede ser detectada con la endonucleasa T4 V, y también es un proceso lento (Collins *et al.*, 1997b).

Una alternativa para el seguimiento de la reparación celular es un ensayo *in vitro* que mida la capacidad de reparación de un extracto celular (Collins *et al.*, 2001b); es decir, se prepara un extracto celular a partir de linfocitos, por ejemplo, y se evalúa su capacidad de reparación mediante la incubación con substratos celulares dañados y embebidos en agarosa, para la aplicación posterior del ensayo del cometa (núcleos de células con un nivel de daño conocido). Este método fue desarrollado por primera vez para la evaluación de la eficiencia de reparación de bases oxidadas en substratos tratados con un agente oxidante (Ro 19-8022) que, junto con luz visible, induce principalmente 8-hidroxi guanina (8-OHG).

A partir de estos experimentos, han surgido numerosas investigaciones cuyo objetivo es evaluar la capacidad de reparación de una amplia gama de tipos celulares, tanto *in vitro* como *ex vivo*.

Hasta el desarrollo del ensayo del cometa, no había sido posible medir la velocidad de la reparación entre unas células y otras. Esto significa que cuando se había reparado el 50% del daño, se podía interpretar que en este momento el 100% de las células han reparado el 50% de su daño, o bien, un 50% de las células habían reparado la totalidad del daño y el otro 50% no habían sido capaces de hacerlo. Con la ayuda del ensayo del cometa se pudo dilucidar que la tasa inicial de reparación del daño inducido por la radiación ionizante fue similar en todas las células de una población (Olive *et al.*, 1994), aunque la reparación en un subgrupo de células en la fase G1 aparentara actuar más rápidamente sobre las SSB (Olive y Banáth, 1993). Tice y Strauss (1995), así como otros autores (Olive *et al.*, 1990a y 1991; Singh *et al.*, 1994) consideran que las SSB y las DSB son generalmente reparadas en células normales y que el 50% de ellas lo hacen durante los primeros 15 minutos. La completa reparación ocurre en un intervalo de dos horas.

Como ya se ha comentado, aquellas lesiones que no implican una rotura directa en el DNA también pueden ser evaluadas mediante el ensayo del cometa como, por ejemplo, los dímeros de pirimidinas producidos por la radiación UV. En este punto, cabe recordar que las personas que padecen de *xeroderma pigmentosum* son incapaces de reparar adecuadamente este daño. El ensayo del cometa ha sido propuesto como una herramienta de diagnóstico para esta enfermedad y para otros síndromes caracterizados por deficiencias en la reparación por escisión (Gedik *et al.*, 1992).

El ensayo del cometa con la modificación enzimática, es capaz de medir la reparación de una variedad de lesiones en el DNA, tantas como enzimas específicas de reparación existan.

También se han realizado estudios para evaluar la capacidad de reparación del daño inducido por los rayos X y UV, según la edad. La reparación es más lenta en linfocitos de individuos viejos en comparación con jóvenes

(Singh *et al.*, 2001; Hazane *et al.*, 2006), al igual que en las células senescentes (Yu *et al.*, 2006).

6.4 Estudios de biomonitorización ambiental

Este tipo de estudios generalmente se plantean con dos propósitos: evaluar el riesgo de animales y plantas que habitan un ambiente expuesto a contaminantes, o evaluar el riesgo de la exposición de la población humana a contaminantes presentes en cultivos alimentarios, en el agua o en el ambiente que los circunda.

Nuevamente, por su gran simplicidad y sensibilidad, el ensayo del cometa ha revolucionado el área de la genotoxicología ambiental mediante la evaluación del daño, de su reparación y de la muerte celular, en diferentes especies centinela, sin necesidad de conocer previamente el cariotipo de las mismas (Dixon *et al.*, 2002). Alternativamente, se pueden evaluar plantas y/o animales que han crecido de forma natural en ambientes contaminados o en laboratorio, y que han sido expuestos a agentes potencialmente genotóxicos durante periodos de distinta duración.

La mayoría de los estudios de evaluación ambiental realizados utilizando el ensayo del cometa han empleado la versión estándar, siendo muy pocos los que han incorporado la incubación enzimática (Azqueta *et al.*, 2009).

Nascimbeni *et al.* (1991), realizaron un estudio piloto para evaluar el daño en diferentes tejidos del ratón dorado (*Ochrotomys nuttalli*) para la evaluación de suelos en el Norte de Carolina, donde los niveles de daño medidos evaluando la longitud media de migración se mostraron incrementados en todos los tejidos de los ratones habitantes de sitios con residuos peligrosos, pero el incremento fue sólo significativo en las células de tejido cerebral. Otras evaluaciones de suelo utilizando el ensayo del cometa se han llevado a cabo en gusanos de tierra como indicadores de contaminación del mismo (Salagovic *et al.*, 1996).

Fairbairn *et al.* (1994) evaluaron la calidad de agua colectada de varios cursos de agua industrial en el Valle de Utah, exponiendo células Raji (células

promielocíticas humanas) encontrando algunos agentes capaces de inducir SSB y ALS detectados con el ensayo del cometa.

También se han utilizado peces silúricos y carpas para evaluar contaminación en lagos mediante la utilización de la versión alcalina del ensayo (Ralph y Petras, 1997), así como otras especies de invertebrados y peces de agua dulce (Nacci *et al.*, 1996).

En la tabla del **ANEXO II** se resumen, entre otros, la mayoría de los estudios de biomonitorización ambiental llevados a cabo, donde se aprecia la amplia gama de organismos utilizados para la evaluación de varios tipos de ambientes (Dhawan *et al.*, 2009).

6.5 Estudios de biomonitorización de poblaciones humanas

La determinación de sustancias químicas en fluidos corporales humanos fue realizada por primera vez en el área de la medicina con el objeto de asegurar una protección saludable a los trabajadores expuestos laboralmente al plomo (Kehoe *et al.*, 1933) o al benceno (Yant *et al.*, 1936). Es en esta década cuando nacen los primeros estudios de biomonitorización humana (HBM); sin embargo, no es hasta la década de 1960 cuando se extiende el desarrollo y aplicación de técnicas analíticas para la medición de concentraciones muy bajas de sustancias químicas en sangre y orina, derivadas de la exposición ambiental.

Zielhuis (1984), propuso una primera definición de la HBM: “es una actividad sistemática continua o repetitiva de recolección de muestras biológicas para el análisis de la concentración de contaminantes, de metabolitos o de parámetros de efectos biológicos específicos, con el objetivo de evaluar la exposición y el riesgo para la salud de las personas expuestas, en comparación con los datos obtenidos para niveles de referencia y que permitan, si es necesario, tomar medidas de corrección”. Hoy en día la biomonitorización tiene objetivos más específicos, incluyendo la monitorización de dosis, de efectos bioquímicos y de efectos biológicos (Angerer y Gündel, 1996; Kommission HBM, 1996). La monitorización de exposición es la

determinación de sustancias peligrosas o sus metabolitos en fluidos corporales; la monitorización de efecto bioquímico consiste en la cuantificación de los productos de la interacción de los agentes reactivos con moléculas biológicas tales como DNA o proteínas; y la monitorización de efectos biológicos se relaciona con la determinación de efectos biológicos adversos tempranos.

No resulta sencillo el planteamiento de un estudio de HBM, por lo cual varias entidades han evaluado recientemente las características de este tipo de estudios (International Life Sciences Institute and the Deutsche Forschungsgemeinschaft, (DFG, 2002); Health Environmental Science Institute, (HESI, 2004); National Academy of Sciences of the USA, (NRC, 2006)) y han llegando a consensos, sobre todo en cuanto a los requerimientos de un estudio de HBM, que son los siguientes:

- a) Material biológico disponible, de fácil acceso, en cantidades suficientes bajo condiciones rutinarias, cuya obtención no suponga una molestia o un riesgo para el donante.
- b) Parámetros adecuados, capaces de reflejar exposición interna, efectos bioquímicos y biológicos.
- c) Métodos analíticos fiables y adecuados que cumplan con los controles de calidad establecidos internacionalmente.
- d) Valores de referencia y límites, en base a los cuales interpretar los resultados.

6.5.1 Muestras humanas

El material biológico ha de ser de fácil obtención y se debe asegurar que se contará con la cantidad suficiente para el estudio completo, considerando la repetición de los experimentos en caso necesario. Por esta razón, la sangre y la orina son las muestras biológicas más utilizadas en los estudios de HBM. El pelo, las uñas, la saliva y el aire exhalado son también bastante utilizados, aunque pueden presentar algunos inconvenientes. Para ninguna de estas muestras se dispone de un protocolo operativo estándar válido y publicado; no existen pautas para la evaluación de la calidad del material; y no se dispone de valores

de referencia para la interpretación de los resultados, entre otros inconvenientes particulares para cada tipo de muestra.

Si bien las células sanguíneas pueden revelar niveles altos de daño (que puedan estar asociados a riesgo de cáncer), no son las más apropiadas para predecir el riesgo de tumores sólidos. En los estudios del área clínica, las células consideradas más apropiadas son las que se obtienen de los tejidos u órganos de interés, como las células epiteliales de vejiga, de mucosa nasal y oral (Rojas *et al.*, 1996; Eren *et al.*, 2002; Fortoul *et al.*, 2004; Szeto *et al.*, 2005; Pinhal *et al.*, 2006), las células epiteliales del lagrimal (Rojas *et al.*, 2000), así como las procedentes de biopsias (Pool-Zobel *et al.*, 2004). También se han utilizado células espermáticas (Sergeyev *et al.*, 2005; Migliore *et al.*, 2006), pero el método empleado no ha sido completamente optimizado.

6.5.1.1 Linfocitos de sangre periférica

Cabe mencionar que la utilización de muestras de sangre ha sido una herramienta muy eficaz en la evaluación de la genotoxicidad de un sinnúmero de agentes, empleando principalmente linfocitos aislados, tanto frescos como congelados. Además, los linfocitos al estar en circulación, podemos considerar que su estado celular, nuclear y metabólico (incluyendo el DNA) refleja la exposición global del organismo. A partir de sangre, y dependiendo de los objetivos que se persigan, podemos disponer de las células de dos maneras: cultivos de sangre completa y linfocitos aislados. Los linfocitos aislados son muy sensibles para el análisis del potencial genotóxico de un agente (Elhajouji *et al.*, 1994; Surrallés *et al.*, 1995) y son ampliamente utilizados en sistemas *in vitro* (Carrano y Natarajan, 1988). Por otro lado, los cultivos de sangre completa reflejan de manera más fidedigna la situación *in vivo*, al conservar los eritrocitos y otros componentes plasmáticos, que juegan un papel muy importante en la activación metabólica de promutágenos (Tursi *et al.*, 1983; Norppa *et al.*, 1993) o en la degradación de algunos agentes genotóxicos (Stocker y Ames, 1987).

Los linfocitos son parte de la línea linfóide del sistema inmune y se encuentran principalmente en los órganos linfoides y, en menor cantidad

(aproximadamente el 3%), se encuentra circulando por el torrente sanguíneo a través del cual llegan a todos los órganos y tejidos del organismo.

En particular, los linfocitos de sangre periférica representan un sistema muy ventajoso para realizar estudios de genotoxicidad, siendo sus principales ventajas las siguientes:

- Son fáciles de obtener y establecer en cultivos.
- Son circulantes y están en contacto con las genotoxinas.
- Constituyen una población celular sincrónica.
- Existen dos poblaciones linfocitarias con vida media distinta: las células efectoras que viven unos pocos días, y las células de memoria, que viven durante años. Así, con estas últimas es posible evaluar exposiciones ocurridas en el pasado.
- Se encuentran en fase G_0 , por lo que no se dividen y la tasa de reparación es baja.
- Presentan un ciclo celular corto y bien establecido.
- Poseen un cariotipo estable y bien caracterizado.
- Se dispone de mucha información sobre los mismos, ya que son biomarcadores muy utilizados desde hace varias décadas.
- Se dispone de técnicas estandarizadas y económicas.
- Son un sistema sensible para la evaluación de una gran variedad de daño genético a través de numerosas técnicas: AC, MN, SCE, SCGE, mutaciones génicas, etc.
- Al ser células humanas, se evitan los problemas derivados de la extrapolación.

Sin embargo, también existen algunas desventajas, tales como:

- A veces, los linfocitos que se estimulan pueden no ser las células diana del agente que se pretende evaluar.
- Presentan una capacidad metabólica limitada.
- Al no ser una población homogénea, las subpoblaciones de linfocitos no sólo difieren en sus funciones, en sus características físicas, tamaño y

permeabilidad de membrana, sino también en la sensibilidad frente a determinados agentes, tanto físicos como químicos. Esta desventaja es importante y ha de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

- El establecimiento de cultivos supone la necesidad de ir obteniendo nuevas muestras de sangre.

6.5.1.2 Criopreservación de linfocitos

La utilización de linfocitos congelados provee de una interesante ventaja, sobre todo en los estudios de HBM, ya que permite el almacenamiento de muestras obtenidas durante un largo periodo de tiempo, y después elegir el momento más apropiado para su análisis, consiguiendo disminuir la potencial variabilidad temporal de la aplicación de un ensayo. Además, permite disponer de reservas de controles y de líneas celulares, cultivables en cualquier momento.

El proceso de criopreservación consiste, básicamente, en la detención del tiempo biológico de una población celular, sometiéndola a una temperatura inferior a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, inmersa en un agente criopreservante que permita evitar o minimizar el daño asociado a la congelación paulatina (Polge *et al.*, 1949). Esto se consigue manejando la tasa de congelación, evitando la formación de cristales en el interior de las células y controlando la osmolaridad a lo largo del proceso (Aswood-Smith, 1980; Mazur, 1984; Farrant, 1989).

Durante la primera etapa de la congelación (desde temperatura ambiente a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$) se disminuye el metabolismo celular y se frena rápidamente el transporte activo y el funcionamiento de las bombas iónicas. Normalmente esta etapa no implica daño celular si el medio de congelación está osmóticamente equilibrado (generalmente medio de cultivo celular y suero bovino fetal). En una segunda etapa, cuando la temperatura desciende de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el ambiente extracelular comienzan a formarse cristales de hielo lo que incrementa la concentración de soluto en el medio de congelación. Como consecuencia, el agua comienza a salir de la célula y el medio de congelación parcialmente congelado se moviliza hacia el interior de la misma, comenzando el proceso de deshidratación y contracción celular.

Cuando el proceso de congelación es drástico, se forman cristales de hielo en el interior de la célula antes de que se complete la deshidratación, produciéndose la ruptura de los orgánulos y membranas celulares produciendo la muerte celular durante la descongelación. Si el proceso de congelación se realiza de manera paulatina, el agua intracelular es osmóticamente expulsada de la célula resultando en una completa y correcta deshidratación. Hay que señalar que este proceso también puede causar la muerte celular.

La temperatura y la tasa de congelación son etapas críticas para que la criopreservación sea satisfactoria. Para lograr el completo detenimiento del tiempo biológico, la temperatura se ha de mantener por debajo de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, punto en el que el agua líquida ya no existe y la difusión es insignificante. Aunque algunas células son mantenidas entre $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante meses o incluso años, el tiempo biológico no se detiene completamente, siendo sólo minimizado, por lo que los daños o cambios celulares se pueden acumular.

En resumen, la tasa de congelación utilizada debe ser lo suficientemente paulatina para permitir una eficiente deshidratación de la célula, pero lo suficientemente rápida para que impida el daño producido por la deshidratación. Así, una tasa de -1 a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto resulta adecuada para la mayoría de células animales.

El mantenimiento de la criopreservación en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ previene efectivamente las reacciones químicas activadas térmicamente. Sólo pueden producirse efectos foto-físicos, debido a la radiación ionizante de fondo, que aún siguen activas a esa temperatura.

Una variedad de agentes químicos utilizados como crioprotectores posibilitan adecuados procesos de congelación; entre ellos podemos citar: la metil acetamida, el alcohol metílico, el etilenglicol y la polivinilpirrolidona (Klebe y Mancuso, 1983). Sin embargo, el dimetil sulfóxido (DMSO) y el glicerol son los más convenientes y ampliamente utilizados.

Se han desarrollado distintos protocolos de congelación y almacenamiento de células (Duthie *et al.*, 2002; Collins, 2004). Duthie *et al.* (2002) evaluaron la influencia de la criopreservación, utilizando el ensayo del

cometa, sobre los niveles endógenos e inducidos de daño basal, de daño oxidativo, de la capacidad antioxidante y de la reparación de linfocitos humanos aislados de sangre periférica; demostrando que el proceso de congelación no incrementa el daño endógeno con respecto a los linfocitos frescos. Lógicamente, la recomendación es utilizar protocolos constantes de aislamiento, congelación paulatina y descongelación rápida. Se propone la utilización de medio de cultivo (MEM o RPMI) con un 10% de suero bovino fetal y 10% de DMSO, como crioprotector, congelando paulatinamente hasta -80 °C (Collins, 2004).

6.5.2 Biomarcadores

El término biomarcador puede ser definido como un indicador de eventos celulares y moleculares en sistemas biológicos que revela la relación entre el ambiente y los efectos en la salud y procesos de enfermedad en un organismo (Dusinská y Collins, 2008). Los biomarcadores son medidos en materiales biológicos (generalmente sangre u orina, como se ha descrito anteriormente) obtenidos de pacientes o voluntarios, en estudios de observación o de intervención. Los biomarcadores moleculares juegan un papel clave en la comprensión de la relación entre la exposición a tóxicos ambientales y el desarrollo de enfermedades crónicas, así como también en la identificación de individuos de alto riesgo. Los biomarcadores pueden ser utilizados para monitorizar los niveles de exposición a agentes causantes de enfermedades o de factores protectores o, también, dar información de la variación interindividual de la respuesta a estos factores. Finalmente, los biomarcadores también son capaces de proporcionar información relacionada con el genotipo, lo que se considera cada vez más un factor crucial determinante de la respuesta a la exposición y de la susceptibilidad a distintos tipos de enfermedades.

La caracterización, validación y optimización de los biomarcadores (de exposición o de efecto genotóxico), debe ser un objetivo primordial en los estudios de HBM. Sorprendentemente, muchas de las metodologías utilizadas no han sido rigurosamente examinadas en cuanto a su exactitud, reproducibilidad, especificidad y sensibilidad, o evaluadas para mejorar la

viabilidad o la relación costo-beneficio de su aplicación (Bennett y Waters, 2005; Angerer *et al.*, 2007). Por esta razón, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue evaluar el ensayo del cometa, como biomarcador de exposición genotóxica, mediante la optimización de la técnica realizando algunas modificaciones como el aumento del número de muestras a analizar en un solo ensayo y la inclusión de enzimas para la detección de daño oxidativo. En la última década se han dedicado considerables esfuerzos a este fin para poder disponer de una herramienta fiable a la hora de realizar investigaciones en el área de la HBM (Collins *et al.*, 1997c; Dusinská *et al.*, 1997; Møller *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; ESCODD, 2003, Faust *et al.*, 2004; Møller, 2006b).

7. Ensayo del cometa en estudios de biomonitorización humana (HBM)

La HBM ha sido una herramienta importante para los programas biomédicos en el área de la salud y para la monitorización de situaciones de peligro laboral. Otras aplicaciones adicionales se encuentran en el desarrollo de biomarcadores capaces de mostrar relaciones dosis-efecto (radiación) o dosis-respuesta (otros agentes) (Jakubowski y Trzcinka-Ochocka, 2005), o daño en el DNA (*e.g.*, estrés oxidativo), en conexión con el desarrollo de distintas enfermedades. El ensayo del cometa ha demostrado ser apropiado para todas estas áreas pero, aún así, necesita mejorar algunas consideraciones prácticas y teóricas para asegurar su fiabilidad como herramienta en los estudios de HBM (Figura 12).

Cualquier paso, desde la etapa de muestreo hasta la evaluación final, es muy importante y puede influir en la fiabilidad de los resultados. Por lo tanto, cada laboratorio debe definir e implementar procesos estándares para todos los procedimientos experimentales, incluyendo la manipulación y el análisis de las muestras.

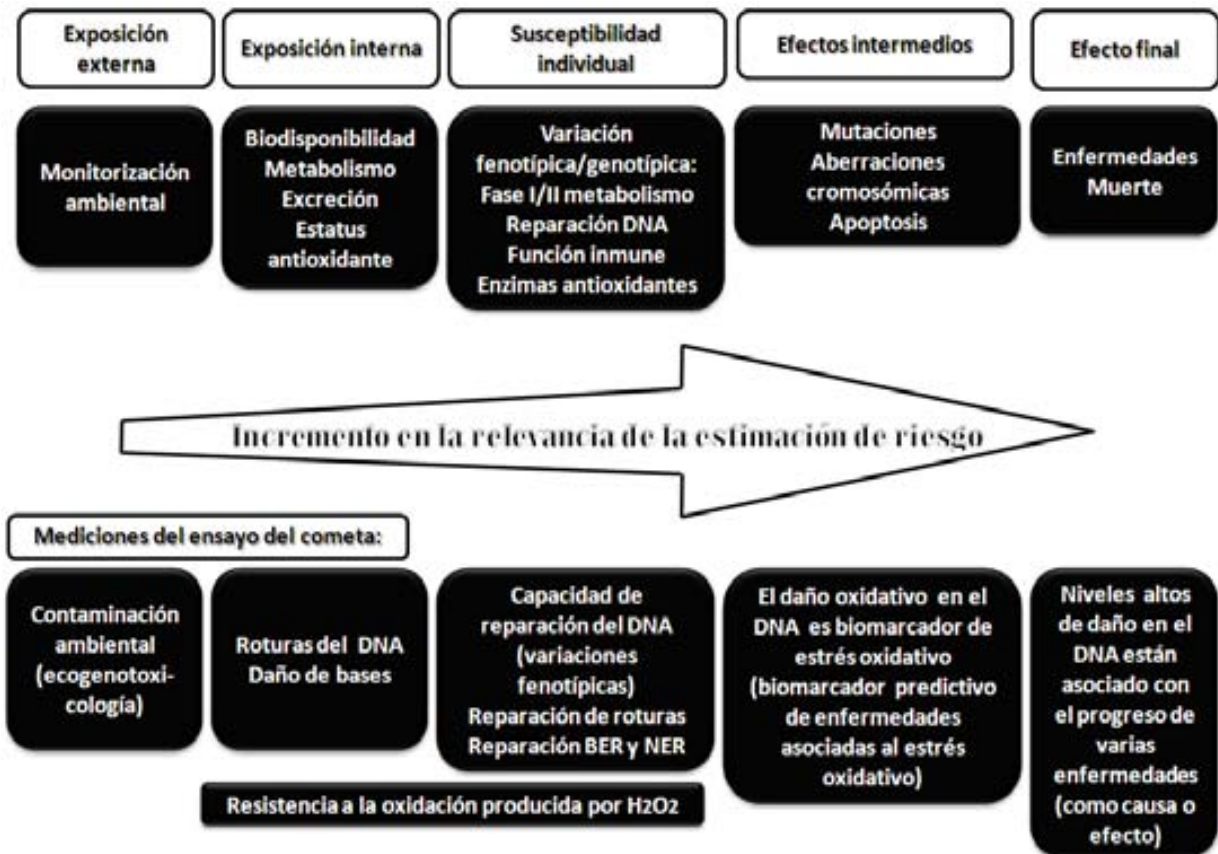


Figura 12: Usos del ensayo del cometa en diferentes estados de la biomonitorización. El rango de aplicación del ensayo del cometa, midiendo varios criterios de valoración experimentales (bajo la flecha) y reflejo de la determinación de diferentes niveles de riesgo desde la exposición hasta la manifestación de la enfermedad (Ex: Dusinská y Collins, 2008).

Los estudios de validación entre laboratorios representan un arduo ejercicio, debido a que es difícil que los distintos laboratorios que realizan estudios de biomonitorización adopten protocolos idénticos. Recientemente, Dusinská y Collins (2008) se han dedicado a recopilar una serie de datos de distinta procedencia para formular algunas recomendaciones y, así, reforzar la fiabilidad y la robustez del ensayo. A continuación nos vamos a referir a los aspectos de mayor interés:

a) Tiempo de muestreo y transporte de las muestras

El muestreo de todo el material biológico durante el mismo día (tanto expuesto como control) es lo recomendable, ya que reduce la probabilidad de la influencia de la variable tiempo en los resultados. Ahora bien, en la mayoría de los estudios de HBM las muestras se obtienen durante un

periodo de tiempo más o menos largo. Un aspecto que debe ser evitado es obtener primero las muestras de los expuestos y después la de los controles (o viceversa) en diferentes periodos de tiempo. Betti *et al.* (1995) concluyen que la época del año en la que se obtienen las muestras juega un papel más importante en los resultados en el ensayo del cometa que en los de otros ensayos citogenéticos tales como aberraciones cromosómicas y micronúcleos. Para el ensayo del cometa se recomienda que la toma de muestras se realice temprano por la mañana y en ayunas y que se transporten frías pero no en contacto directo con el hielo. Un estudio conjunto de dos laboratorios demostró que las muestras de sangre pueden ser almacenadas incluso más de 4 días a 4 °C, o a temperatura ambiente, sin efectos en el daño en el DNA (Anderson *et al.*, 1997b). Sin embargo, la estabilidad de las bases oxidadas durante un periodo de tiempo prolongado todavía no ha sido investigada.

b) Patrones de referencia y protocolos

A pesar del esfuerzo de numerosos laboratorios (Collins, 2003 y 2004; Møller, 2006 a, b; Speit y Hartmann, 2006), aún no se ha adoptado un único protocolo estándar del ensayo del cometa. Existen varios protocolos para la versión más utilizada, la alcalina, que son muy comparables, pero con variaciones en diferentes etapas tales como la lisis, la desnaturalización y la electroforesis. La utilización de estándares de referencia (controles positivos y negativos con un nivel de daño conocido, idealmente incluidos en cada electroforesis) y la utilización de protocolos estándar durante un estudio ayudan a minimizar las variaciones dentro de un laboratorio y permiten una comparación adecuada de los resultados de distintos estudios. Tanto los linfocitos aislados y congelados como otras líneas celulares de mamíferos han sido utilizados como controles negativos y las células expuestas a agentes genotóxicos como controles positivos (Hellman *et al.*, 1997; Collins, 2003, 2004; Speit *et al.*, 2003; Møller, 2005; 2006 a, b; Speit y Hartmann, 2006). Si los estándares de referencia son intercambiados entre los laboratorios, entonces los resultados pueden ser directamente comparados. Finalmente, las variaciones interindividuales deben atribuirse tanto a factores individuales como a las condiciones del laboratorio.

c) Células blanco y sustitutos

La elección de las células que deben ser utilizadas en HBM se limita frecuentemente a los linfocitos o leucocitos. Sin embargo, conviene aclarar que estas células no representan a todas las células del cuerpo y que, en particular, no constituyen células blanco del cáncer. Existen células mucho más apropiadas, obtenidas de varios tejidos y órganos, como son las células epiteliales y las células de biopsias.

d) Sangre humana: linfocitos y leucocitos, frescos o congelados

Las células sanguíneas son muy utilizadas en HBM debido a su fácil obtención. La mayoría de los estudios emplean sangre completa fresca o linfocitos o leucocitos aislados. Como ya se ha mencionado antes (6.5.1), las células sanguíneas no son consideradas como células somáticas típicas, pero debido a que están en circulación, su estado celular, nuclear y metabólico puede reflejar la exposición total del organismo.

e) Evaluación de los resultados: cómo se expresan los datos

Dado que la comparación de estudios independientes es una parte esencial para la evaluación del impacto de la exposición ambiental y ocupacional, es crucial que los resultados sean expresados de una manera comprensible, en unidades de medida comparables y presentadas de un modo estadístico válido. En el caso del ensayo del cometa, el parámetro importante a medir es la media o mediana del valor del cometa para cada muestra; la distribución de los cometas dentro de un gel es irrelevante, es más, si para el análisis estadístico se han utilizado los valores individuales de los cometas, los errores estándar obtenidos serán pequeños (McArt *et al.*, 2009b sugieren un recuento sistemático aleatorio de los cometas). Se han de contabilizar al menos dos réplicas por gel para obtener los valores medios de cada muestra, siendo estos valores los que se utilizan para los análisis estadísticos. Es muy importante la utilización de análisis adecuados para la identificación de diferencias entre grupos (expuestos y controles, o tratados y no tratados). En un trabajo reciente (Lovell y Omori, 2008) se tratan aspectos estadísticos relevantes en la aplicación del ensayo del cometa. La

elección del test adecuado dependerá fundamentalmente de si la distribución de los datos es de tipo normal.

Usualmente los datos obtenidos mediante el análisis de imágenes se presentan como % de DNA en la cola, el momento de la cola o longitud de la cola, como se ha detallado en el apartado 4.6.2. Los meta-análisis de datos de HBM muestran que el momento de la cola y de % de DNA en la cola presentan una buena correlación con las dosis de los agentes genotóxicos (Møller, 2006a). Sin embargo, debido a que el momento de la cola no se expresa en unidades tipificadas y que los diferentes sistemas de análisis de imágenes proporcionan diferentes valores, el % de DNA en la cola es un parámetro más significativo y más fácil de conceptualizar. La longitud de la cola depende de las condiciones de la electroforesis y, por lo tanto, también resulta complicada su utilización con fines de comparación. El % de DNA en la cola ha sido confirmado como el parámetro más apropiado para comparar datos de diferentes estudios, aunque el momento de la cola también puede ser utilizado (Collins, 2004; Collins *et al.*, 1997a, c; Lee *et al.*, 2004b; Kumaravel y Jha, 2006; Møller, 2006a).

f) Calibración

Si el % de DNA en la cola se pudiese expresar en unidades "reales", tales como roturas de DNA por 10^9 Da, sería de mucha utilidad y más informativo. Esto depende de la calibración, o sea, de la medición del daño en el DNA producido por un rango de dosis de radiación ionizante. En 1981, se demostró que 1 Gy de rayos X o γ produce aproximadamente 0,31 roturas por cada 10^9 Da, lo que equivale a unas 1.000 roturas por célula diploide en mamíferos (Ahnstrom y Erixon, 1981). Collins *et al.* (2008) han revisado recientemente 6 curvas de calibración obtenidas en distintos laboratorios utilizando la versión alcalina del ensayo del cometa. Las curvas no son concordantes. Estas discrepancias pueden surgir de sutiles variaciones en los protocolos, o de diferencias en el daño producido por los diferentes tipos de fuentes de irradiación utilizados. También se comprobado que las SSB son rápidamente reparadas por lo que es importante realizar la irradiación sobre hielo, con lo que se minimiza el metabolismo celular y, por consiguiente, el proceso de reparación post-irradiación. El tiempo post-irradiación hasta la

lisis también se debe minimizar ya que en dicho proceso la reparación se detiene. La mejor forma de impedir todos estos pormenores consiste en irradiar las células ya embebidas en agarosa.

7.1. Ensayo del cometa como indicador de estrés oxidativo

El ensayo del cometa no es la única herramienta disponible para medir el daño oxidativo en el DNA, pero sí que es una de las técnicas más sensibles, ya que su procedimiento está relativamente libre de artefactos, a diferencia de otras técnicas que sobreestiman el daño. Por ello, se ha convertido en una herramienta muy valiosa en los estudios de biomonitorización de poblaciones humanas como, por ejemplo, para la evaluación del papel del estrés oxidativo en enfermedades, o en temas tan actuales como los relacionados con los efectos antioxidantes de determinadas dietas.

7.1.1. Origen e importancia del daño oxidativo en el DNA

El oxígeno es un elemento esencial para la vida. Es bien conocido que en el metabolismo aeróbico se producen especies reactivas de oxígeno (EROS) y radicales libres (RL). Estas especies oxidantes provocan daño acumulativo en moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo tales como proteínas, lípidos y DNA. No obstante, el organismo ha desarrollado sus propios mecanismos de defensa para hacer frente a la acción de estas especies oxidantes. Las células pueden tolerar un cierto nivel de daño oxidativo, pero no pueden permitir niveles elevados del mismo. A veces, las defensas antioxidantes pueden verse desbordadas por la excesiva generación de EROS. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce como estrés oxidativo (EO) y puede conducir a un daño oxidativo importante, asociado al envejecimiento y a numerosas enfermedades (Lee et al., 2004a), dentro de las cuales se incluye el cáncer. El hecho de que un proceso tan recurrente en nuestro organismo como el daño oxidativo conduzca a tales consecuencias, es un motivo más que suficiente para su investigación.

Es muy probable que los productos de la peroxidación lipídica estén involucrados en la formación de placas de ateroma en las paredes arteriales, que causan o contribuyen a los accidentes cerebrovasculares, enfermedades coronarias, trombosis u otras enfermedades vasculares (Esterbauer *et al.*, 1993). La glucolización de lipoproteínas de baja densidad pueden contribuir al alto riesgo de aterosclerosis en pacientes diabéticos (Lyons, 1993). Se ha visto también que las cataratas pueden resultar de la alta incidencia de daño oxidativo en las células del cristalino causado, por ejemplo, por los rayos solares de tipo UV (Vinson, 2006). Muchas enfermedades que tienen como consecuencia una respuesta inflamatoria incluyen la producción de EROS, derivada de la actividad de los macrófagos. A pesar de que la actividad de los macrófagos cumple con un papel esencial en la defensa del organismo, también conduce a un aumento de las EROS.

En el caso del cáncer, existen fuertes evidencias de la influencia del daño oxidativo. Así, los productos de oxidación de las bases tales como la 8-OHG son potencialmente mutagénicos debido a la alteración de las propiedades del apareamiento (Grollman y Moriya, 1993), por lo que es claro que las mutaciones somáticas en genes críticos pueden causar cáncer. Existen evidencias epidemiológicas de que el cáncer puede ocurrir en sitios de inflamación y de infección (Coussens y Werb, 2002). Resumiendo, ya sea como causa o como efecto, el daño oxidativo parece ser un factor común de muchas enfermedades degenerativas.

A nivel molecular, el espectro de oxidación inducido en el DNA incluye roturas, sitios AP y bases oxidadas (Von Sonntag, 1987). Este espectro se ha utilizado como un indicador útil para evaluar el riesgo de cáncer. También se ha identificado un aumento significativo en la oxidación de bases en pacientes diabéticos y en pacientes con Alzheimer (Collins *et al.*, 1998b; Mórocz *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004).

La 8-OHG es el principal producto de la oxidación de bases con un alto potencial mutagénico (Wood *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1996) debido a la alteración en el apareamiento de bases (8-OHG tiende a aparearse con adenina). La especificidad de apareamiento de la 8-OHG no es tan estricta como

la de la guanina ya que se ha visto que, durante la replicación *in vitro* utilizando DNA polimerasa de bacterias y de células eucarióticas, existe un alto grado de error en la incorporación de nucleótidos durante la replicación (Shibutani *et al.*, 1991). Así, las mutaciones más comúnmente producidas son las sustituciones de los siguientes pares de bases: GC → AT, GC → TA y GC → CG (Bruner *et al.*, 2000; Kino y Sugiyama, 2001). Además, la 8-OHG puede formarse durante el metabolismo normal de la célula o ser inducida por factores externos como la radiación UV (Ito y Kawanishi, 1997) y agentes químicos (Klauning *et al.*, 1998). Generalmente, las EROS tienen preferencia por la oxidación de la guanina ya que esta base posee un potencial de ionización pequeño con respecto al de las otras bases (Burrows y Muller, 1998). Entre las EROS, el radical hidroxilo (OH·) es el más reactivo (Kehrer, 2000), y se produce por numerosas reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Este radical tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las biomoléculas, conduciendo a roturas en el DNA, enlaces cruzados DNA-proteínas, cambios de bases, oxidación de bases, peroxidación lipídica, etc. También está involucrado en reacciones de captación de hidrógenos y de transferencia de electrones, produciendo inestabilidad genética y daño celular (Gros *et al.*, 2002). El ataque del OH· a la guanina se da en las posiciones C4, C5 y C8, siendo C8 la posición preferencial (Venkateswarlu y Leszczynski, 1998).

Se ha propuesto que, en el mecanismo de formación de la 8-OHG, un radical hidroxilo (OH·) reacciona principalmente con el carbono 8 de la guanina con la subsecuente pérdida de un átomo de hidrógeno (o un electrón más un protón) desde una molécula intermediaria para formar 8OHG (**Figura 13**).

También se han propuestos que esta molécula puede ser formada en el organismo como consecuencia a la respuesta contra infecciones por virus, bacterias y parásitos (Akaike *et al.*, 1998).

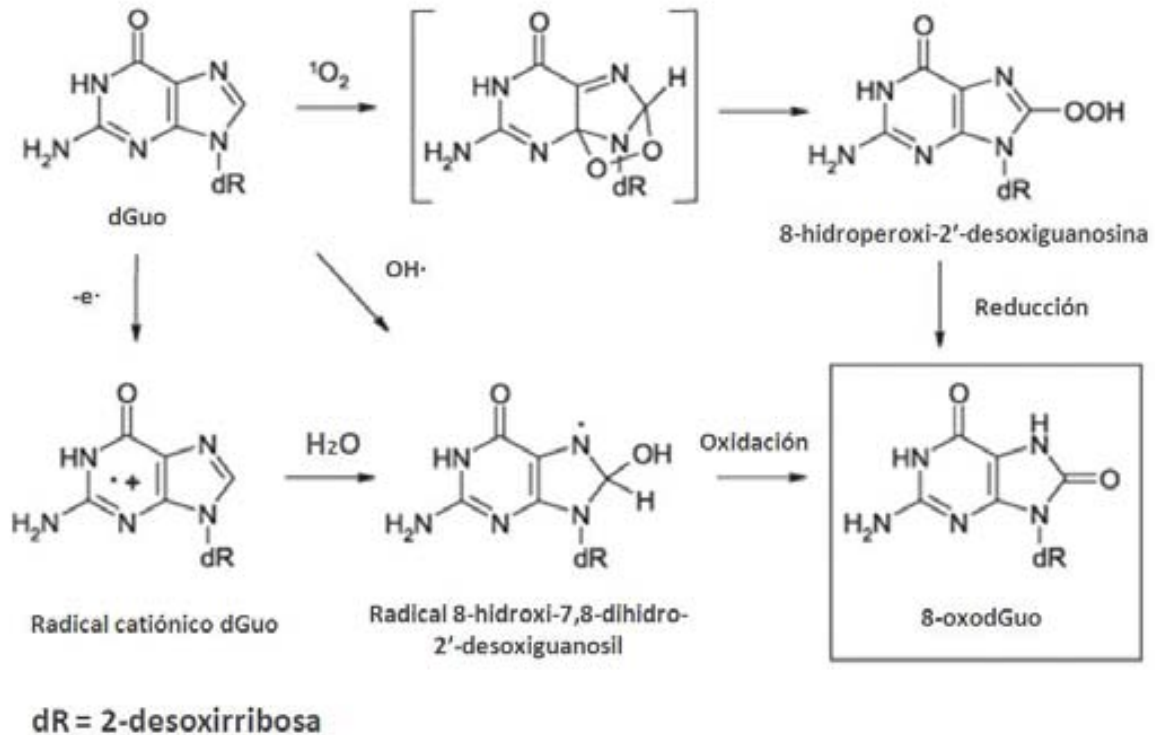


Figura 13: Reacciones de oxidación de la 2'-desoxiguanosina mediante el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), un electrón libre $-\text{e}^-$ y mediante el oxígeno singlete $^1\text{O}_2$, generando el principal producto de oxidación de bases con potencial mutagénico.

7.1.2. Ensayo del cometa como biomarcador de daño oxidativo

Cuando se selecciona un biomarcador para examinar los efectos del daño oxidativo en humanos, obviamente los primeros candidatos son los productos de oxidación del DNA, dada la relación entre el daño en el DNA y el desarrollo de cáncer y debido también a que su evaluación es relativamente fácil.

La gran disyuntiva de los investigadores que se han dedicado a la evaluación de los productos de oxidación del DNA como un indicador del estado redox total, radica en la elección de la mejor forma de hacerlo. Históricamente, antes del uso de las enzimas de reparación extraídas de bacterias, que facilita la identificación de la 8-OHG con el ensayo del cometa, el método más utilizado para la caracterización del ataque de los radicales libres al DNA era la cromatografía de gases asociada a la espectrofotometría de masas (GC-MS). Esta metodología se ha ido combinando con el ensayo del cometa

utilizando la versión enzimática del ensayo, junto con otras alternativas como, por ejemplo, la elución alcalina. Cada estrategia cuenta con sus defensores y cada una expresa los resultados de forma diferente, ya sea en femtomoles de 8OHG por microgramo de DNA, en lesiones 8OHG por 10^6 pb, o en sitios FPG por 10^9 Da de DNA. Esta disparidad de unidades ha hecho que rara vez se puedan comparar los resultados. A modo de ejemplo, los niveles de daño oxidativo basal en linfocitos humanos, analizando las mismas muestras con HPLC-MS y con el ensayo del cometa, difieren en una magnitud de 10 veces (Collins *et al.*, 1996).

El proyecto ESCODD (Gedik, *et al.*, 2005) se ha desarrollado con el principal objetivo de establecer los niveles basales de bases oxidadas en linfocitos humanos, por medio de HPLC-MS y con el ensayo del cometa con digestión con la endonucleasa FPG. Se utilizó una curva de calibración elaborada con rayos X para la transformación de los resultados obtenidos con el ensayo del cometa (que detecta roturas y no cuantifica directamente el producto de la oxidación), es decir, de roturas por 10^9 Da de DNA a 8OHG por 10^6 guaninas. El nivel basal de 8OHG probablemente más real, se estimó entre 0,3 (utilizando el ensayo del cometa) y 4 (utilizando HPLC-MS) por 10^6 guaninas, rango basado en las medianas de las muestras de todos los grupos participantes en el estudio. Este rango proporciona un punto de referencia para la evaluación fiable de los daños basales de oxidación. Los valores superiores a 5 8OHG por 10^6 guaninas deben ser considerados como dudosos.

Parece claro que, aunque el ensayo del cometa basado en la digestión de bases oxidadas por enzimas de reparación, no posee la precisión del método HPLC-MS, es generalmente más aproximado en la determinación de los niveles basales de daño.

Møller *et al.* (2000) revisaron estudios de poblaciones humanas expuestas laboralmente, con el objeto de dilucidar que factores pueden, o no, jugar un papel importante en los estudios de biomonitorización mediante el ensayo del cometa, junto con evaluar si este ensayo es realmente útil para determinar el riesgo individual en este tipo de estudios. Encontraron que 11 de los estudios establecieron relaciones positivas entre la exposición y el daño (de los cuales

sólo dos presentaron resultados positivos utilizando el test de CA; dos fueron negativos para el test de SCE y, 8 de los 11 no fueron determinantes utilizando otros tipos de ensayos), y 7 no. Consecuentemente, esto los llevó a considerar la dificultad de obtener conclusiones certeras de los resultados positivos en el ensayo del cometa en investigaciones de biomonitorización de poblaciones humanas laboralmente expuestas. Por otra parte, comentan además, que los resultados del ensayo del cometa en este tipo de estudios son, con mayor razón, cuestionables cuando los efectos del tabaco no son claramente detectados, siendo ésta una exposición circunstancial que se ha considerado como un control positivo en la evaluación de daño en el DNA mediante otros ensayos. Por otro lado, Hoffman *et al.* (2005) realizaron un meta-análisis de 38 estudios que habían utilizado el ensayo del cometa para comparar el daño entre fumadores y no fumadores, siendo el nivel de daño significativamente más alto en los fumadores. Estos resultados se obtuvieron sólo cuando el objetivo era evaluar la genotoxicidad del tabaco, pero cuando se evalúan los niveles de daño en una población y la condición de fumador/no fumador se consideró como un factor de confusión, entonces no se detectaron diferencias significativas.

7.1.3. ¿Cómo mide el ensayo del cometa el daño oxidativo?

Afortunadamente existen endonucleasas bacterianas que reconocen con gran especificidad las lesiones producidas por las EROS en el DNA de los linfocitos humanos y que, además, se pueden incorporar en la metodología del ensayo del cometa. La primera enzima utilizada con este fin fue la EndoIII, que actúa como una glicosilasa que reconoce varias pirimidinas oxidadas eliminándolas del DNA y generando sitios AP, que son transformados a roturas cuando el DNA es sometido a pH alcalino. Así, se produce un incremento en las roturas del DNA después de una incubación con la enzima, que son reveladas durante la electroforesis del ensayo del cometa y que representan el nivel de pirimidinas oxidadas (Collins *et al.*, 1993).

Posteriormente, se ha empleado la FPG de la misma manera (Dusinská y Collins, 1996). Su nombre (formamidopirimidina DNA glicosilasa), se debe a su

capacidad de reconocer anillos imidazol presentes en las purinas, o formamidopirimidinas (fapy A y fapy G); sin embargo, su mayor y principal sustrato es la 8OHG (Boiteux, 1993) (**Figura 14**).

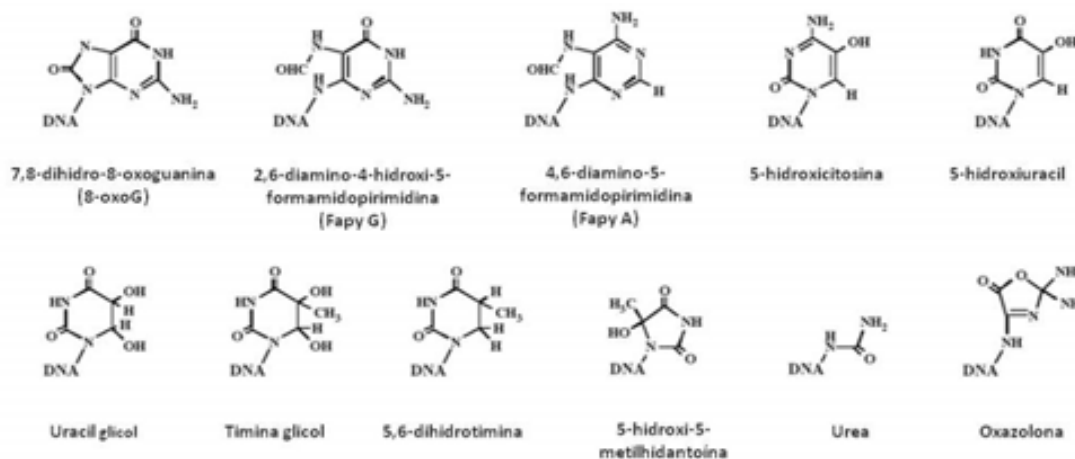


Figura 14: Bases del DNA con lesiones que actúan como sustrato de la endonucleasa formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG).

La utilización de enzimas de reparación para la determinación del daño oxidativo con el ensayo del cometa, supone la incubación de una de las preparaciones solamente con el buffer de reacción de enzimas, en paralelo con las incubaciones enzimáticas. Así, el daño neto se calcula mediante la diferencia entre los niveles de daño obtenidos por la incubación de ambas enzimas independientemente y los niveles de daño de la incubación sin enzimas (el incremento del daño durante la incubación no enzimática es pequeño, por lo que se considera un control válido). Dado que los niveles de daño se sitúan generalmente en la parte lineal de la curva que relaciona el nivel de daño con la frecuencia de roturas, este cálculo proporciona una aproximación fiable.

En síntesis, el énfasis de este trabajo de Tesis ha sido reforzar el papel del ensayo del cometa como una herramienta versátil y sensible para la determinación de daño en el DNA, mediante su optimización, aplicable indistintamente a diversas áreas de la investigación, dedicadas a temas tan importantes como el daño y reparación de nuestro patrimonio genético.

II. Objetivos

Considerado que la integridad del DNA es fundamental para la salud y el buen funcionamiento de nuestro organismo, se vuelve cada vez más imprescindible disponer de herramientas sensibles y fiables que nos permitan profundizar en la detección de daño en nuestro material genético, en aras a su protección. En este contexto, el ensayo del cometa se ha propuesto como una herramienta apropiada, aunque todavía existen muchos aspectos que deben reconsiderarse.

Con estas premisas, el objetivo principal de este trabajo de Tesis ha sido la optimización del ensayo del cometa como biomarcador de daño en el DNA y su aplicación a distintas situaciones.

Esta optimización se ha centrado principalmente en el aumento del número de muestras analizadas en un mismo ensayo, cubriendo también otros aspectos que van desde la obtención de la muestra hasta la lectura del daño, pasando por la etapa de aislamiento, congelación y almacenamiento prolongado de linfocitos, ya que son pasos críticos para una buena evaluación del daño.

Como objetivos específicos se propusieron los siguientes:

- Evaluar la radiosensibilidad individual mediante la elaboración de una curva dosis-respuesta, utilizando el ensayo del cometa en sangre periférica expuesta a radiación gamma y estableciendo niveles basales de daño en linfocitos aislados.
- Establecer los niveles basales de daño oxidativo mediante la incorporación de endonucleasas específicas en el ensayo del cometa, en un grupo de 70 mujeres embarazadas de la población general, de dos áreas de la provincia de Barcelona: Sabadell (Hospital Parc Taulí) y Barcelona ciudad (Hospital del Mar).

- Relacionar los niveles de daño oxidativo medidos en linfocitos de niños recién nacidos con los obtenidos en sus madres.

III. Materiales y Métodos

Las metodologías del ensayo del cometa que se aplican en los diferentes laboratorios son variadas pero, sin duda alguna, la versión alcalina es la más utilizada. A pH >13, la técnica resulta más sensible para la detección de niveles bajos de daño, por lo que la hemos elegido como versión estándar para su descripción en detalle.

El trabajo de esta Tesis versa sobre la versión alcalina del ensayo, tanto proponiendo y desarrollando nuevas mejoras metodológicas, como aplicándola a dos áreas concretas: la radiosensibilidad individual (aplicación clínica) y determinación de daño basal y oxidativo de dos poblaciones de madres e hijos (biomonitorización humana).

1. Ensayo del cometa: descripción del protocolo estándar

En su versión estándar el ensayo se lleva a cabo en condiciones alcalinas, de acuerdo con el método inicialmente descrito por Singh *et al.* (1988), con ligeras modificaciones. Este protocolo supone la realización de diversas etapas, tal como se describe a continuación.

1.1. Preparación de los microgeles de agarosa

Para la realización del ensayo, se utilizan portaobjetos previamente cubiertos con 150 μ L de agarosa de punto de fusión normal (NMA) (GIBCO BRL) al 0,5% disuelta en agua bidestilada y deshidratada a 65 °C. Antes de realizar la primera capa, los portaobjetos deben estar muy limpios y secos, preferentemente desengrasados con etanol. A continuación se preparan alícuotas de 20 μ L con aproximadamente 40.000 células (de cultivo; frescas o descongeladas; tratadas o controles), cada alícuota se mezcla con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) (GIBCO BRL) al 0,5% en PBS, mantenida

previamente a 37 °C. Esta mezcla celular se deposita sobre los portaobjetos, previamente preparados y debidamente rotulados e, inmediatamente, se cubren con un cubreobjetos de 24 mm x 60 mm. Se deja solidificar a 4 °C durante 15 min y, transcurrido este tiempo, se retiran los cubreobjetos, procurando no perturbar las capas. Posteriormente, se deposita una tercera capa de agarosa (LMA) al 0,5% en agua bidestilada sobre la capa celular, se cubre nuevamente con un cubreobjetos de la misma medida y se deja solidificar también por 5 min a 4 °C. A continuación, se retiran los cubreobjetos y las preparaciones son sumergidas en el tampón de lisis que se describe a continuación.

1.2. Lisis de membranas celulares

La solución de lisis se compone de 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, DMSO 10%, 1% Triton X-100 y ajustado a pH 10, donde las preparaciones son sumergidas entre 1 y 24 h, a 4 °C. Esta solución debe ser enfriada previamente para asegurar la estabilidad de los geles en los portaobjetos.

La alta concentración de sales y detergentes de esta solución permite la desintegración de las membranas citoplasmáticas y nucleares, así como la eliminación de restos citoplasmáticos, RNA y algunas proteínas nucleares (Singh, 2000). A partir de este punto, todo el proceso se realiza en oscuridad para evitar el daño adicional que podría producir la luz en el DNA desprotegido.

1.3. Desnaturalización y electroforesis

Tras la lisis, las preparaciones se colocan en un tanque de electroforesis horizontal evitando espacios entre ellas; en caso de no abarcar toda la superficie disponible de la cubeta de electroforesis con las preparaciones, se recomienda llenar con portaobjetos para asegurar la uniformidad en el paso de la corriente durante la electroforesis e impedir el movimiento de las preparaciones sometidas al campo eléctrico. Se llenan las cubetas con tampón de electroforesis de manera que las preparaciones queden completamente sumergidas en él y se

dejan en estas condiciones durante 40 min. Transcurrido este tiempo, se procede a una electroforesis durante 20 min a 25 V y a 300 mA. Se debe procurar establecer una orientación de las preparaciones teniendo en cuenta que el DNA, al tener carga negativa, migrará hacia el polo positivo.

La solución de electroforesis contiene 1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH con un pH ajustado a 13,2. La alcalinidad de esta solución permite la disociación de las hebras de DNA.

1.4. Neutralización y fijación

Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se retiran con cuidado de la cubeta y se colocan en una caja para someterlos a una serie de lavados con el tampón de neutralización (3 veces durante 5 min cada vez). Este tampón se prepara con 0,4 mM de Tris-HCl con un pH ajustado a 7,5 para neutralizar la alcalinidad del tampón de electroforesis y eliminar posibles restos de detergentes que eventualmente podrían interferir en el proceso de tinción y, por ende, en la posterior visualización (McKelvey-Martin *et al.*, 1993).

Tras la neutralización, las preparaciones son deshidratadas depositando en la superficie de cada una de ellas 2 mL de etanol durante 3 min. La deshidratación con alcohol (metanol absoluto o etanol) permite almacenar los portaobjetos durante un tiempo antes de su recuento (Klaude *et al.*, 1996; Tice *et al.*, 2000). Las preparaciones deben ser guardadas en cajas oscuras para evitar la luz directa y a temperatura ambiente.

1.5. Tinción y visualización

Las preparaciones se tiñen justo antes del análisis microscópico. Para esto, se depositan 60 µL de bromuro de etidio a una concentración de 0,4 µg/mL, sobre cada una de las preparaciones, y se cubren con cubreobjetos de 24 x 60 mm.

La visualización se realiza utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50, equipado con un filtro de excitación de 480-550 nm, una

bombilla de mercurio de 100 W y un filtro de barrera de 590 nm, y conectado a una videocámara Hitachi Denshi, Ltd. CCD-IRIS.

La imagen de cada célula se captura empleando el programa Komet 5.5, y la lectura de las células se realiza a 200x. Para la cuantificación del daño genotóxico, en nuestro caso se considera el porcentaje de DNA en la cola como el parámetro de evaluación, ya que estudios previos del Grupo han demostrado que es más adecuado que la longitud de la cola o el momento de la misma, ya que posee una alta repetitividad, es más sensible a dosis altas, más fácil de interpretar y más apropiado a la hora de hacer comparaciones entre laboratorios.

Por último, cabe recordar que durante todo el procedimiento se ha de evitar la luz directa, sobre todo desde la lisis de las células hasta su visualización. Se recomienda trabajar con luz amarilla tenue para evitar daño adicional en el DNA. Todas las soluciones y pasos del ensayo se deben mantener/realizar a 4 °C, excepto las etapas de deshidratación, tinción y almacenamiento, que pueden efectuarse a temperatura ambiente.

2. Optimización del ensayo del cometa

El ensayo del cometa es uno de los tests de genotoxicidad que más atención ha recibido en los últimos años, no tan sólo por parte de investigadores que trabajan en el área de la genotoxicología, sino también por aquellos que buscan una manera rápida y fiable de medir daño en el DNA.

Esta rápida expansión es consecuencia de las múltiples ventajas del ensayo. Sin embargo, todo ensayo es mejorable y en esta dirección hemos encaminado nuestro esfuerzo, introduciendo una serie de modificaciones que permitan mejorar su rendimiento, manteniendo las condiciones básicas y esenciales del protocolo. Los cambios introducidos son los que se indican a continuación.

2.1. **Optimización 1:** incremento del número de muestras por unidad de soporte

En su versión estándar, cada portaobjetos contiene una única muestra, lo que implica trabajar con tantos portaobjetos como muestras a analizar. Esto supone la manipulación de una gran cantidad de portaobjetos, sobre todo si el estudio es de cierta envergadura. Por lo tanto, uno de nuestros objetivos se dirigió a reducir el número de soportes, incrementando el número de muestras analizadas en un mismo experimento.

2.1.1. Portaobjetos conteniendo dos muestras

Cuando se preparan dos geles por portaobjetos, una de las ventajas principales es que tanto la cantidad de material como la de células se reduce a la mitad; así, aproximadamente 20.000 células son mezcladas con 70 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (LMA) al 1% y a 37 °C. Una vez homogeneizada la mezcla, se deposita sobre un portaobjetos con la primera capa de agarosa, y se cubre inmediatamente con cubreobjetos de 18 x 18 mm. Se coloca de manera que nos permita depositar otra gota a su lado (**Figura 15**). Posteriormente, se procede de la manera estándar (**Figura 16**).

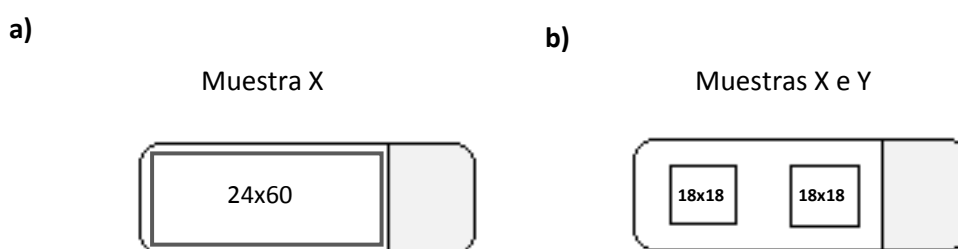


Figura 15: Esquema simplificado de portaobjetos con **a)** una muestra y **b)** dos muestras. Se indican las dimensiones en milímetros de los geles resultantes en cada caso.

Cabe resaltar que, además de variar el número de geles por soporte, también se ha variado la concentración de agarosas (del 0,5% al 1%) con el objeto de tener más control sobre la migración del material en el momento de la electroforesis. También se ha eliminado la tercera capa de agarosa ya que su

ausencia no parece alterar ni la migración ni la visualización del material. La tinción se realiza con DAPI a una concentración de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ depositando sobre cada gel una gota de $20\mu\text{L}$. El DAPI es muy específico para el DNA disminuyendo el ruido de fondo durante la visualización y recuento.

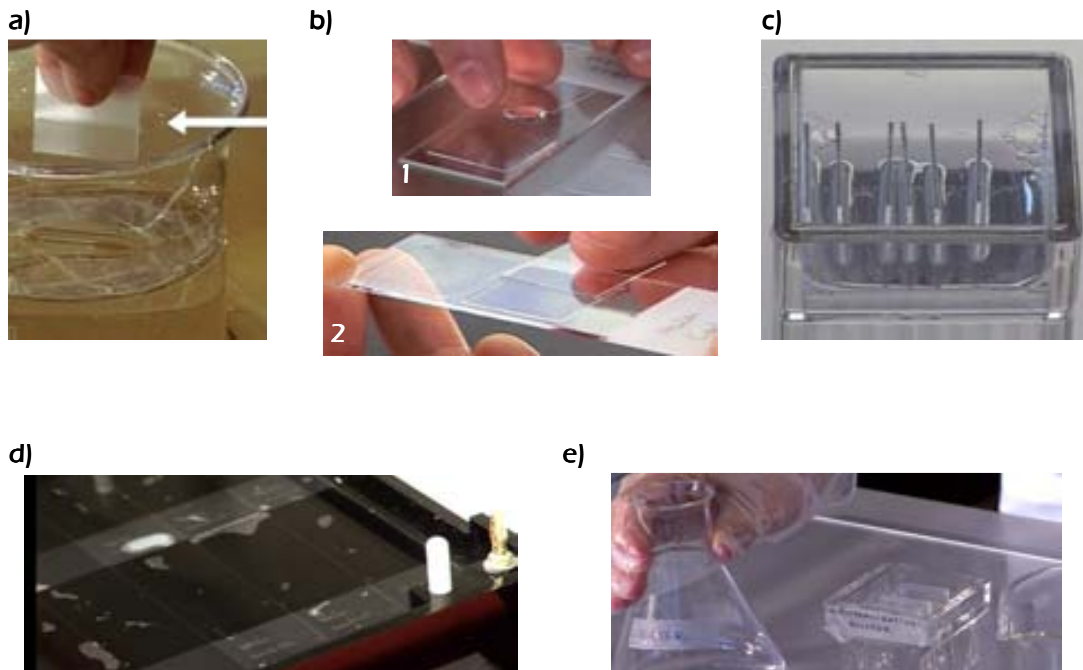


Figura 16: Secuencia fotográfica de las principales etapas del ensayo del cometa utilizando como soporte portaobjetos precubiertos. **a)** primera capa de agarosa de punto de fusión normal al 1% hasta la mitad del área esmerilada; **b.1)** Goteo y aplastamiento de la agarosa que contiene las células, dos geles por portaobjetos; **b.2)** después de la solidificación de los geles se retiran los cubreobjetos; **c)** lisis de membranas; **d)** tratamiento alcalino (o desnaturalización) del DNA y electroforesis; **e)** neutralización y lavado con agua destilada.

2.1.2. Cuarenta y ocho geles por soporte: Gelbond® film

Teniendo en cuenta el área que poseen los portaobjetos convencionales ($76 \times 26 \text{ mm}$) resulta difícil aumentar el número de muestras a más de dos, por lo que se hace necesario buscar otra superficie que permita incrementar el número de las mismas, sin dejar de lado un aspecto muy importante como es la estabilidad y la adherencia de los geles en el soporte correspondiente. Para esto nos propusimos adoptar en nuestro laboratorio una modificación crucial del ensayo. La diferencia con respecto al protocolo estándar radica principalmente en el soporte utilizado para anclar las células ya embebidas en agarosa, que

consiste en láminas transparentes y flexibles llamadas Gelbond®, adaptadas para contener 48 microgeles de agarosa. Estas películas poseen una cara hidrofílica, lo que asegura una excelente adherencia de las células embebidas en agarosa. Las láminas son adaptadas en cuanto a sus dimensiones (10,5 x 7,5 cm) y perforadas en cada esquina para ser montadas en marcos de plástico y, así, facilitar su manipulación. Es importante para una correcta orientación hacer un pequeño corte en la esquina inferior derecha de cada gel (**Figura 17**).

Una ventaja trascendental del uso de este formato de 48 geles por soporte (Gelbond) es la de poder incluir controles internos en cada experimento independiente. Esto quiere decir que, mediante el cálculo de un factor de corrección obtenido de los controles negativos internos, se puede anular casi por completo la variabilidad entre experimentos.

Otra ventaja a destacar es que el número de células por gel se reduce en un 98,75% con respecto al protocolo estándar; es decir, son necesarias sólo 500 células en cada gel. Junto con esto, la cantidad de agarosa requerida para embeber las células se reduce en un 95%, por lo que el volumen de cada gel sólo tiene que ser de 7 μ L. La proporción entre el volumen de suspensión celular y el volumen de agarosa deben ser de 1:10.

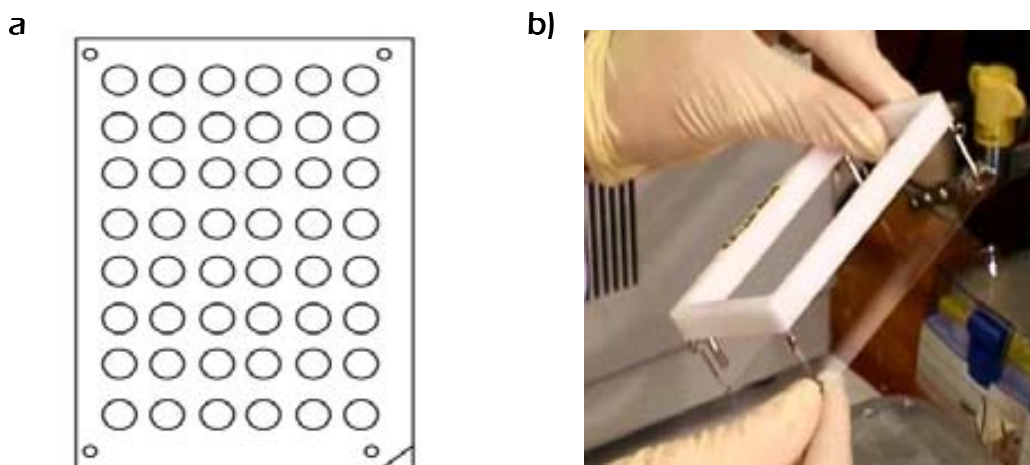


Figura 17: **a)** Ubicación de los orificios de las esquinas, el corte inferior de orientación y la disposición de los 48 microgeles. **b)** Fotografía del anclaje de una lámina de Gelbond a los ganchos del marco que la sujeta/transporta. El Gelbond necesita ser recortado a las dimensiones exactas, 10,5x7,5 cm.

En la práctica, para facilitar, la manipulación de volúmenes pequeños tanto de células como de agarosa, se calcula un volumen final de 25 μ L de suspensión celular (con la densidad requerida) y 225 μ L de agarosa LMP 1%, respetando así la proporción 1:10.

La agarosa ya fundida y mantenida a 37 °C en un bloque estabilizado, es alicuotada en volúmenes de 225 μ L en microtubos de PCR de 0,2 mL para luego depositar en su interior 25 μ L de cada suspensión celular. Con ayuda de una pipeta electrónica con multicanales expandibles (eQualizer), se dispensan 48 microgeles sobre el Gelbond colocado sobre una placa de aluminio a 4 °C. Los geles se dejan solidificar durante 5 min y se continua el proceso siguiendo con la desnaturalización, la electroforesis y la neutralización, como en el protocolo estándar (**Figura 18**), pero con algunas modificaciones técnicas mínimas. Por ejemplo, la solución de lisis contiene además 1% lauril-sarcosinato y 10% de DMSO; la solución de electroforesis se ajusta a pH 13,2 y en el momento de poner los geles en el tratamiento alcalino se realiza un lavado previo de 5 min en este buffer, seguido por 35 min de desnaturalización. La electroforesis propiamente dicha se realiza durante 20 min a 300 mA y a 20 V; luego, en la neutralización se realizan dos lavados con agua destilada y se realiza la fijación con etanol absoluto durante al menos 2 h (hasta 24 h). Para la tinción se utiliza Sybr Gold (Molecular probes). A partir de un stock de 10x diluido se depositan 40 μ L en 25 mL de tampón TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA a pH 7,5 y a temperatura ambiente) y se sumergen los geles a teñir en esta solución durante 20 min, con agitación leve (50 rpm). Hay que asegurarse que los geles quedan completamente sumergidos en la solución de tinción. Finalmente, se realiza un lavado de 1 minuto con agua destilada y se dejan secar los geles posicionados en forma vertical y a temperatura ambiente, hasta observar que estén completamente secos y planos.

Para la visualización, los geles son debidamente rotulados y cortados por la mitad, debido a que su tamaño es incompatible con las medidas de la platina del microscopio. Posteriormente se adhieren con una gota de agua destilada sobre un portaobjetos de metacrilato de dimensiones 52,5 x 75 x 3 mm y se cubren con cubreobjetos de 14 x 49 mm (IZASA) adheridos también con 50 –

100 μ L de agua destilada. Se utiliza una magnificación de 200X y se contabilizan 100 células por cada muestra.

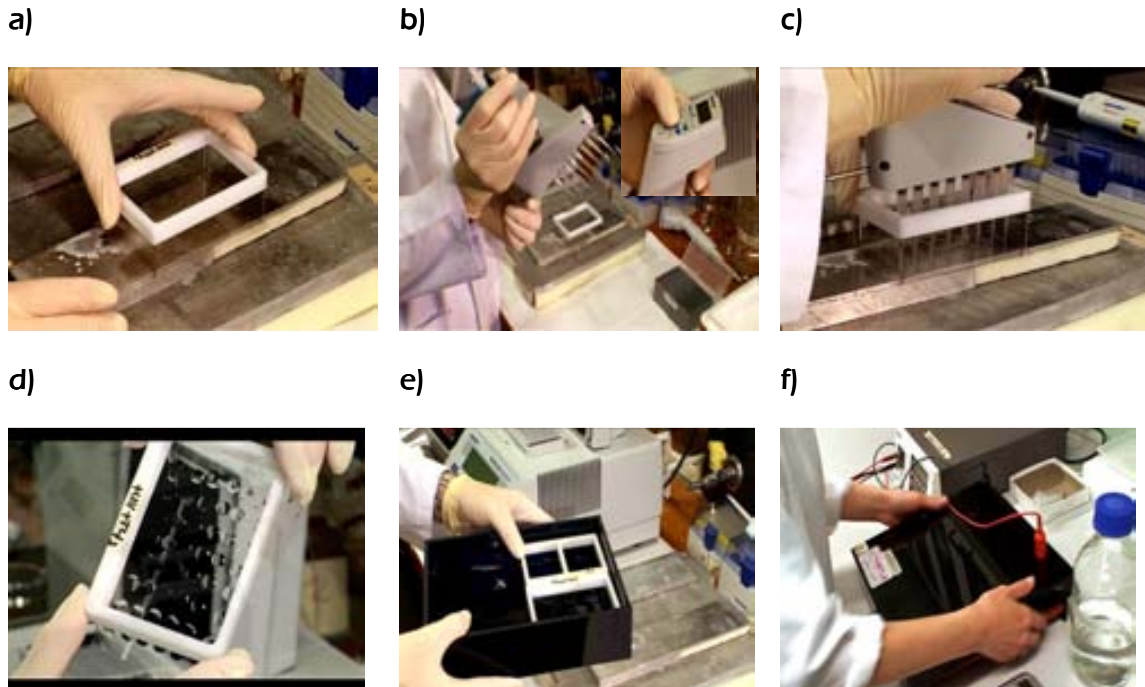


Figura 18: Secuencia fotográfica de las principales etapas del ensayo del cometa utilizando como soporte las láminas de Gelbond. **a)** Gelbond en su soporte ubicado sobre una placa de aluminio a 4 °C listo para cargar los geles. **b)** Programación de la pipeta dispensadora y ajuste de la distancia entre sus canales. **c)** Carga de los 48 geles sobre el Gelbond. **d)** Vista superior de un Gelbond conteniendo 48 geles solidificados por 5 min a 4 °C. **e)** Tratamiento alcalino de los geles. **f)** desnaturalización y electroforesis de los geles. La neutralización se realiza como en la fotografía e.

2.2. Optimización 2: utilización de enzimas de reparación; protocolo para detección de bases oxidadas

El ensayo del cometa es suficientemente sensible para detectar niveles bajos de daño genético presente como daño basal en células normales o como el resultado de tratamientos a bajas dosis de agentes genotóxicos. Para incrementar la especificidad del ensayo, se ha incluido otra modificación relevante añadiendo un paso adicional después de la lisis. El “nucleoide” de

DNA se digiere con endonucleasas (enzimas de reparación) que convierten lesiones específicas en roturas, incrementando la intensidad de la cola en comparación con los controles no tratados con la(s) enzima(s), y permitiendo la estimación de la frecuencia de este tipo de lesión.

En el tratamiento se utilizaron dos endonucleasas extraídas de *Escherichia coli*: la formamidopirimidina DNA glicosilasa (FPG) y la endonucleasa III (EndoIII). Estas enzimas nos fueron facilitadas por el Departamento de Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oslo, gracias a la gentileza del Prof. Andrew Collins. Ambas enzimas poseen una alta especificidad a la hora de detectar bases oxidadas (purinas y pirimidinas) removiéndolas del DNA lesionado. Por esta razón, se ha considerado pertinente incluir esta modificación del ensayo para así aumentar su especificidad y su sensibilidad.

Para realizar el ensayo con incubación enzimática, se preparan cuatro portaobjetos idénticos por muestra, de los cuales uno actuará como control, permaneciendo en lisis durante la incubación y es rotulado con el nombre de lisis (daño basal); y los tres restantes son sometidos a la incubación propiamente dicha, y codificados como buffer, FPG y EndoIII. Aquellos geles sin tratamiento enzimático proporcionan una estimación del daño basal (SB). Los geles sometidos a tratamiento enzimático revelan roturas y lesiones reconocidas y escindidas por las enzimas (SB + OX). Cuando se utiliza el porcentaje de DNA en la cola, y se asume una respuesta linealmente dependiente de la dosis, la diferencia $SB - (SB + OX)$ proporciona una medida del daño oxidativo "neto" de purinas/pirimidinas oxidadas (o alteradas).

El primer paso de la incubación son dos lavados con el buffer de reacción (40 mM HEPES; 0,1 M KCl; 0,5 mM EDTA; 0,2 mg/mL BSA; pH 8,0 con KOH) durante 5 min cada uno.

Previo a la incubación, la dilución enzimática para los portaobjetos se realizó de la siguiente manera: de un stock de enzimas a una concentración 1/3000 se tomaron 5 μ L de cada una y se diluyeron en 500 μ L de buffer de reacción para FPG/EndoIII (para diluir la enzima FPG se requiere que los 500 μ L de buffer de reacción contengan un 10% de glicerol para evitar la oxidación de

la misma) y se dispensaron en alícuotas de 10 μ L. En el momento de la incubación, se diluyó por última vez una de estas alícuotas de cada enzima en 300 μ L de buffer de reacción (esta vez sin glicerol), para finalmente depositar sobre cada gel 50 μ L de esta dilución. Cada gel se cubrió con cubreobjetos de 22 x 22 mm y los portaobjetos se colocan dentro de una cámara húmeda y se incubaron durante 30 min a 37 °C.

En caso de estar utilizando el Gelbond como soporte de los microgeles (también se preparan 4 idénticos), se depositan 5 μ L del stock en 25 mL de buffer de reacción previamente temperado (37 °C). Se sumergen los geles en las respectivas diluciones enzimáticas (o buffer sólo, que actuará como control) procurando dejarlos totalmente sumergidos y tapados para evitar cambios en la concentración por posible evaporación del buffer. El proceso se prolonga durante 30 min a 37 °C.

Pasados los 30 min se detiene la reacción enzimática, retirando los cubreobjetos y sumergiendo inmediatamente los portaobjetos (o Gelbond) en la solución de electroforesis para el tratamiento alcalino y, así, continuar con el protocolo (en este paso no hay que olvidar incluir las preparaciones que permanecieron en lisis durante la incubación).

2.3. **Optimización 3:** utilización de células congeladas

Los linfocitos de sangre periférica han sido mayoritariamente utilizados en los estudios de biomonitorización humana. Logísticamente, las muestras pueden requerir ser criopreservadas y almacenadas ya que, a veces, los periodos de muestreo pueden prolongarse bastante en el tiempo (meses e incluso años), con la consiguiente variabilidad en los resultados debido a las diferencias temporales. Por lo tanto, una posible solución consiste en aislar los linfocitos de las muestras que se vayan recogiendo y criopreservarlos en condiciones que permitan minimizar al máximo el daño en el DNA. La ventaja de la congelación de las células es que están disponibles en cualquier momento. Ahora bien, esta alternativa implica encontrar buenos protocolos para congelar y descongelar.

2.3.1. Protocolo de aislamiento de linfocitos de sangre periférica

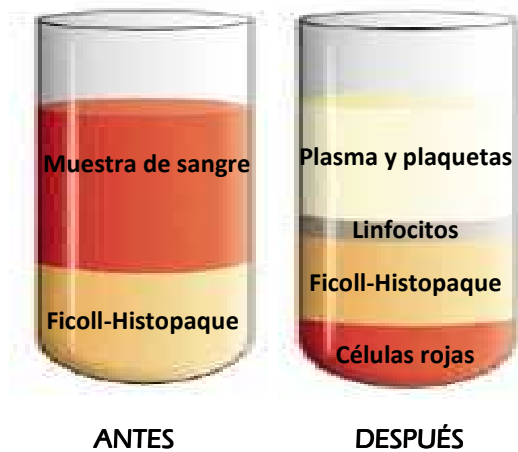
El protocolo convencional comienza con la obtención de 10 mL de sangre periférica por punción endovenosa y heparinizada al 1%. En condiciones estériles, se mezcla el volumen de sangre con un volumen igual de PBS, a temperatura ambiente, ya contenido en un tubo de centrifuga de 50 mL, y se homogeneiza por inversión del tubo un par de veces. Posteriormente, a un mismo volumen de Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma) contenido en otro tubo de centrifuga de 50 mL y posicionado con una inclinación aproximada de 45°, se le añade la sangre diluida muy lentamente desde la parte baja del tubo (la parte mas cercana al Ficoll) hacia arriba. La posición vertical del tubo se va recuperando paulatinamente, a medida que se va llenando para evitar la mezcla de las fases.

A continuación, se centrifuga a 1.500 g durante 30-35 min a temperatura ambiente. El tubo debe estar perfectamente equilibrado. Después de centrifugar y al ser una cantidad significativa de sangre, los linfocitos se hacen visibles conformando un anillo justo entre el plasma y el Ficoll-Histopaque 1077 fácilmente extraíble con el uso de una pipeta Pasteur plástica, recuperando así aproximadamente 3 mL de células blancas (**Figura 19a**). Finalmente el volumen de linfocitos recuperado se lava dos veces en 10 mL de PBS frío centrifugando a 4 °C durante 10 min a 1.500 g.

Aprovechando una de las ventajas del ensayo del cometa como es la de necesitar un pequeño número de células, se ha puesto a punto una variante de mucha utilidad en situaciones puntuales. Esto es, el aislamiento de linfocitos a partir de 30 μ L de sangre periférica obtenida por punción del tercio distal del dedo anular, utilizando una lanceta BD Microtainer® (mini-prep) (**Figura 19b**). Posteriormente, se procede de la misma manera descrita anteriormente, manteniéndose las proporciones de los materiales, soluciones y tiempo requerido. Así, los 30 μ L de sangre obtenida se mezclan con 100 μ L de PBS en tubos Eppendorf de 2 mL y se depositan 100 μ L de Ficoll-Histopaque a temperatura ambiente justo en el fondo evitando la mezcla de ambas fases. Posteriormente, se realiza una centrifugación a 200 g y a 4 °C durante sólo 3 min. Finalmente, se extraen los linfocitos succionando 100 μ L justo en la zona entre el PBS y el Ficoll con movimientos tanto concéntricos como paralelos y se

depositan en 100 μL de PBS. A diferencia del proceso convencional, este proceso se realiza en frío.

a)



b)

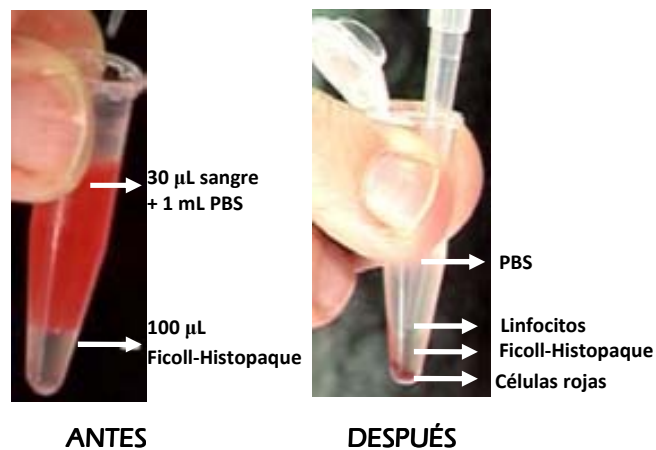


Figura 19: Capas de las fases formadas después de la centrifugación de **a)** 10 mL de sangre periférica obtenida por punción endovenosa; **b)** 30 μL de sangre periférica obtenida por punción de la porción distal del dedo anular, durante el aislamiento de linfocitos utilizando Ficoll-Histopaque.

Otra alternativa más práctica, pero no más eficiente en cuanto al porcentaje de recuperación de linfocitos, es la utilización de tubos de CPT (Cell Preparation Tubes) con 0,1 M de citrato de sodio como anticoagulante y con un gel de poliéster y Ficoll como medio de separación (**Figura 20**). La sangre se

deposita directamente por punción del tapón de goma del tubo y se centrifuga durante 30 min a 1.500 g a temperatura ambiente, previa homogeneización.

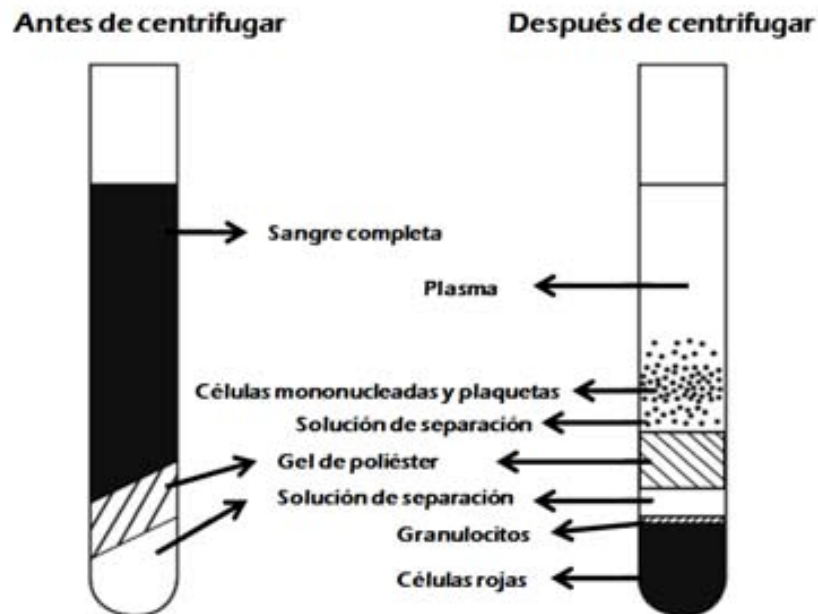


Fig. 20: Distribución de las capas celulares formadas en el tubo vacutainer CPT después de la centrifugación para el aislamiento de linfocitos de sangre periférica.

2.3.2. Protocolo de congelación de linfocitos de sangre periférica

Previo a la congelación, los linfocitos recién aislados se lavan y resuspenden en 10 mL en PBS. De esta suspensión se separan 10 μ L para determinar la densidad de la misma (y la viabilidad de las células por el método de exclusión utilizando azul de tripan) y calcular el volumen necesario de medio de congelación para obtener una concentración final de 3×10^6 células/mL de medio. Mientras se obtiene esta densidad, la suspensión de células se centrifuga por última vez y se descarta el sobrenadante, dejando el botón celular lo más seco posible.

El medio de congelación debe contener RPMI:FCS:DMSO en una proporción 70:20:10, respectivamente. El DMSO debe agregarse al final y directamente a los crioviales, ya que puede ejercer un efecto tóxico sobre las células afectando su viabilidad.

Se resuspende el botón celular muy lentamente en 1 mL del medio de congelación, previamente preparado y mantenido a 4 °C, utilizando una micropipeta y, una vez que todas las células se han disgregado, se añade lentamente el resto de medio. Se dispensa la suspensión celular en alícuotas de 0,27 mL de suspensión celular en crioviales de 1 mL que ya contengan 0,03 mL de DMSO filtrado (correspondiente al 10% del medio total de congelación) para obtener un volumen final de 0,3 mL. Se agita suavemente por inversión un par de veces y se depositan los viales en cajas especiales para su congelación paulatina y almacenamiento a -80 °C (tasa de congelación satisfactoria: 1 a 3 °C por minuto). La congelación paulatina de las células es esencial para preservar el DNA. Si se prevé que las muestras no serán usadas en un futuro inmediato, los crioviales pueden ser transferidos a tanques de nitrógeno líquido (LN₂) y almacenados allí por un largo periodo de tiempo. Muestras almacenadas por un periodo de tiempo de 5 meses a -80 °C y en LN₂ no muestran diferencias en los niveles de daño genético.

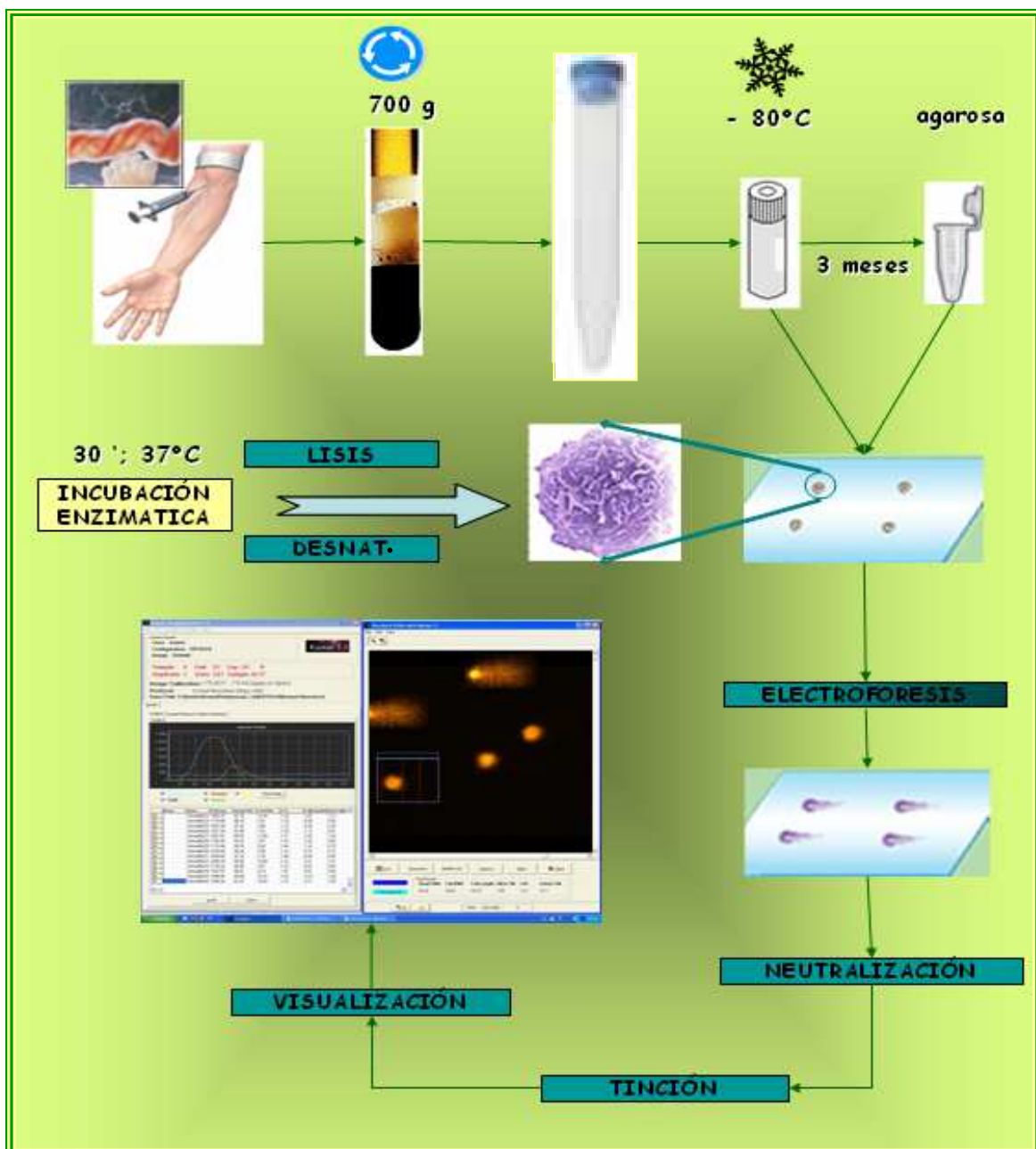
2.3.3. Protocolo de descongelación de linfocitos de sangre periférica

Antes de extraer los viales de -80 °C (o del LN₂) para la descongelación hay que rotular tubos de centrifuga de 15 mL (tantos como viales se quieran descongelar) e introducir en cada uno de ellos 10 mL de PBS a 4 °C. Luego, se sacan los viales congelados, se ubican sobre hielo y se deposita 1 mL de PBS a 4 °C en el interior de cada uno, removiendo suavemente con la pipeta hasta conseguir que el cubito de hielo que contiene las células se desprenda de las paredes del tubo. Justo en este momento, se decanta este contenido en el interior del correspondiente tubo de centrifuga; aquí, el cubito de hielo terminará de fundirse consiguiendo que el medio de congelación (sobre todo el DMSO) se diluya rápidamente. Si se cuenta con un gran número de viales para descongelar, se recomienda sacarlos de -80 °C por tandas. Se centrifugan los tubos por 10 min a 700 g y a 4 °C, se resuspende muy suavemente el botón celular en 1 mL de PBS frío y se completa nuevamente hasta 10 mL. Se repite la centrifugación y finalmente, se resuspende de la misma manera en 1 mL de PBS frío y se traslada la suspensión a tubos Eppendorf debidamente rotulados. Se cuenta densidad y la viabilidad de las células, por exclusión de captación con

azul de tripan, para la comparación de estos parámetros con los obtenidos antes de congelar y así disponer de un indicador de la mortalidad debida al proceso de congelación/descongelación.

Los esquemas de la **figura 21** muestran de manera general los dos protocolos modificados a) portaobjetos y b) Gelbond, utilizando distintos tipos de aislamiento de los linfocitos, que se pueden usar indistintamente para una versión o para la otra.

a)



b)

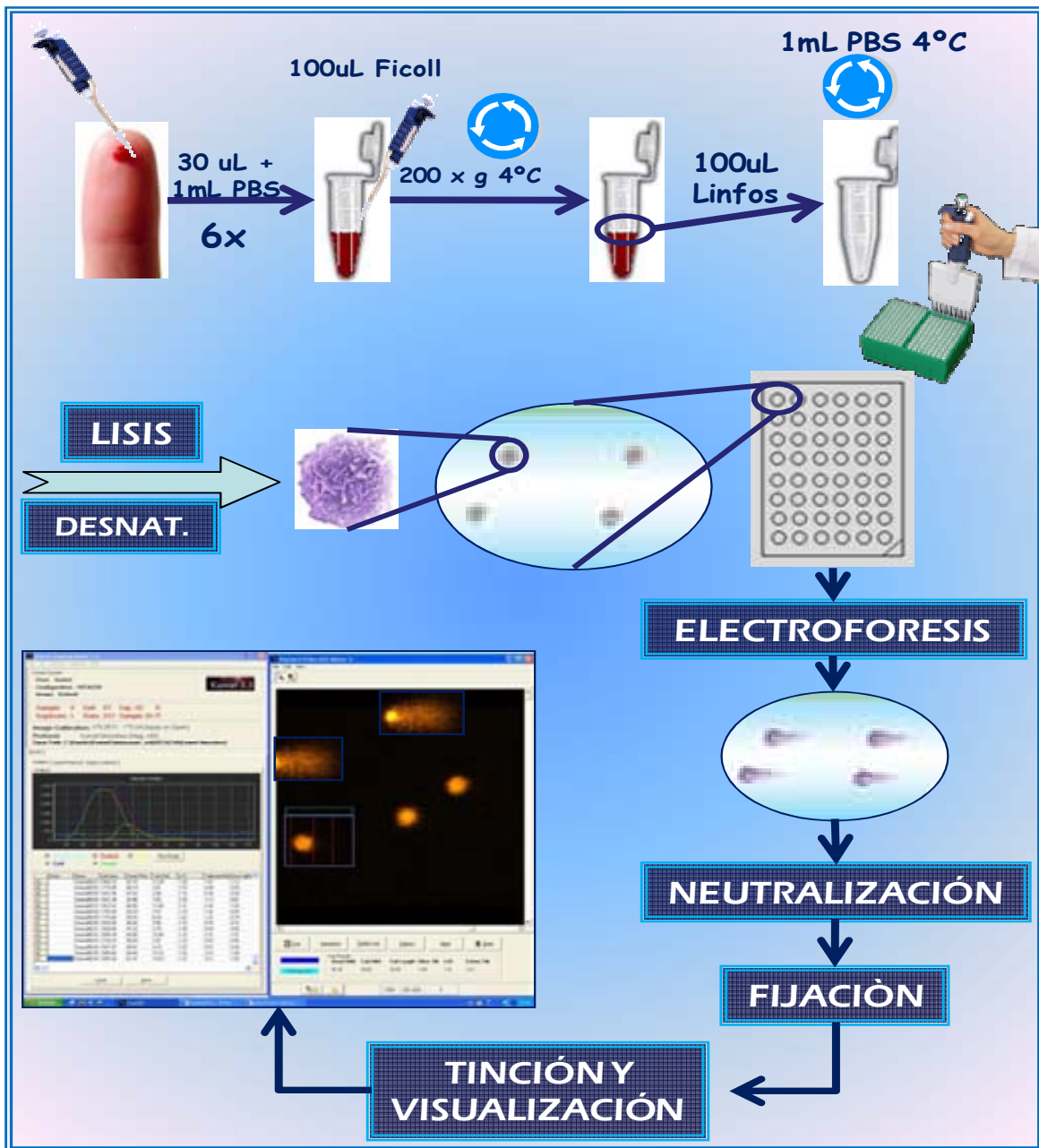


Figura 21: Protocolos del ensayo del cometa de la versión alcalina descrito por Singh *et al.* (1988).
a) Versión convencional utilizando portaobjetos. Los linfocitos son obtenidos de sangre periférica por punción endovenosa o, de cordón umbilical, y aislados con tubos de CPT. **b)** Versión Gelbond film con formato de 48 microgeles. Los linfocitos son aislados de sangre obtenida por punción distal del dedo anular (“miniprep”). La figura muestra todas las etapas de la técnica, desde la obtención de la muestra hasta su visualización mediante el uso del programa Komet 5.5.

3. Validación de las variaciones introducidas

La técnica del cometa se ha considerado como un ensayo de gran potencial para la determinación de daño en el DNA, llegándose a convertir en una herramienta para detección de genotoxicidad a nivel industrial (Kiskinis *et al.*, 2002). Hoy en día, los investigadores involucrados en estudios de biomonitorización y epidemiología sienten la necesidad de poder contar con esta herramienta fácil, económica y rápida, tanto para el almacenamiento masivo de muestras como para la obtención de resultados. Las modificaciones introducidas persiguen simplificar el proceso incrementando el número de muestras que se procesan en un determinado experimento. Sin embargo, cualquier modificación introducida en un protocolo, no debe alterar la capacidad de detectar el daño existente en una determinada muestra. Esto exige llevar a cabo estudios de validación de las modificaciones, antes de utilizarlas en la obtención de resultados experimentales concretos. A continuación, se indica cómo se han llevado a cabo los estudios de validación encaminados a demostrar que las modificaciones en los protocolos no alteran su capacidad de detectar los niveles de daño genético.

3.1. Portaobjetos *vs.* Gelbond film: hacia el procesamiento rápido de muestras múltiples

Con el fin de minimizar el tiempo de manipulación y la variabilidad, y aumentar el número de muestras analizadas en un mismo ensayo, hemos puesto a punto en nuestro laboratorio la variación consistente en modificar el soporte utilizado para anclar las células ya embebidas en agarosa. Además, se ha demostrado mediante la comparación del uso de portaobjetos o Gelbond, que no existen diferencias en los resultados obtenidos.

El método fue estandarizado mediante experimentos sencillos basados en el protocolo de McNamee *et al.* (2000) con ciertas modificaciones. **La Tabla VI** muestra los distintos diseños de los experimentos, utilizando:

- (1) controles frescos no expuestos y expuestos a peróxido de hidrógeno, históricamente utilizado en estudios de genética toxicológica por su conocida genotoxicidad.
- (2) controles congelados no expuestos y expuestos a radiación gamma a una dosis de 5 Gy (tasa de dosis: 6 Gy/min).









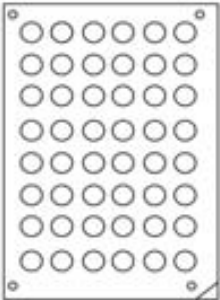
Todos los controles frescos fueron obtenidos (al momento del experimento) mediante punción del tercio distal del dedo anular (mini-prep).

Las células a tratar con peróxido de hidrógeno fueron expuestas antes de ser embebidas en agarosa, con 1 mL de dicho compuesto a las concentraciones requeridas (25, 50, 100, 200 y 250 μ M) durante 5 min sobre hielo. A continuación, se centrifugaron y se lavaron con PBS frío para luego volver a centrifugar y dejar el sobrenadante necesario para obtener la densidad celular requerida, dependiendo del soporte a utilizar (portaobjetos o película Gelbond).

Los controles congelados fueron obtenidos de un donante sano y sin antecedentes de exposición a agentes genotóxicos. La obtención de la muestra se llevó a cabo en el Servicio Asistencial de Salud de la Universitat Autònoma de Barcelona. Al respecto, se extrajeron 10 mL de sangre periférica mediante punción endovenosa con heparina al 1%, y se procedió al aislamiento de los linfocitos.

Después, se determinó la densidad celular y, en base a la misma, los linfocitos se resuspendieron en un volumen de medio de congelación, que permitiera obtener la densidad de congelación apropiada, y se alicuotaron en los crioviales. A la mitad de las alícuotas se les agregó un 10% de DMSO filtrado, fueron homogeneizadas suavemente por inversión e inmediatamente congeladas de manera paulatina (controles negativos). La otra mitad se llevó a irradiar sobre hielo (controles positivos 5 Gy) y, de vuelta en el laboratorio, se añadió el 10% de DMSO filtrado, se homogeneizó suavemente por inversión y finalmente se congeló paulatinamente a -80 °C.

Tabla VI: Diseño de los experimentos de estandarización del ensayo del cometa utilizando portaobjetos y Gelbond® film.

Diseño		Notas
Control fresco →		Relación dosis-respuesta a 5 concentraciones de peróxido de hidrógeno (tratamiento en PBS por 5 min a 4 °C) mas tres controles: (1) fresco sin irradiar (2) congelado sin irradiar (3) congelado irradiado a 5 Gy. Total 8 muestras con 2 geles de 70 µL con 10.000 células en cada portaobjetos Se contabilizaron 100 células entre los 2 geles de cada muestra.
25 µM →		
50 µM →		
100 µM →		
200 µM →		
250 µM →		
0 Gy →		
5 Gy →		
Control fresco →		Relación dosis-respuesta a 5 concentraciones de peróxido de hidrógeno (tratamiento en PBS por 5 min a 4 °C) mas tres controles: (1) fresco sin irradiar (2) congelado sin irradiar (3) congelado irradiado a 5 Gy. Total 8 muestras con 6 microgeles de 7 µL con 500 células cada uno (48 microgeles). Se contabilizaron 100 células entre los 6 geles de cada muestra.
25 µM →		
50 µM →		
100 µM →		
200 µM →		
250 µM →		
0 Gy →		
5 Gy →		

La irradiación se llevó a cabo en la Unidad Técnica de Protección Radiológica de la Universitat Autònoma de Barcelona (UTPR-UAB). Cabe señalar también que las muestras fueron mantenidas a 4 °C antes, durante y después de la irradiación con el objeto de disminuir al máximo el metabolismo celular y así evitar posibles procesos de reparación post-irradiación.

El irradiador, específico para muestras biológicas y procedimientos experimentales, corresponde a un IBL 437 tipo H, N°: 701 (SCHERING CIS Bio International) contiene 189 TBq (5.100 curios) de cesio-137. Los niveles de radiación en la superficie estuvieron por debajo de 2,5 µSv/h, conforme a las regulaciones internacionales pertinentes.

Las muestras se colocaron dentro del cilindro portador de la unidad, de 3,8 L de capacidad. Cuando el irradiador es activado desde el panel de control, el cilindro portador de la muestra comienza su rotación a 18 rpm para así proporcionar una exposición homogénea a toda la muestra. La secuencia

temporal de irradiación culmina cuando se alcanza la dosis requerida considerando la tasa correspondiente (6 Gy/minuto).

El experimento se repitió en tres ocasiones, cada vez con ambas versiones en paralelo, teniendo en cuenta las modificaciones que cada versión implica.

3.2. Detección del daño oxidativo utilizando enzimas de reparación

Aunque el ensayo del cometa no es la única técnica para medir el daño oxidativo en el DNA, se ha comprobado que es una de las técnicas más sensibles y, además, libre de artefactos. Se han realizado experimentos *in vitro* para validar el buen funcionamiento de las enzimas en nuestro laboratorio. Es decir, utilizando cultivos de líneas celulares e induciendo la oxidación de las bases del DNA, tanto purinas como pirimidinas, con un agente oxidante conocido (fotosensibilizador Ro 19-8022 más luz visible), para posteriormente determinar el daño oxidativo utilizando enzimas de reparación de bases oxidadas. Los experimentos se realizaron como se explica a continuación.

3.2.1. Cultivo celular en monocapa

Para los experimentos de validación enzimática se mantuvieron cultivos celulares de la línea epitelial humana HeLa, creciendo a modo de monocapa en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 1% penicilina/estreptomicina (5.000 U / 5.000 µg/mL) y 1% de L-glutamina 200 mM.

Los cultivos se incubaron en frascos Falcon estériles a 37 °C en un incubador con 5% de CO₂ y 95% de humedad, manteniendo una confluencia del 70% para lograr un crecimiento óptimo y una baja mortalidad celular.

En el momento del experimento, las células fueron lavadas con PBS y cosechadas mediante tripsinización durante 3-5 min, o hasta que estuvieran totalmente individualizadas. La tripsinización se detuvo añadiendo 7 mL de medio de cultivo sin suplementar, para luego traspasar la suspensión a tubos y centrifugar a 700 g por 7 min a 20 °C. El botón celular fue resuspendido en un

volumen de PBS que permitiera obtener una densidad de 1×10^6 células/mL. Para cada uno de los 5 tratamientos se utilizó 1 mL de esta suspensión contenida en tubos Eppendorf.

3.2.2. Inducción de oxidación de bases

De los 5 tubos por experimento conteniendo 1×10^6 células cada uno, a 4 de ellos se les añadió 1 μ L de una solución del fotosensibilizador a la concentración de 1 mM, obteniéndose una concentración final de 1 μ M. Las suspensiones fueron homogeneizadas y vaciadas en placas de Petri de 35 mm de diámetro y cada una de ellas fue expuesta a la luz visible por diferentes periodos de tiempo. El experimento contempla 1 tubo Eppendorf con 1 millón de células, que se utilizó como control negativo (sin Ro ni luz), y 4 placas con un millón de células cada una y con una concentración de 1 μ M de Ro. Tres de ellas fueron irradiadas con luz visible durante 0, 90 y 180 segundos, respectivamente, y la placa sin irradiar sirvió para comparar el efecto producido por el fotosensibilizador sin irradiación. El diseño experimental referido se muestra esquemáticamente en la **Tabla VII**.

Tabla VII: Diseño experimental para la validación de los ensayos de determinación de daño oxidativo en el DNA mediante la utilización de endonucleasas en el ensayo del cometa. -Ro: tratamiento sin fotosensibilizador; s: segundos.

Tratamiento	Lisis	Buffer	FPG	EndoIII
-Ro+0 s (sin Ro; sin luz)				
+Ro+0 s (con Ro; sin luz)				
+Ro+90 s (con Ro; con luz)				
+Ro+180 s (con Ro; con luz)				
+Ro+300 s (con Ro; con luz)				

La irradiación se realizó a 4 °C colocado las placas a 33 cm de una lámpara halógena de 500 W durante los tiempos ya descritos.

Después de la irradiación, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, centrifugando a 700 g durante 7 min a 4 °C. Finalmente, fueron resuspendidas en 1 mL de PBS para luego realizar el ensayo del cometa utilizando dos geles por portaobjetos y con digestión enzimática, resultando 4 preparaciones por tratamiento.

Con respecto al compuesto utilizado para inducir daño oxidativo en el DNA, el Ro 19-8022 (1-((10-cloro-4-oxo-3-fenil-4H-benzo(a)quinolizina-1-il)carbonil)-2-pirrolidinmetanol) es un fotosensibilizador polar de la familia de las pirrolidinas que, en presencia de luz visible, interactúa directamente con el DNA produciendo daño oxidativo, principalmente aumentando al concentración de 8-oxoG (Figura 22). Este compuesto fue gentilmente facilitado por F. Hoffmann-La Roche SA.

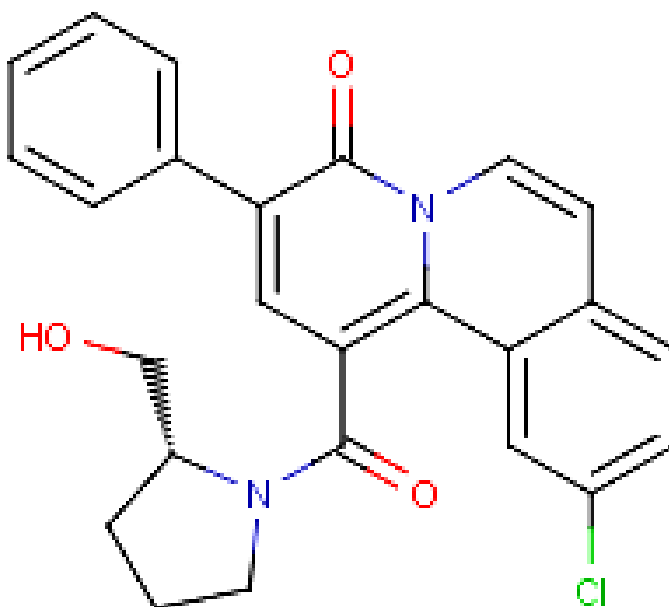


Figura 22: Fórmula estructural del Ro 19-8022 (1-((10-cloro-4-oxo-3-fenil-4H-benzo(a)quinolizina-1-il)carbonil)-2-pirrolidinmetanol). Fórmula química $C_{25}H_{21}ClN_2O_3$.

3.3. Ensayos de congelación: una buena herramienta para el almacenamiento masivo de muestras

El objetivo de estos ensayos fue evaluar si el proceso de criopreservación de las células podía influir tanto en el daño basal total como en el daño basal oxidativo. En los experimentos se determinó la disminución de viabilidad y se valoró la migración del DNA de las células, antes y después de congelar.

Para ello, se extrajo sangre periférica de 4 voluntarios sanos, mediante punción endovenosa, en el Servicio Asistencial de Salud de la Universitat Autònoma de Barcelona. Posteriormente, los linfocitos se aislaron y congelaron siguiendo los protocolos anteriormente descritos. Se calculó la pérdida de viabilidad celular producida por la congelación, mediante la exclusión de captación utilizando el azul de tripan.

Se aplicó el ensayo del cometa en células frescas y congeladas de estos 4 voluntarios y se comparó el daño genético basal y oxidativo, utilizando portaobjetos como soporte.

4. Aplicaciones del ensayo del cometa en dos áreas importantes de la genotoxicología

Desde que el primer protocolo del ensayo del cometa fue publicado por Singh *et al.* (1988), su aplicación se ha extendido en diversas áreas: aplicaciones clínicas, biomonitorización humana, radiobiología, genética toxicológica, ecotoxicología genética, etc. En este trabajo de Tesis, el ensayo se ha desarrollado, optimizado y aplicado en dos de estas áreas: se ha elaborado una curva de calibración como biodosímetro de daño genético inducido por radiación ionizante, y se ha realizado un estudio de biomonitorización determinando el daño genético basal y oxidativo de dos cohortes de madres e hijos.

4.1. Construcción de una curva de calibración

La capacidad de la radiación ionizante de producir roturas en el DNA es un hecho muy bien conocido. Si las roturas producidas en la célula por exposición a diferentes dosis de radiación son detectadas con el ensayo del cometa, se puede elaborar una curva estándar, con una frecuencia de roturas expresada en equivalentes/Gray, o roturas por unidad de longitud de DNA, basándonos en el supuesto que 1 Gy induce 0,31 roturas/10⁹ Da de DNA (Ahnstrom & Erixon, 1981), lo que aproximadamente corresponde a 1.000 roturas por célula diploide en mamíferos (Pitozzi *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2008)

Hemos construido una curva dosis-respuesta midiendo *in vitro* la respuesta a dosis crecientes de radiación gamma en el ensayo del cometa. La curva se elaboró con muestras de sangre de 9 mujeres sanas que no presentaban evidencias de desórdenes genéticos ni historial de exposición genotóxica previa.

La toma de muestras se realizó en el Servicio Asistencial de Salud de la Universitat Autònoma de Barcelona. Se obtuvieron 2 mL de sangre de cada donante mediante punción endovenosa en vacutainers heparinizados y se transportaron seguidamente a nuestro laboratorio. La sangre se centrifugó y el sobrenadante se eliminó. El sedimento celular se resuspendió en igual volumen de medio RPMI 1640 (Gibco) sin suplementar. Luego, cada muestra se dividió en 6 tubos Eppendorf de 1,5 mL (250 µL por tubo) y fueron irradiadas. Antes y después de la irradiación con rayos gamma, las muestras se mantuvieron en hielo para reducir la actividad metabólica y, fundamentalmente, minimizar la reparación, como ya se ha explicado anteriormente.

La irradiación se realizó en la UTPR-UAB. Cinco fueron las dosis de irradiación administradas a cada muestra: 1, 2, 4, 6 y 8 Gy. Una muestra se dejó sin irradiar para ser utilizada como control negativo.

El protocolo del ensayo aplicado en este caso fue el estándar, es decir, con un solo gel en toda la superficie del portaobjetos, siguiendo la versión descrita por Singh *et al.* (1988) con ligeras modificaciones.

En una segunda instancia, después de la construcción de las curvas pertinentes, se procedió a la validación de los resultados. Para ello, se evaluaron nuevamente muestras de sangre de dos individuos del grupo estudiado (elegidos al azar). Las muestras se sometieron a dos dosis de radiación, desconocidas en el momento del análisis, pero dentro del rango evaluado, y analizadas a ciegas con el fin de determinar con mayor grado de objetividad el nivel de daño inducido.

Finalizada la evaluación, se procedió a la descodificación de las dos dosis utilizadas y los resultados se compararon con los obtenidos en la curva dosis-respuesta elaborada.

Se procedió también al cálculo de la frecuencia basal de roturas, asumiendo que 1 Gy produce aproximadamente $0,31 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da}$ de DNA (Ahnstrom & Erixon, 1981).

4.2. Biomonitorización en dos cohortes de madres e hijos: estudio piloto para la determinación de daño basal y oxidativo

El ensayo del cometa, eficiente en la medición de roturas del DNA a nivel de células individualizadas, es fácilmente aplicable a linfocitos humanos por lo que constituye una herramienta adecuada para los estudios de biomonitorización humana. Hoy en día, existen numerosos estudios que han establecido niveles basales de daño, específicamente de daño oxidativo con el ensayo del cometa adecuadamente modificado, incorporando la incubación del DNA con endonucleasas específicas (Collins *et al.*, 1995).

Por tanto, otro de los objetivos relevantes de este trabajo de Tesis ha supuesto aplicar esta metodología en dos poblaciones de madres e hijos y, así, establecer el daño oxidativo, utilizando las endonucleasas FPG y EndoIII que detectan las purinas y las pirimidinas oxidadas, respectivamente.

4.2.1. Caracterización de las poblaciones

El estudio se realizó utilizando dos poblaciones de madres e hijos recién nacidos de dos hospitales de la provincia de Barcelona (Corporació Santària Parc Taulí de Sabadell y Hospital del Mar de Barcelona) (**Figura 23**). La primera población está formada por 31 parejas y corresponde a nacimientos ocurridos entre el 8 de mayo y el 26 julio del 2007; la segunda población, constituida por 40 parejas, se reclutó entre el 22 de octubre de 2008 y el 16 de enero de 2009. Previamente a la toma de muestras (es decir, antes del parto), cada una de las madres aceptó participar voluntariamente en el estudio, firmando el correspondiente consentimiento, una vez informadas acerca de los objetivos.

Paralelamente a la extracción de las muestras biológicas, y para tener un buen conocimiento de las características de las poblaciones en estudio, cada voluntaria se sometió a una encuesta exhaustiva, con el fin de obtener información de interés para el posterior análisis e interpretación de los resultados. Debido a que esta parte del trabajo de Tesis se ha desarrollado en el contexto del proyecto de investigación europeo integrado NewGeneris (Newborns and Genotoxic exposure risk), cuyo objetivo principal es evaluar la hipótesis de que la exposición materna, durante la gestación, a compuestos químicos ambientales y/o de la dieta conducen a eventos mutacionales en sus hijos, lo que implica un incremento del riesgo de cáncer y/o desórdenes inmunológicos durante la infancia. La encuesta fue diseñada para satisfacer las inquietudes de todas las investigaciones involucradas en el proyecto, por lo que en este trabajo, hemos tenido en cuenta aproximadamente un sólo 10% de la información recogida. Esto es, datos habituales de demografía (edad, lugar de nacimiento lugar de residencia), preguntas relacionadas con el historial médico (enfermedades, medicación y suplementos vitamínicos durante el embarazo), hábitos de consumo (alcohol, tabaco, café), dieta (consumo diario de carnes rojas, pescados, frutas y verduras) y otros factores que pudieran inducir daño genotóxico. El objeto de esta encuesta es el de poder detectar cualquier posible factor de confusión que pueda influir en los resultados obtenidos.



Figura. 23: Mapa de la provincia de Barcelona donde figuran las localidades de procedencia de las dos poblaciones estudiadas. Población I: Sabadell; población II: Barcelona.

4.2.2. Obtención de las muestras de sangre

La extracción de sangre fue realizada por profesionales de enfermería. Como el proyecto NewGeneris comprende diversas técnicas, no sólo se extrajo sangre para realizar el ensayo del cometa sino que el volumen final obtenido de cada individuo fue de 39 mL de sangre periférica (madre) y 29 mL de cordón umbilical (hijo). De estas cantidades, se destinan 8 mL para el aislamiento de los linfocitos en tubos CPT, en Sabadell, y en vacutainers heparinizados en Barcelona, destinados a la realización del ensayo del cometa. El traslado del material biológico desde los hospitales hasta nuestro laboratorio se realizó dentro de las dos horas siguientes al parto, a temperatura ambiente, manteniendo los tubos en posición horizontal y evitando movimientos bruscos.

Una vez las muestras llegaban al laboratorio del Grupo de Mutagénesis del Departamento de Genética y de Microbiología de la UAB, se procedía al aislamiento y congelación de los linfocitos y a la realización del ensayo del cometa, siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

Sólo el 30% de los linfocitos obtenidos en el proceso de aislamiento fueron congelados para evaluar el daño en el DNA. El 70% restante fue igualmente congelado pero destinado a estudiar la reparación por el grupo del Departamento de Nutrición de la Universidad de Oslo, que dirige el Prof. Andrew Collins, utilizando también el ensayo del cometa.

4.2.3. Diseño experimental

Las muestras de ambas poblaciones se descongelaron siguiendo el protocolo de descongelación descrito anteriormente, esto es, añadiendo a cada vial 1 mL de PBS a 4 °C hasta desprenderse el cubo de hielo que contiene las células. Cabe recordar que para los experimentos con incubación enzimática se prepararon 4 portaobjetos por individuo o 4 Gelbonds idénticos por experimento.

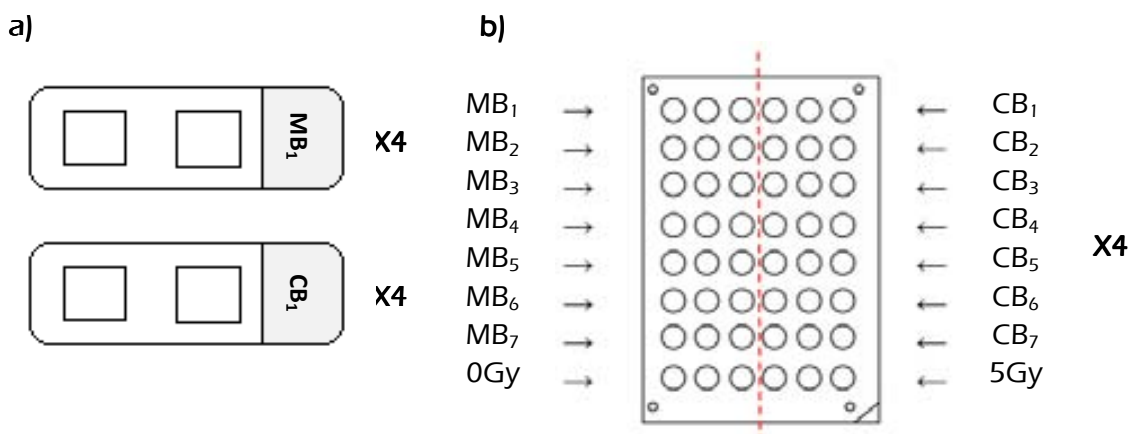


Figura 24: Distribución de los microgeles de agarosa a) Versión convencional: dos microgeles de cada individuo son ubicados en un portaobjetos; b) Versión Gelbond film: 3 microgeles de cada individuo son ubicados sobre la lámina Gelbond, en total cada lámina soporta 48 geles. MB: muestra de madre; CB: muestra de cordón; 0 Gy: control negativo sin irradiar; 5 Gy: control positivo irradiado con 5 Gy.

La **Figura 24** muestra el esquema de los experimentos para cada una de las versiones: a) 1 portaobjetos cargado con 2 geles de 70 μL y con 20.000 células del mismo individuo. Si el ensayo a realizar incluye (como es en este caso) incubación enzimática, se requieren 4 portaobjetos idénticos. Por este motivo, en cada experimento sólo es posible analizar 2 parejas debido a la capacidad del tanque de electroforesis; b) un film Gelbond cargado con 48 microgeles que contiene 7 parejas de madres e hijos, un control negativo (linfocitos aislados congelados) y un control positivo (linfocitos aislados y expuestos a radiación gamma a una dosis de 5 Gy). De la misma manera, si el experimento requiere de incubación enzimática, se deben preparar 4 Gelbonds idénticos a modo de controles de la incubación.

5. Estadística

Los datos de todos los experimentos realizados se obtuvieron mediante análisis de imágenes utilizando el programa Komet 5.5, y el parámetro utilizado para la valoración de la migración fue el porcentaje de DNA en la cola. Antes de proceder a los análisis estadísticos, a todos los datos se les verificó la normalidad utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov. Se asumieron diferencias estadísticamente significativas a valores de $p < 0,05$ y diferencias altamente significativas a valores de $p < 0,001$.

Los programas utilizados para la elaboración de gráficos y para los análisis estadísticos, propiamente dichos, fueron el Excel 2007 y el SPSS 17.0.

5.1. Estadística utilizada en los ensayos de validación

Para la prueba de validación de los formatos de dos y cuarenta y ocho geles se utilizó la t de Student para comparación de medias de muestras independientes (comparación entre experimentos) y de muestras relacionadas (comparación dentro del experimento). Para analizar la relación entre los dos métodos se utilizó la correlación de Pearson.

Para los ensayos de congelación, se compararon las medias de los linfocitos frescos y congelados de acuerdo al nivel de daño basal y oxidativo (nivel de purinas y pirimidinas oxidadas). Para ello se utilizó la t de Student.

Para los ensayos de validación de las enzimas, se utilizó estadística no paramétrica ya que los datos no siguieron la distribución normal. Así, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias entre el daño oxidativo basal y el inducido para cada tiempo de irradiación. También se utilizó el test de contraste no paramétrico de Wilcoxon para detectar diferencias dentro de cada tratamiento. Por último, se evaluó la correlación entre el tiempo de irradiación con luz visible y el porcentaje de DNA en la cola mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

5.2. Estadística utilizada para los estudios de aplicación del ensayo

5.2.1. Construcción de una curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se utilizaron tests paramétricos. La prueba de la t de Student fue aplicada para comparar medias entre cada uno de los tratamientos y el control. Para establecer las relaciones dosis-respuesta, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson.

5.2.2. Biomonitorización de dos cohortes de madres e hijos: determinación del daño basal y oxidativo

Para el análisis del estudio de biomonitorización de dos cohortes madres-hijos se aplicaron pruebas t de Student y de X^2 para comparar la descriptiva de las poblaciones tanto de madres como de neonatos. En el caso del consumo de carne, café, pescado y fruta por parte de las madres, los datos no presentaron distribución normal por lo que las medias fueron comparadas con el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Para el análisis de los datos de daño basal y oxidativo se utilizaron pruebas t para comparación de medias. Previo a esta comparación, a la

población 2 se le aplicó un factor de corrección para eliminar la variabilidad entre experimentos, corrección que no fue posible realizar en la población 1 por las limitaciones del soporte utilizado.

Se establecieron correlaciones entre los valores de daño de las madres y los de sus hijos mediante el coeficiente de Pearson.

Finalmente, para verificar la influencia de los hábitos de cada una de las poblaciones en los niveles de daño basal y oxidativo se realizaron análisis de regresión lineal. Cada modelo construido debió cumplir con las condiciones estadísticas para tener la máxima bondad de ajuste posible.

De acuerdo con los criterios de significación, sólo se incorporaron al modelo aquellas variables cuyo nivel crítico asociado a su coeficiente de correlación parcial, al contrastar la hipótesis de independencia, fuese menor que 0,05 quedando fuera del modelo de regresión si ese nivel crítico era mayor que 0,10.

Por otro lado, una variable pasó a ser parte del modelo de regresión si el valor del estadístico F , utilizado para contrastar la hipótesis de independencia, era mayor que 3,84 y quedó excluida si este valor era menor que 2,71.

Los criterios de tolerancia también fueron tenidos en cuenta, cuando las variables cumplían los criterios de significación, esto es, la tolerancia media de las variables independientes debía ser superior a 0,6.

En los casos donde más de un modelo cumplía con los criterios de significación, se eligió aquel que presentaba un R^2 corregido (coeficiente de determinación corregido) mayor y un menor error típico de la estimación.

Los modelos se obtuvieron aplicando la metodología opcional del programa SPSS "hacia atrás", donde se comienza incluyendo en el modelo todas las variables independientes que se quieren contrastar y luego se procede a eliminarlas una a una. La primera variable eliminada es aquella que, además de

no cumplir con los criterios de significación, posee el coeficiente de regresión más bajo en valor absoluto. En cada paso sucesivo se fueron eliminando las variables con coeficientes de regresión no significativos, siempre en orden inverso a su nivel crítico.

La eliminación de variables finaliza cuando no quedan variables en el modelo que cumplan con los requisitos estadísticos de significación y de tolerancia establecidos.

IV. Resultados

1. Resultado de las modificaciones introducidas

1.1. Portaobjetos vs. Gelbond®

Uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue la optimización del ensayo mediante algunas modificaciones técnicas que nos permitieran, sobre todo, analizar el mayor número de muestras posible en un mismo ensayo, lo que redundará en una mayor eficacia en la obtención de resultados. Aunque en un principio se dobló el número de muestras, colocando dos en cada soporte, la verdadera mejora ha consistido en sustituir el soporte de vidrio por el soporte de poliéster (Gelbond) por las múltiples ventajas que supone su uso. Aparte de la facilidad de manipulación y estabilidad de las muestras, este soporte permite la colocación de 48 geles en un soporte de 7,5 x 10,5 cm que puede utilizarse en los microscopios estándar. El cambio de soporte no debe suponer un cambio en la formación de los cometas ni tampoco en los valores de daño detectado.

Para esto, se compararon los valores obtenidos con el método convencional (portaobjetos, donde por cada experimento se pueden analizar 20 muestras distintas con su réplica) con el método del Gelbond (donde por cada experimento se pueden llegar a analizar 96 muestras con su réplica, es decir, 192 geles).

La comparación se llevó a cabo mediante experimentos dosis-respuesta sencillos utilizando linfocitos aislados expuestos a dosis crecientes de H₂O₂. La **Figura 25** muestra la respuesta de los linfocitos utilizando ambas metodologías donde se graficó la media ± EE de tres experimentos independientes en cada caso. La prueba *t* de Student para muestras relacionadas arrojó diferencias significativas entre cada dosis y su respectivo control ($P < 0,05$; $\alpha = 0,05$), lo que indica que ambos protocolos son capaces de detectar el daño inducido por el H₂O₂ en el rango de dosis señalado.

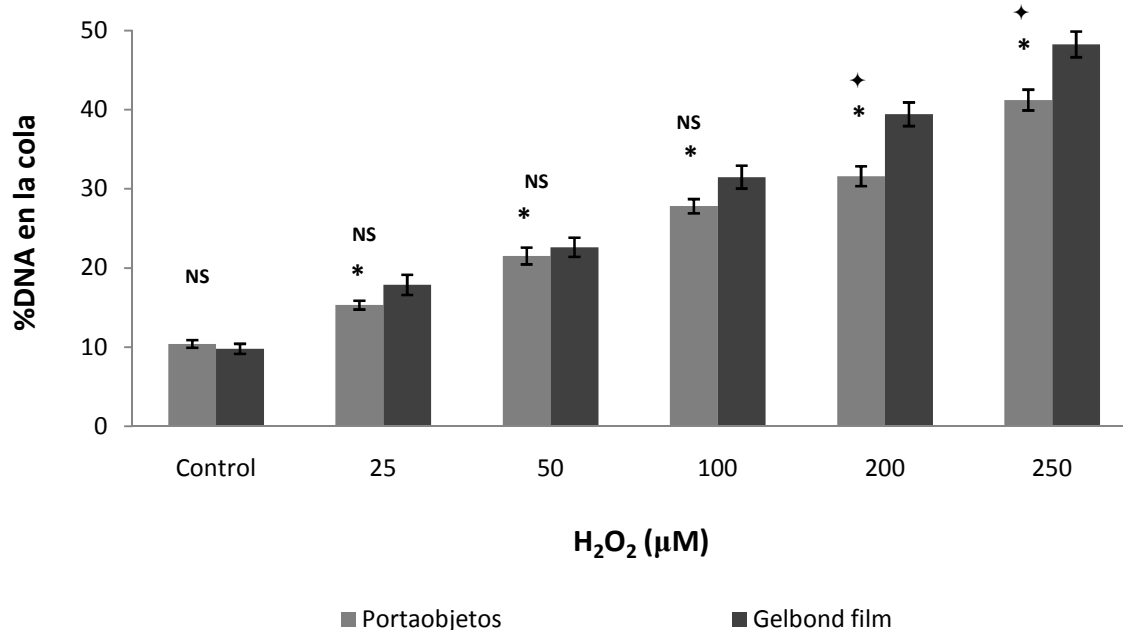


Figura 25: Representación gráfica de los valores obtenidos (media \pm EE) mediante ambas técnicas, aplicando concentraciones crecientes de H₂O₂. *: Diferencias significativas entre muestras relacionadas con respecto a su control, prueba *t* de Student $P < 0,01$. NS: diferencias no significativas entre muestras independientes $P > 0,05$. ◆: Diferencias significativas, prueba para muestras independientes $P < 0,05$.

Cuando se llevan a cabo las comparaciones entre las técnicas para cada concentración evaluada, sólo se ven diferencias significativas a dosis altas (200 µM y 250 µM $P < 0,05$; $\alpha = 0,05$), lo que podría resultar de la gran variabilidad observada en este tipo de tratamientos. Aunque se detectaron diferencias significativas a las dos dosis más elevadas, el coeficiente de correlación de Pearson resultó ser bastante alto (0,987) y significativo ($P < 0,01$) (**Figura 26**), lo que estaría indicando que las dos técnicas se comportan de manera muy similar.

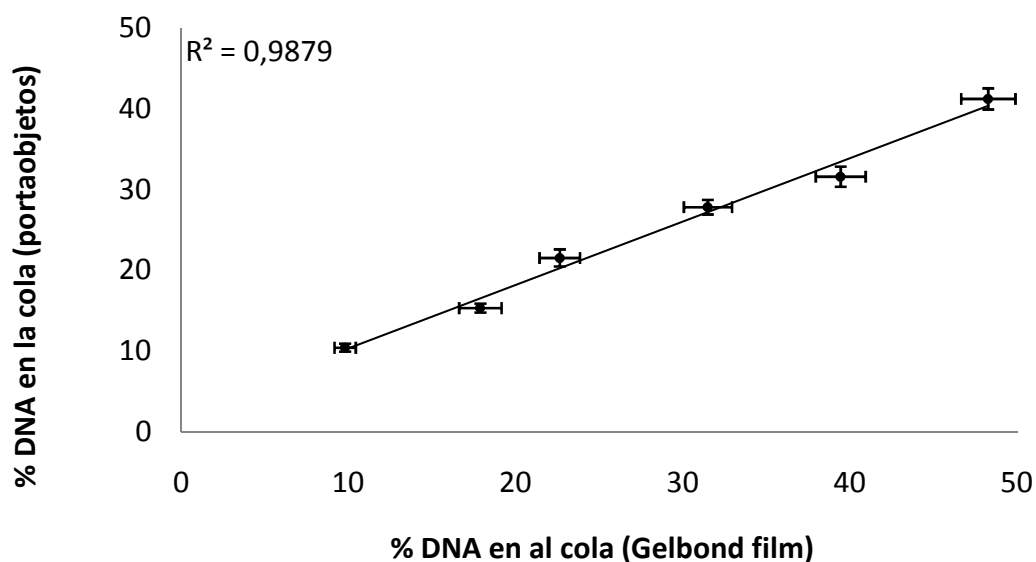


Figura. 26: Gráfico de correlación entre las medias de % de DNA en la cola obtenidas utilizando la metodología convencional y con el film Gelbond ($P < 0,01$).

1.2. Ensayos de validación de la utilización de enzimas

Para demostrar el correcto funcionamiento de las enzimas en nuestro laboratorio, se evaluó en linfocitos humanos el nivel de daño oxidativo inducido por su exposición al fotosensibilizador Ro 19-8022, a una concentración de $1 \mu\text{M}$ junto con luz visible. Se utilizó este compuesto debido a que es conocido que produce un único tipo de daño oxidativo, es decir, es capaz de oxidar la guanina y producir 8-oxoG. Las muestras fueron expuestas a luz visible a tres tiempos (90, 180 y 300 segundos, además de dos controles; uno sin fotosensibilizador Ro ni luz, y otro con el fotosensibilizador pero sin luz, para evaluar el efecto de éste por sí solo) con el fin de establecer un rango de concentración ascendente de 8-oxoG, luego de la irradiación con luz.

La **Figura 27** ilustra la media (\pm EE) de dos experimentos realizados independientemente, reflejando las relaciones dosis-respuesta de los linfocitos tratados. Las diferencias entre el daño basal (lisis) y oxidativo (tanto de purinas como de pirimidinas oxidadas) fueron estadísticamente significativas dentro de cada tratamiento (contraste no paramétrico de Wilcoxon; $P < 0,01$). Con respecto a las diferencias entre tratamientos, ambas enzimas respondieron en relación a la

concentración de 8-oxoG introducida con el fotosensibilizador más luz visible, no así entre controles (contraste Mann-Whitney; $P > 0,05$ entre control negativo y control Ro y $P \approx 0,05$ entre tratamiento y control negativo). Los claros incrementos de la respuesta al aumentar la dosis, tras la aplicación de FPG, indican que esta enzima funciona correctamente siendo capaz de detectar los incrementos de 8-oxoG inducidos por los tratamientos.

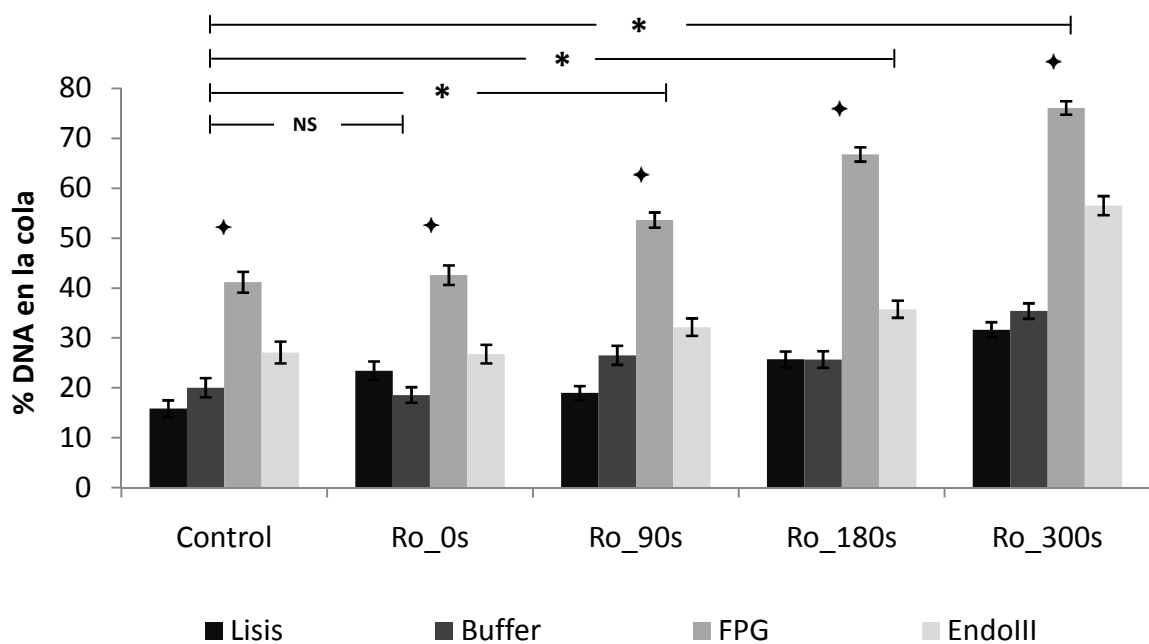


Figura 27: Daño oxidativo basal e inducido detectado con el ensayo del cometa utilizando las enzimas FPG y EndoIII. Diferencias significativas a nivel de 0,01 entre daño oxidativo basal e inducido \blacklozenge : dentro de cada tratamiento usando el test no paramétrico para muestras relacionadas Wilcoxon; *: entre los tratamientos usando el test no paramétrico para muestras independientes Mann-Whitney; NS: Diferencias no significativas de la respuesta de ambas enzimas entre el control y Ro sin irradiar.

La **Figura 28** muestra la relación entre el tiempo de irradiación con luz visible y la respuesta de las enzimas (Coeficiente de correlación de Spearman: 0,66 y 0,50 para FPG y EndoIII, respectivamente).

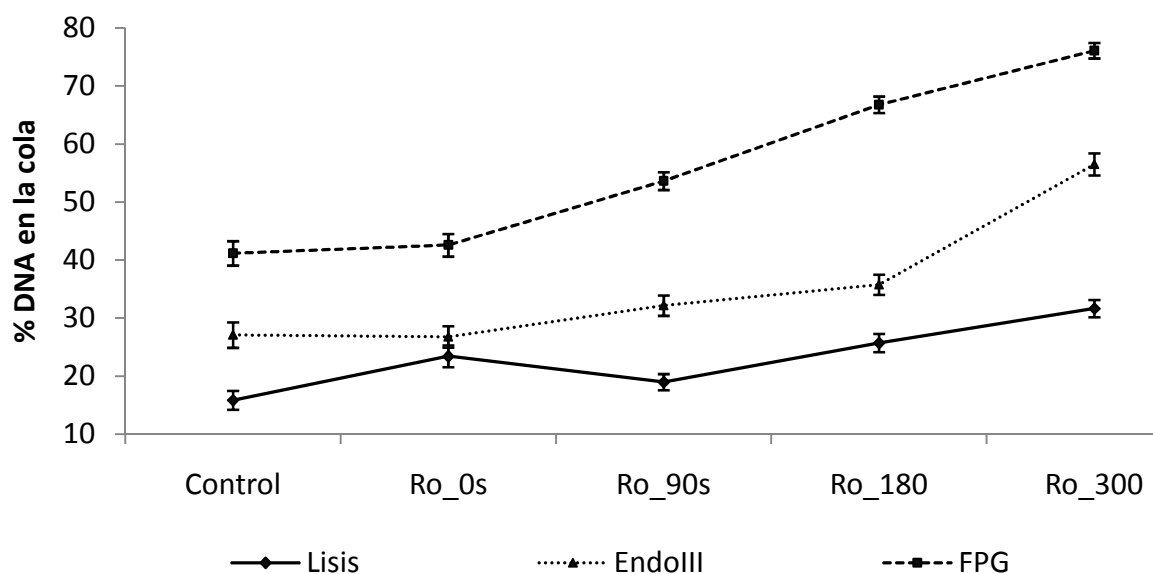


Figura 28: Experimento dosis-respuesta en linfocitos. Daño oxidativo basal e inducido detectado con el ensayo del cometa utilizando los enzimas de restricción FPG y EndoIII (coeficientes de correlación de Spearman: 0,66 y 0,50, respectivamente).

1.3. Ensayos de congelación

Otro de los objetivos fue obtener un protocolo de congelación y descongelación que minimizara los efectos genotóxicos. Para ello se evaluó el efecto del proceso de aislamiento sobre la viabilidad y el potencial efecto del proceso de congelación de los linfocitos sobre su nivel basal de daño genético total y oxidativo. El proceso de aislamiento no mostró influir significativamente en la viabilidad celular. De la misma manera, ni el proceso de aislamiento ni el de congelación/descongelación produjeron un incremento significativo del daño basal total con respecto a los controles frescos. En los niveles de purinas y pirimidinas oxidadas en linfocitos frescos y congelados también se observó un nivel similar de daño (diferencias no significativas entre las medias del % DNA en la cola $P > 0,05$; **Tabla VIII**).

Tabla VIII: Efecto de los procesos de aislamiento y criopreservación en los niveles de daño endógeno y oxidativo en linfocitos humanos de 4 voluntarios (valores medios \pm EE).

^{ns}: Diferencias no significativas (*t* de Student).

	Densidad (10 ⁶ células/mL)		Viabilidad (%)	% DNA en la cola		
	Inicial	Final		Daño basal ^{ns}	Purinas oxidadas ^{ns}	Pirimidinas oxidadas ^{ns}
Linfocitos frescos	1,302	-	-	13,78 \pm 1,31	11,89 \pm 1,43	6,66 \pm 1,75
Linfocitos congelados	1,302	0,934	71,74	13,19 \pm 1,28	13,32 \pm 2,71	7,90 \pm 2,26

2. Resultado de las aplicaciones del ensayo del cometa

2.1. Resultados de la construcción de la curva de calibración

La elaboración de una curva de calibración tiene tres finalidades, la primera es la de conocer los valores de daño basal en una población determinada; la segunda es conocer cómo responde una población estándar a la radiación ionizante (u otro genotóxico) para poder identificar individuos que responden de manera más sensible a la de la media de la población; por último, estos resultados nos permitirán hacer comparaciones con lo que ocurre en otros laboratorios y/o poblaciones. En nuestro caso, la curva aquí construida se realizó con un grupo de 9 voluntarias jóvenes con un promedio de edad de 26,1 años, y un rango de 22 a 28 años.

En la **Tabla IX** se muestran las medias del daño genético basal e inducido por la radiación γ . Se calculó también el daño neto introducido por la radiación, restando el daño basal (control sin irradiar) de los valores de daño producido en cada una de las dosis de irradiación; el daño neto nos ayuda a calcular posteriormente la frecuencia de roturas introducidas por la radiación.

Tabla IX: Valores promedio del % de DNA en la cola. Los datos muestran la media \pm EE de 100 células analizadas por individuo en el rango de 0 a 8 Gy y su respectivo índice de correlación lineal. Se muestra también el daño neto inducido por la radiación, con su respectivo coeficiente de correlación.
*: Diferencias significativas entre tratamientos y control (t-Student; $P < 0,001$).

Individuo	Dosis (Gy)						r
	0	1	2	4	6	8	
1	17,63 \pm 1,05	22,27 \pm 1,26	24,03 \pm 1,12	35,43 \pm 1,07	49,78 \pm 1,28	58,07 \pm 1,01	0,987
2	14,58 \pm 1,13	12,52 \pm 0,87	15,83 \pm 0,77	32,56 \pm 0,96	41,20 \pm 1,23	55,13 \pm 1,01	0,960
3	14,35 \pm 1,11	21,39 \pm 1,17	27,90 \pm 1,23	41,45 \pm 1,62	50,02 \pm 1,11	58,45 \pm 0,91	0,987
4	11,92 \pm 0,86	21,13 \pm 1,12	30,52 \pm 1,11	35,66 \pm 1,13	50,76 \pm 0,97	56,50 \pm 1,24	0,968
5	22,15 \pm 1,09	30,20 \pm 1,47	29,73 \pm 1,42	42,23 \pm 1,53	51,41 \pm 1,32	64,52 \pm 1,02	0,984
6	20,48 \pm 1,20	25,10 \pm 1,22	24,37 \pm 1,17	35,08 \pm 1,24	41,49 \pm 1,24	52,92 \pm 1,20	0,975
7	17,58 \pm 1,27	20,42 \pm 1,11	21,48 \pm 1,02	35,31 \pm 1,15	50,72 \pm 0,91	53,73 \pm 0,84	0,960
8	17,26 \pm 1,00	15,98 \pm 1,23	18,90 \pm 0,84	32,70 \pm 0,97	48,18 \pm 0,95	60,10 \pm 0,83	0,962
9	19,88 \pm 1,12	23,43 \pm 0,98	26,36 \pm 0,94	41,99 \pm 0,73	53,02 \pm 0,73	63,10 \pm 0,66	0,990
Media*	17,31	21,38	24,35	36,93	48,51	58,06	0,994
Neto*	0,00	4,07	7,04	19,62	31,20	40,75	0,994

El parámetro empleado para cuantificar dicho daño fue el porcentaje de DNA en la cola, ampliamente usado por distintos autores por su fácil interpretación. Es interesante destacar que la respuesta en la mayoría de las muestras individuales sigue un patrón dosis-respuesta similar. Los valores obtenidos muestran un incremento significativo del daño genético que se relaciona directamente con la dosis utilizada. Se indican también los valores del coeficiente de correlación para cada donante. La **Figura 29** muestra las curvas obtenidas para cada uno de los individuos analizados, donde se indica el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática correspondiente.

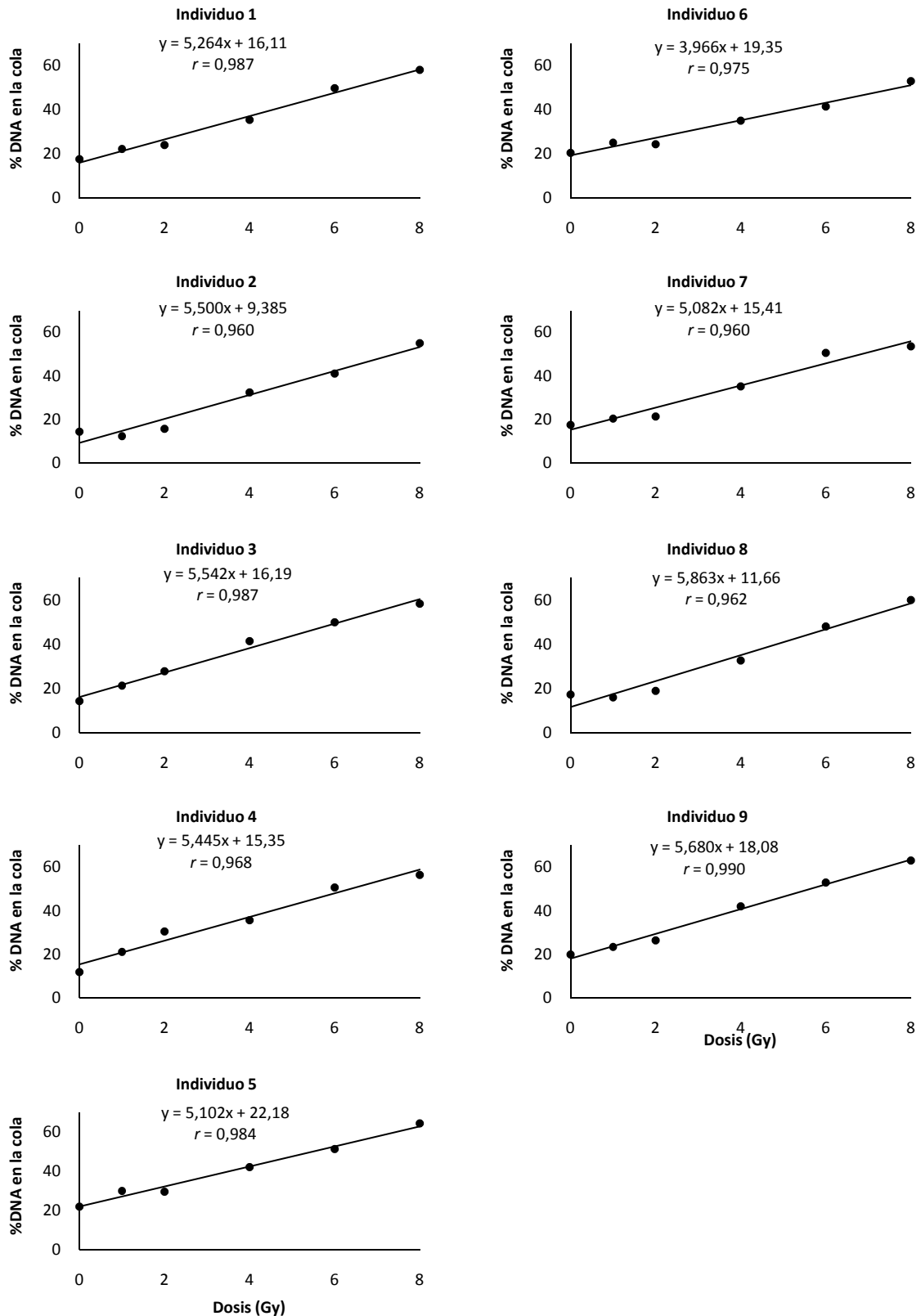


Figura 29: Curvas dosis-respuesta inducida por radiación ionizante (radiación γ) en el rango de 0 a 8 Gy para cada donante. El daño genético se indica mediante el parámetro % DNA en la cola. Se indica también el ajuste de la ecuación matemática y el coeficiente de correlación de Pearson en cada caso.

En la **Figura 30** se observa que la relación dosis-respuesta entre la radiación *gamma* y el daño en el DNA, expresado como % DNA en la cola, depende linealmente de la dosis de radiación aplicada. La curva general se construyó con los valores de % DNA neto, que se obtuvieron sustrayendo el nivel basal (dosis 0 Gy) a los valores de cada dosis de todos los donantes. Como cabe esperar, el coeficiente de correlación obtenido tiende a uno, lo que indica un muy buen ajuste.

De las numerosas investigaciones realizadas utilizando el ensayo del cometa, un alto porcentaje se ha dedicado a la calibración de esta técnica basada en que la eficiencia de la radiación *gamma* para inducir roturas en el DNA es bastante conocida.

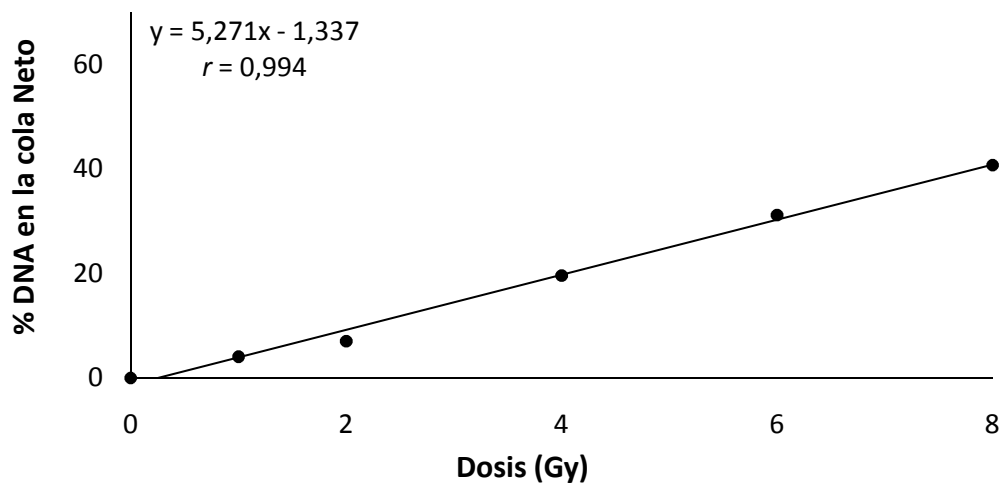


Figura 30: Curva general dosis-respuesta. Los valores son expresados en % DNA en la cola neto (el nivel basal corresponde a la dosis = 0, y fue sustraído a cada uno de los valores de irradiación). Se indica el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática.

La curva de calibración construida, utilizando muestras de sangre de 9 donantes sanos e irradiadas con rayos gamma, será una herramienta que nos permita calcular la frecuencia de roturas producidas por esta radiación y podrá extrapolarse a otros agentes genotóxicos detectables con este ensayo y que producen este tipo de efecto.

En base a nuestros resultados, la curva de frecuencia de roturas fue construida sustituyendo la dosis de radiación por la frecuencia de roturas, basándonos en el supuesto de que 1 Gy induce aproximadamente 0,31 roturas/ 10^9 Da de DNA. Se calculó el incremento de la frecuencia de roturas por % DNA en la cola obteniendo los siguientes valores (ver **Tabla IV**):

- **Daño neto (% DNA en la cola) a 8 Gy:**

$$58,06 \% \text{ DNA en la cola} - 17,3 \% \text{ DNA en la cola} = 40,76 \% \text{ DNA en la cola}$$

- **Frecuencia neta de roturas a 8 Gy:**

$$8 \text{ Gy} * 0,31 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA/Gy} = 2,48 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA}$$

- **Ecuación para el cálculo de la frecuencia de roturas / % DNA en la cola**

$$(2,48 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA}) / (40,76 \% \text{ DNA en la cola}) = 0,061 \text{ roturas}/10^9 \text{ Da de DNA}/\%$$

Realizados estos cálculos, podemos estimar la frecuencia de roturas para cada dosis. Así, la **Figura 31** muestra la gráfica de la frecuencia neta de roturas en el DNA por cada 10^9 Da de DNA, generada por la radiación *gamma* utilizada.

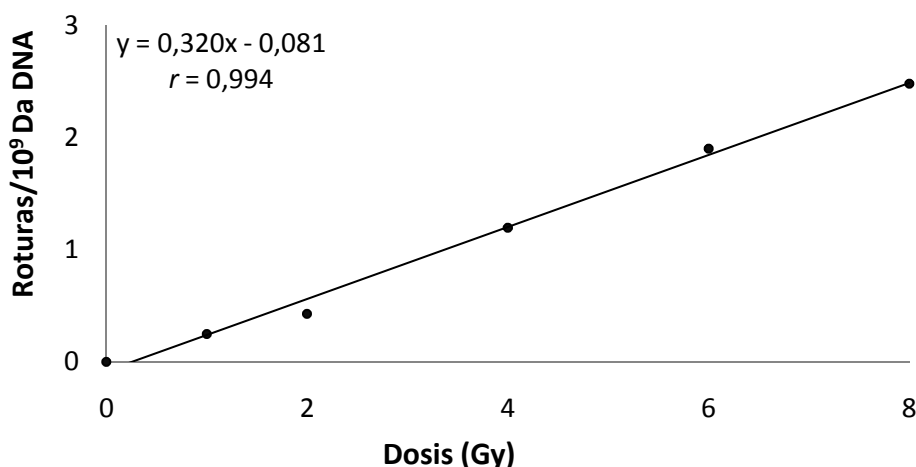


Figura 31: Curva general de la frecuencia neta de roturas por cada 10^9 Da de DNA según dosis. Se indica el coeficiente de correlación y el ajuste de la ecuación matemática.

Posteriormente se calculó el nivel basal de daño en el DNA de linfocitos de los 9 donantes, en términos de frecuencia de roturas del DNA, utilizando la curva de calibración obtenida. La distribución del nivel basal de roturas calculado en el grupo de donantes se muestra en la **Figura 32**, donde la media \pm EE fue de $1,06 \pm 0,07$ roturas/ 10^9 Da de DNA y la mediana fue de 1,07 roturas/ 10^9 Da de DNA (rango 0,73 – 1,35; primer cuartil = 0,89; tercer cuartil = 1,21).

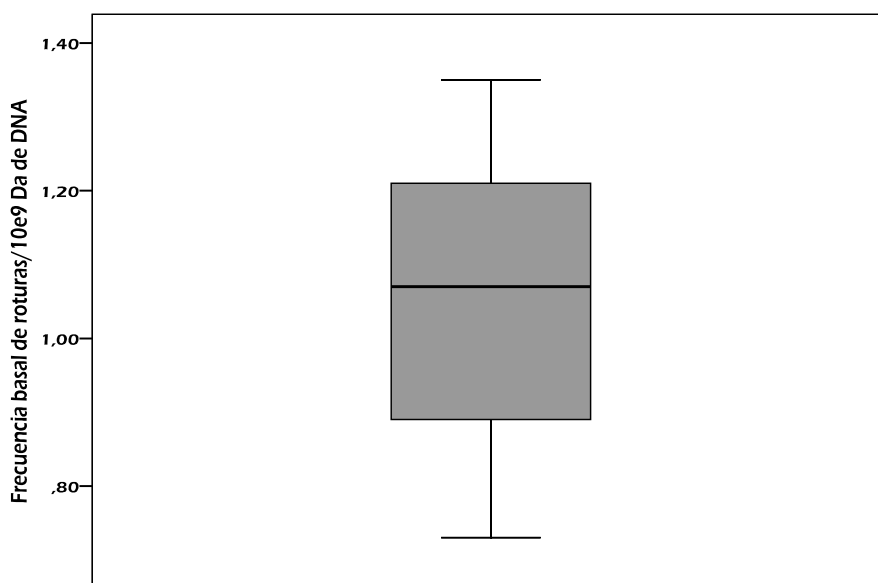


Figura 32: Nivel basal de daño en el DNA en linfocitos de la población en estudio. Gráfico de la distribución de la frecuencia de roturas/ 10^9 Da de DNA obtenida de la curva de calibración.

Finalmente, para corroborar la bondad de la curva de calibración elaborada, se llevó a cabo un estudio de validación de la misma. Este consistió en la extracción de dos muestras de sangre de dos de los voluntarios (A y B) e irradiar cada una de ellas a dos dosis desconocidas (dentro del rango anteriormente evaluado). La **Tabla X** muestra los resultados obtenidos donde, a simple vista, se observa que los valores de las dos dosis desconocidas en el momento de la aplicación y en la visualización de los efectos se corresponden con los valores de las dosis de 2 y 6 Gy en la curva general; lo que posteriormente confirmó el personal de la Unidad Técnica de Protección Radiológica.

Tabla X: Resultados de validación. Valores indicativos de las dos dosis validadas con referencia a los obtenidos en la curva de calibración general.

	Individuo	Daño		Valores en la curva		Intervalo de confianza ($\alpha=0,05$)	
		2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy	2 Gy	6 Gy
% DNA en la cola	A	23,12±1,05	46,29±0,95	24,35±1,64	48,51±1,42	[21,13 – 27,57]	[45,72 – 51,3]
	B	28,56±1,22	50,60±1,05				

Para asegurar que las medias del daño de las dos muestras empleadas en la prueba de validación no son diferentes a los valores obtenidos en la curva, se aplicó una *t* de Student (**Figura 33**). La comparación de medias del individuo A con las de la curva no muestra diferencia significativa a 2 Gy; sin embargo, muestra una leve diferencia al comparar a 6 Gy. Cuando se compararon las medias del individuo B con las de la curva, se observó lo contrario. A 2 Gy hay diferencia significativa pero no a 6 Gy.

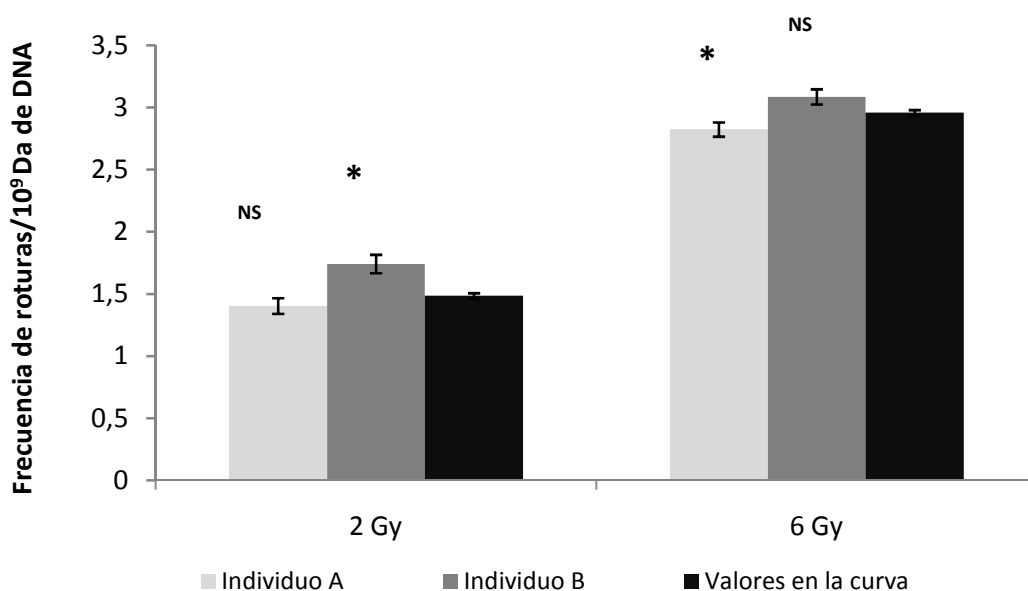


Figura 33: Resultados del estudio de validación. Gráfico de la frecuencia de roturas / 10^9 Da de DNA de los dos individuos y los valores en la curva de calibración. NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; *: diferencias significativas ($P<0,05$).

Aunque el análisis estadístico arrojó diferencias ligeramente significativas entre la dosis baja del individuo B y la alta del individuo A, con respecto a los valores en la curva, en la **Tabla X** se puede apreciar que los valores de ambas dosis para ambos individuos están incluidos en el intervalo de confianza de la curva considerando los errores.

2.2. Resultados del estudio de biomonitorización en cohortes madre-hijo

La integridad de nuestro DNA es fundamental para la salud y el buen funcionamiento de nuestro organismo. Sabemos que esta integridad depende de la susceptibilidad del DNA a ser dañado por un sinnúmero de agentes físicos y químicos y por procesos endógenos y exógenos.

Como ya hemos mencionado, una de las aplicaciones en la que el uso del ensayo del cometa ha aumentado enormemente en los últimos 5 años es en la biomonitorización de poblaciones humanas enfocada, sobre todo, a evaluar el daño oxidativo.

En este trabajo de Tesis se evaluó el daño basal y oxidativo de dos grupos de madres e hijos con el objeto de determinar la correlación existente y establecer también el daño basal de cada una de las poblaciones.

En la **Tabla XI** se presenta la estadística descriptiva de las madres de la población I (medias \pm EE y porcentajes para variables continuas y categóricas, respectivamente), que está formada por 31 madres reclutadas entre el 8 de marzo y el 26 de julio de 2007, en el Hospital Parc Taulí de Sabadell. Las madres presentaron una media de edad de $30,60 \pm 0,65$ años, siendo la mayoría de ellas europeas (74,2%, la mayoría españolas).

En la **Tabla XII** se aprecia la estadística descriptiva de la población II (medias \pm EE y porcentajes para variables continuas y categóricas, respectivamente), que está formada por 40 madres reclutadas entre el 22 de octubre de 2008 y el 16 de enero de 2009, en el Hospital del Mar de Barcelona. Este grupo de madres tuvo una media de edad de $29,43 \pm 1,08$ años y resultó ser una población mixta, predominantemente europea (37,5%, la mayoría españolas), seguida por

latinoamericanas (27,5%) y con una presencia significativa de población asiática (22,5%).

Tabla XI: Características de las madres de la población I. Edad, algunas características nutricionales y hábitos de consumo durante el periodo de gestación. Datos expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda. FA: fumadora activa; FP: fumadora pasiva; NF: no fumadora; gr/día: gramos de alimento diario; comp/día: comprimidos diarios de vitaminas (A y/o E y/o C y/o multivitaminas y/o ácido fólico); s/i: Sin información. *: Los valores *P* fueron determinados mediante *t* – Student para diferencia entre medias de las variables continuas y mediante X^2 para variables categóricas.

Madres población I			
Variable		<i>n</i>	Media\pmEE o %
Edad		31	30,60 \pm 0,65
Etnia	Árabe	0	-
	Asiática	0	-
	Europea	23	74,2
	Latinoamericanas	6	19,4
	s/i	2	6,5
Tabaco	FA	4	12,9
	FP	16	51,6
	NF	10	32,3
	s/i	1	3,2
Insecticidas	Si	18	58,1
	No	12	38,7
	s/i	1	3,2
Enfermedad	Si	18	58,1
	No	13	13
	s/i	0	-
Medicación	Si	11	35,5
	No	19	61,3
	s/i	1	3,2
Suplementos vitamínicos	No	11	35,5
	1 comp/día	18	58,1
	2 o más com/día	2	6,5
Actividad física	s/i	0	-
	Sedentaria	2	6,5
	Poco activa	16	51,6
	Moderada	7	22,6
	Bastante	6	19,4
	Muy activa	0	-
	s/i	0	-
Carnes rojas (g/día)		31	11,06 \pm 1,65
Pescado (g/día)		31	12,48 \pm 2,14
Frutas (g/día)		31	38,57 \pm 8,31
Verduras (g/día)		31	23,66 \pm 2,03
Alcohol (g etanol/día)		9	11,51 \pm 3,61
Café (g/día)		14	173,59 \pm 42,72

Tabla XII: Características de las madres de la población II. Edad, algunas características nutricionales y hábitos de consumo durante el periodo de gestación. Datos expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda. FA: fumadora activa; FP: fumadora pasiva; NF: no fumadora; gr/día: gramos de alimento diario; comp/día: comprimidos diarios de vitaminas (A y/o E y/o C y/o multivitaminas y/o ácido fólico); s/i: Sin información. *: Los valores *P* fueron determinados mediante *t* – Student para diferencia entre medias de las variables continuas y mediante X^2 para variables categóricas.

Madres población II			
Variable		<i>n</i>	Media\pmEE o %
Edad		40	29,43 \pm 1,08
Etnia	Árabe	4	10
	Asiática	10	25,0
	Europea	15	37,5
	Latinoamericanas	11	27,5
	s/i	0	-
Tabaco	FA	3	7,5
	FP	17	42,5
	NF	20	40
	s/i	0	-
Insecticidas	Si	16	40
	No	24	60
	s/i	0	-
Enfermedad	Si	18	45
	No	20	50,0
	s/i	2	5,0
Medicación	Si	13	32,5
	No	27	67,5
	s/i	0	-
Suplementos vitamínicos	No	29	72,5
	1 comp/día	5	12,5
	2 o más com/día	3	7,5
	s/i	3	7,5
Actividad física	Sedentaria	6	15
	Poco activa	10	25
	Moderada	15	37,5
	Bastante	1	2,5
	Muy activa	6	15
	s/i	2	5
Carnes rojas (g/día)		34	14,15 \pm 2,91
Pescado (g/día)		35	14,49 \pm 2,53
Frutas (g/día)		39	41,42 \pm 6,88
Verduras (g/día)		39	29,05 \pm 4,10
Alcohol (g etanol/día)		8	26,46 \pm 16,67
Café (g/día)		12	312,86 \pm 52,76

La prueba paramétrica X^2 revela que las poblaciones de madres difieren en lo siguiente: la etnia de las madres de la población II es más heterogénea ya que este grupo lo conforman mujeres latinoamericanas, asiáticas y africanas, a diferencia de la población I en la que las mujeres son predominantemente españolas, con una menor incidencia de madres latinoamericanas ($P < 0,001$). La cantidad de suplementos vitamínicos consumidos durante el embarazo fue significativamente mayor en las madres de la población I ($P < 0,001$). La actividad física realizada por las madres durante el embarazo mostró ser significativamente mayor en la población II ya que más del 50% de éstas se encuentran en las categorías de moderada a muy activa; en cambio, en la población I más del 50% de las mujeres se encuentra en la categoría de sedentarias o poco activas ($P < 0,05$).

Al aplicar el test de la t de Student para variables continuas, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de café, que fue mayor en la población II ($P < 0,05$).

Con respecto a la población de neonatos, y con la ayuda de profesionales epidemiólogos involucrados en el estudio, se ha podido obtener información básica de los recién nacidos. La **Tabla XIII** muestra las características cuantitativas de los niños de la población I (talla, peso y tiempo de gestación al nacer) y cualitativas como el género y el tipo de parto, observándose que la misma proporción en cuanto al género, y que la mayoría de los nació por parto normal. En cuanto a las características cuantitativas, el valor de los errores típicos indica que la población es homogénea en cuanto a estos parámetros. En la **Tabla XIV** se observa que los valores de las características para los niños de la población II no difieren de la población I, lo que fue corroborado con los respectivos tests estadísticos (t de Student para variables numéricas y X^2 para variables categóricas; $P > 0,05$).

El ensayo del cometa realizado en condiciones alcalinas detecta roturas de cadena y sitios álcali-lábiles, lo que en nuestro estudio denominamos daño basal (SB). Por otro lado, para detectar el daño oxidativo, se incubaron las muestras con las endonucleasas EndoIII y FPG que reconocen pirimidinas oxidadas y 8-oxoguanina, así como purinas oxidadas, respectivamente. El análisis de cada

enzima se realizó por separado, calculándose el daño neto correspondiente a purinas y pirimidinas oxidadas.

Tabla. XIII: Características de los hijos de la población I. Datos del parto y mediciones típicas del neonato. Los resultados son expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda. Sem: semanas; s/i: Sin información. Los valores P fueron determinados mediante la t de Student para diferencias entre medias de las variables continuas y mediante X^2 para variables categóricas.

Variable		n	Media \pm EE o %
Género	Niño	16	51,6
	Niña	15	48,4
Tipo de parto	Eutócico	21	67,7
	Cesárea	6	19,4
	Instrumental	3	9,7
	s/i ¹	1	3,2
Talla (cm)			50,65 \pm 0,37
Peso (g)		31	3346 \pm 84,47
Tiempo de gestación (días)			279,61 \pm 2,28

Tabla. XIV: Características de los hijos de la población II. Datos del parto y mediciones típicas del neonato. Los resultados son expresados mediante medias (\pm EE) o %, según corresponda. Sem: semanas; s/i: Sin información. Los valores P fueron determinados mediante la t de Student para diferencias entre medias de las variables continuas y mediante X^2 para variables categóricas.

Variable		n	Media \pm EE o %
Género	Niño	26	51,6
	Niña	14	48,4
Tipo de parto	Eutócico	29	67,7
	Cesárea	5	19,4
	Instrumental	6	9,7
	s/i ¹	-	3,2
Talla (cm)		25	50,42 \pm 0,28
Peso (g)		40	3429 \pm 55,17
Tiempo de gestación (días)		40	274,42 \pm 1,63

En la **Tabla XV** se muestran los resultados obtenidos con el ensayo del cometa, empleando como medida de daño la media del porcentaje de DNA en la cola (% DNA en la cola) obtenido en cada réplica de cada uno de los individuos. Hay que recordar que los valores de la población I se obtuvieron utilizando el protocolo con portaobjetos de vidrio mientras que los datos de la población II se obtuvieron utilizando como soporte los films Gelbond.

Tabla. XV: Valores medios de %DNA en la cola de las dos poblaciones independientemente utilizando el ensayo del cometa. Valores medios \pm EE del parámetro % de DNA en la cola medido con el ensayo del cometa versión alcalina. Se contabilizaron 400 células por individuo (100 para cada tratamiento).

	% DNA en la cola (Media \pm EE)			
	Población I (N=31)		Población II (N=40)	
	Madres	Hijos	Madres	Hijos
Lisis	14,22 \pm 1,00	16,15 \pm 2,01	19,11 \pm 0,56	16,55 \pm 0,47
Buffer	16,45 \pm 1,53	14,95 \pm 1,51	19,78 \pm 0,61	18,98 \pm 0,58
FPG	28,54 \pm 2,09	24,04 \pm 2,23	39,56 \pm 1,67	38,99 \pm 1,83
EndoIII	20,61 \pm 1,44	18,49 \pm 1,66	30,22 \pm 1,50	28,03 \pm 0,91
Neto FPG	12,10 \pm 1,63	9,09 \pm 1,27	19,78 \pm 1,50	20,24 \pm 1,84
Neto EndoIII	4,16 \pm 0,95	3,54 \pm 0,60	10,43 \pm 0,87	9,05 \pm 0,94

Antes de comentar o analizar los datos de esta tabla, es pertinente hacer algunas aclaraciones. Una de las grandes ventajas de la utilización del Gelbond, es la capacidad de analizar un mayor número de muestras en el mismo ensayo, permitiendo incluir controles internos; así, y considerando la gran variabilidad del ensayo de cometa, se ha calculado para la población II un factor de corrección que nos permite anular dicha variación y así poder establecer una posible asociación del daño genético entre las madres y sus hijos por su propio fenotipo y no por las características propias del experimento.

En el caso de la población I, la inclusión de controles externos no fue posible debido a la limitada capacidad de los tanques de electroforesis para contener los portaobjetos necesarios cuando se evalúa daño oxidativo (4 preparaciones x 4 individuos). Si durante un ensayo de evaluación de daño oxidativo utilizando portaobjetos como soporte de la muestra, se incluyesen los dos controles internos (0 Gy y 5 Gy) que se pueden incluir cuando el soporte es el Gelbond, sólo podríamos evaluar 1 pareja (8 portaobjetos) por cada electroforesis, en contraste con las 7 evaluadas con la nueva versión, incluso con los 2 controles externos, lo que incrementaría notablemente el tiempo necesario para hacer un estudio de biomonitorización, aún más en aquellos con grandes poblaciones.

Es, fundamentalmente, por esta razón que hemos decidido hacer el análisis de las poblaciones como dos poblaciones distintas; además, esta decisión se vio fortalecida al hacer la comparación estadística, ya que mostraron ser diferentes en aspectos como la etnia, el consumo de suplementos vitamínicos, la actividad física y el consumo de café.

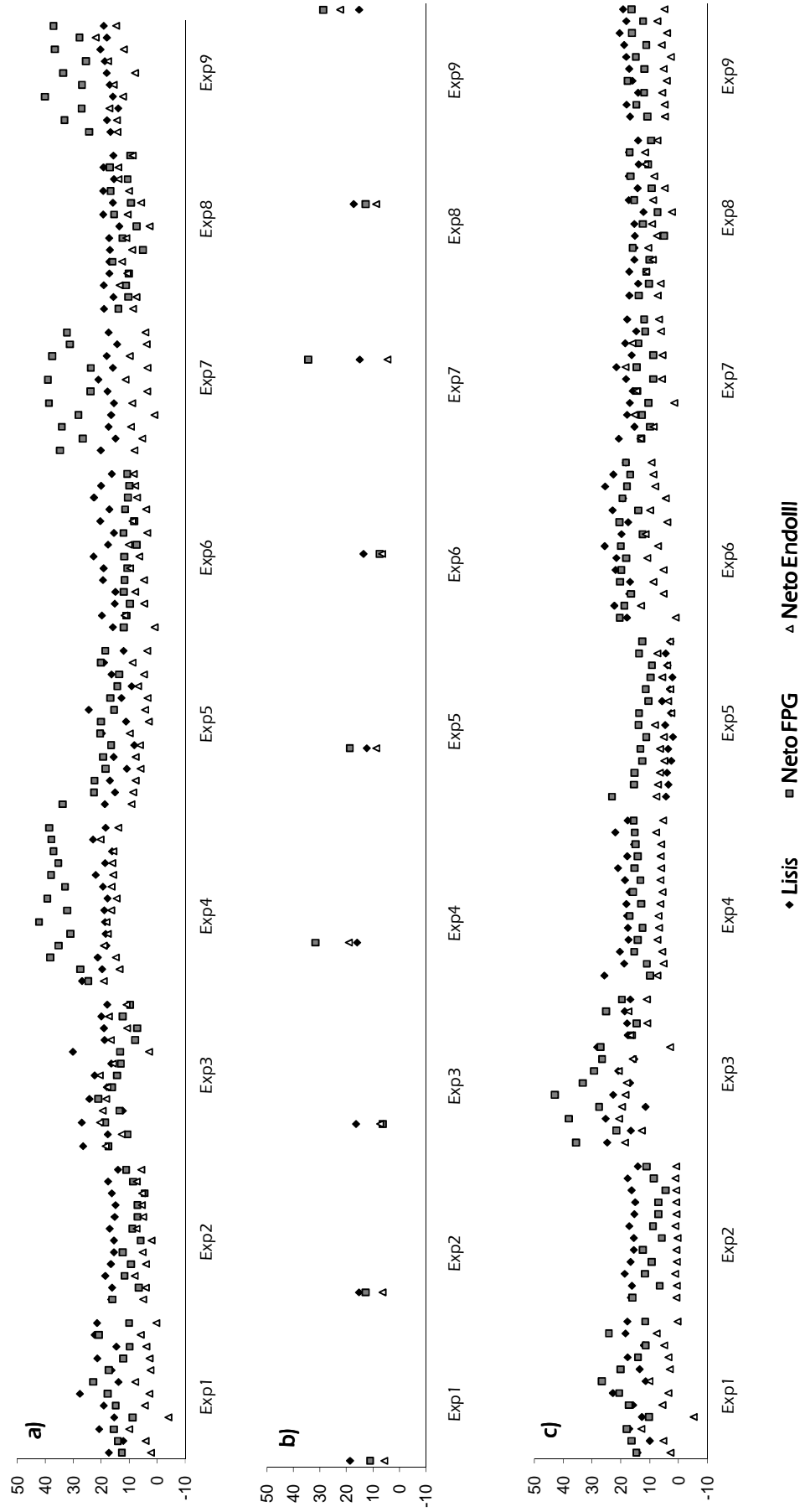
Para comparar el daño genético, se ha tenido en cuenta el daño basal (lisis) y el daño oxidativo (neto FPG y neto EndoIII) de cada uno de los individuos. Así, el factor de corrección de la población II fue calculado sólo para estos parámetros de la siguiente manera:

1. Se calculó la mediana de las medias de lisis, del daño neto FPG y del daño neto EndoIII de los controles negativos (0 Gy) de todos los experimentos que fueron necesarios para evaluar las 40 parejas de la población II.
2. Para cada experimento, se calculó el factor de corrección de cada tratamiento (lisis, FPG y EndoIII) de la siguiente manera:
 - Se dividió el valor de lisis del control negativo de cada experimento por la mediana general de lisis calculada en el paso 1 → **Factor de corrección para lisis.**

- Se dividió el valor de Neto FPG del control negativo de cada experimento por la mediana general de Neto FPG calculada en el paso 1 → **Factor de corrección para Neto FPG.**
 - Se dividió el valor de Neto EndoIII del control negativo de cada experimento por la mediana general de Neto EndoIII calculada en el paso 1 → **Factor de corrección para Neto EndoIII.**
3. Para calcular los valores experimentales corregidos para cada individuo, se procedió de la siguiente manera:
- El valor experimental de lisis de cada individuo se multiplicó por el factor de corrección para lisis, calculado en el paso 2, correspondiente a cada experimento.
 - El valor experimental de Neto FPG de cada individuo se multiplicó por el factor de corrección para Neto FPG, calculado en el paso 2, correspondiente a cada experimento.
 - El valor experimental de Neto EndoIII de cada individuo se multiplicó por el factor de corrección Neto EndoIII, calculado en el paso 2, correspondiente a cada experimento.

En los gráficos de la **Figuras 34** se muestra la dispersión de los datos por experimento, antes **(a)** y después **(c)** de ser aplicado el factor de corrección, observándose que, después de la corrección, los datos tienden a comportarse de manera más homogénea entre experimentos. El gráfico **b** de la **Figura 34** muestra los controles negativos externos (0 Gy) donde se puede observar que cuando estos se dispersan, también lo hacen los valores de los individuos del experimento correspondiente, lo que demuestra que la variabilidad de cada ensayo viene dado por las condiciones del mismo, y no por las características propias de cada individuo.

Figura 34: a) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) de las madres y los hijos de la población II evaluados utilizando Gelbond film, antes de ser corregidos. b) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) del control negativo externo (0 Gy) incluido en cada uno de los experimentos. c) Gráfico de los valores medios de daño basal (lisis) y daño oxidativo (FPG y EndoIII) de las madres y los hijos de la población II, evaluadas utilizando Gelbond film, después de ser corregidos.



En la **Tabla XVI** se expresan los valores medios de daño basal y daño oxidativo neto, en términos de % DNA en la cola, de las madres e hijos de ambas poblaciones. Además de verificar la normalidad de los datos, se ha realizado una comparación de medias entre muestras independientes utilizando la *t* de Student, para averiguar si las madres de ambas poblaciones poseen el mismo nivel de daño, tanto basal como oxidativo. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en cuanto al daño basal de las poblaciones de madres; sin embargo, cuando se evalúa el daño oxidativo, éste es significativamente mayor en la población II. El mismo comportamiento fue observado al comparar las poblaciones de niños.

Tabla. XVI: Valores de daño basal y oxidativo de madres y de hijos de ambas poblaciones utilizando la versión alcalina del ensayo del cometa y expresado en % DNA en la cola. La población II ha sido corregida. ^{NS}: diferencias no significativas entre el daño basal de las madres y entre los hijos de ambas poblaciones (prueba *t*, $P > 0,05$). *: Diferencias significativas del daño oxidativo entre las madres de ambas poblaciones y entre los hijos de ambas poblaciones (prueba *t*, $P < 0,05$).

	% DNA en la cola (Media±EE)					
	Madres I (N=31)	Madres II (N=40)	<i>P</i>	Hijos I (N=31)	Hijos II (N=40)	<i>P</i>
Daño basal (DB) ^{NS}	14,22±1,00	16,08±1,02	0,26	16,15±2,01	14,69±0,99	0,45
Daño oxidativo (DO FPG)*	12,10±1,63	16,59±0,96	0,024	9,09±1,27	13,58±0,78	0,004
Daño oxidativo (DO EndoIII)*	4,16±0,95	6,95±0,81	0,036	3,54±0,60	5,74±0,72	0,027

La **Tabla XVII** muestra el análisis de la diferencia de medias dentro de cada población (prueba *t* de Student para muestras relacionadas), para verificar la igualdad del daño de las madres con respecto a sus hijos. Los resultados muestran que tanto el daño basal como el oxidativo son iguales entre las madres de la población I y sus hijos. En la población II, los resultados son opuestos y la diferencia que se observa entre el daño basal y el daño oxidativo FPG en las madres es significativamente mayor que el basal y oxidativo FPG en sus hijos, respectivamente. No sucede lo mismo con el daño oxidativo detectado con la

enzima EndoIII donde, a pesar que el de las madres es mayor que el de sus hijos, la diferencia no es estadísticamente significativa.

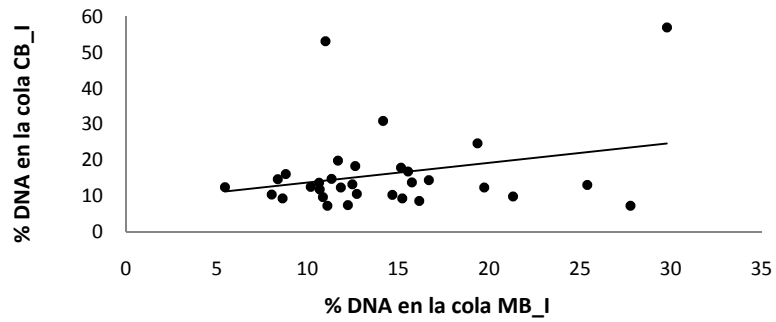
Tabla XVII: Valores de daño basal y oxidativo de madres y de sus hijos de ambas poblaciones. ^{NS}: Diferencias no significativas entre el daño de las madres y sus respectivos (prueba *t*; $P > 0,05$). *: Diferencias significativas entre las madres y sus respectivos hijos (prueba *t*; $P < 0,05$). **: Diferencias altamente significativas entre las madres y sus respectivos hijos (prueba *t*; $P < 0,01$).

	%DNA en la cola (Media±EE)					
	Madres I (N=31)	Hijos I (N=31)	<i>P</i>	Madres II (N=40)	Hijos II (N=40)	<i>P</i>
Daño basal (SB)	14,22±1,00	16,15±2,01	0,36	16,08±1,02	14,69±0,99	0,02
Daño oxidativo (OX FPG)	12,10±1,63	9,09±1,27	0,11	16,59±0,96	13,58±0,78	<0,001
Daño oxidativo (OX EndoIII)	4,16±0,95	3,54±0,60	0,48	6,95±0,81	5,74±0,72	0,18

Con la intención de establecer y visualizar la relación entre el daño en madres e hijos, los gráficos de la **Figura 35** representan los valores del % DNA en la cola, determinándose el coeficiente de correlación de Pearson, que revela que entre las madres y los hijos de la población I, no existe relación ni en el daño basal ni en el daño oxidativo; no obstante, la población II muestra una fuerte relación entre el daño de las madres con respecto a sus hijos, siendo ésta estadísticamente significativa.

La **Figura 36a** muestra que en la población I la correlación entre el daño oxidativo de las madres y el de sus hijos, detectado con la enzima FPG, es de un 21% pero no es estadísticamente significativa. Por el contrario, la **Figura 36b** muestra que el daño oxidativo de las madres de la población II, detectado con la misma enzima, presenta una correlación de un 67% con el de sus hijos, siendo estadísticamente significativa al nivel de 0,01.

a)



b)

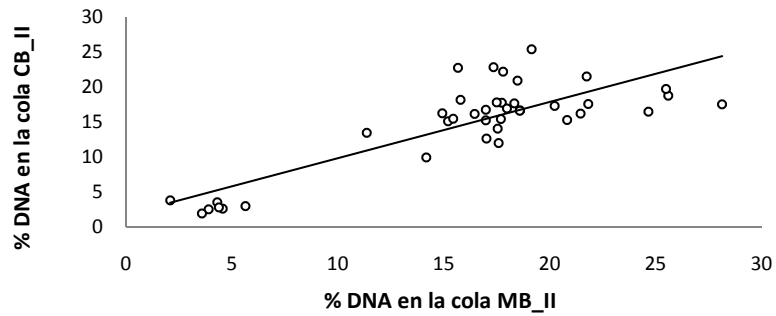
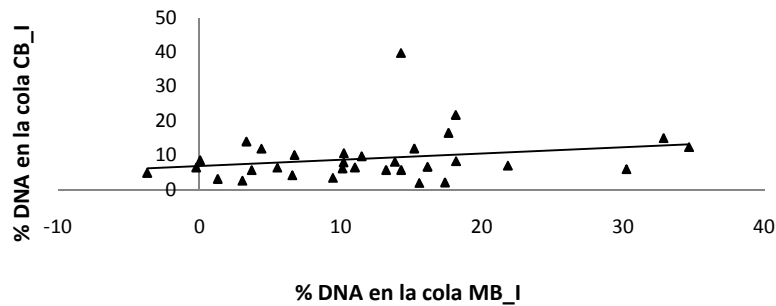


Figura 35: Daño basal de madres vs. hijos. **a)** Población I (r de Pearson=0,260; $P > 0,05$) y; **b)** Población II (r de Pearson=0,828; $P < 0,01$).

a)



b)

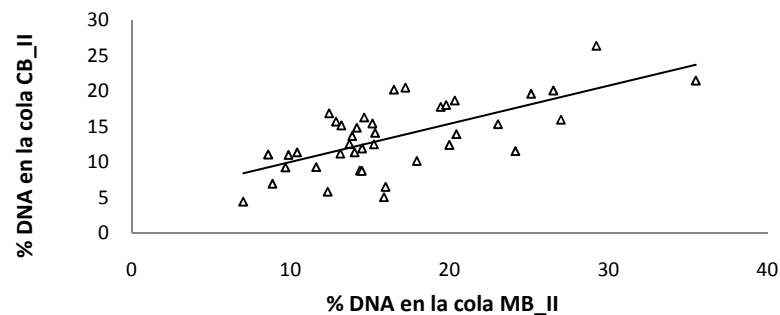
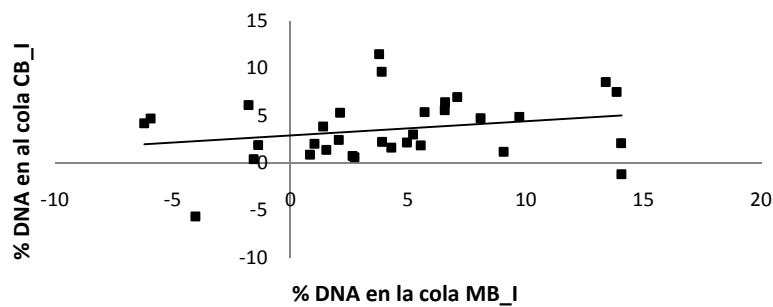


Figura 36: Daño oxidativo neto de madres vs. hijos detectado con la enzima FPG. **a)** Población I (r de Pearson=0,210; $P > 0,05$) y; **b)** Población II (r de Pearson=0,665; $P < 0,01$).

Por último, la **Figura 37a** muestra que la relación entre el daño oxidativo de las madres y el de sus hijos, en la población I, detectado con la enzima EndoIII, es de un 24% pero no es estadísticamente significativa. Por el contrario, la **Figura 37b** muestra que el daño oxidativo de las madres de la población II, detectado con la misma enzima, presenta una correlación de un 31% con el de sus hijos y, además, es estadísticamente significativa al nivel de 0,05.

a)



b)

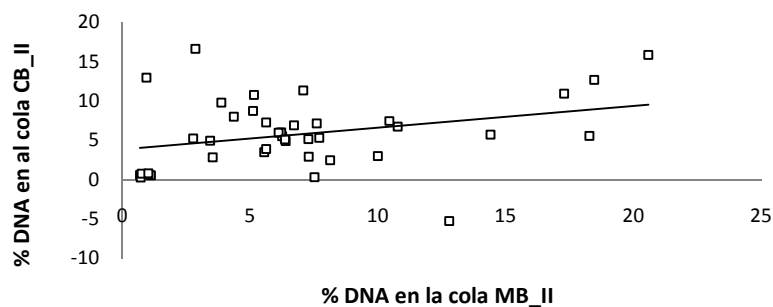


Figura 37: Daño oxidativo neto, detectado con la enzima EndoIII, de madres *vs.* hijos. **a)** Población I (r de Pearson=0,241; $P > 0,05$) y; **b)** Población II (r de Pearson=0,314; $P < 0,05$).

Finalmente, para poder dilucidar la influencia del estilo de vida y de los hábitos de consumo de las dos poblaciones, se han construido modelos mediante regresión lineal múltiple. Las **Tablas XVIII y XIX** muestran el resumen de los modelos que presentan un mejor ajusten para daño basal y oxidativo de las madres e hijos de cada una de las poblaciones, con los respectivos valores, criterios de significación y tolerancia.

Tabla XVIII: Modelos de regresión múltiple que mejor se ajustan al daño genético basal y oxidativo de madres e hijos de la población I, según sus características.

Variable dependiente	Resumen del modelo				Coeficientes				Tolerancia media	
	R ² corregido	Error típico	ANOVA F	P	Constante β_0	β_1	Variables independientes β_i	P_i		
Daño basal (Lisis)	0,159	5,366	3,453	0,048	18,042	0,000	Alcohol	0,256	0,149	0,952
							Verdura	-0,162	0,087	
	0,312	7,809	4,173	0,01	56,586	0,001	Etnia	-11,308	0,05	0,914
							Enfermedades	6,547	0,048	
	0,379	4,269	3,741	0,011	37,821	0,004	Alcohol	-0,51	0,074	
							Vitaminas	-5,245	0,052	
	0,435	9,274	5,998	0,002	-40,587	0,039	Edad	-0,672	0,008	0,732
							Etnia	-4,927	0,069	
	0,489	3,163	5,968	0,001	16,245	0,027	Tabaco	-3,440	0,023	
							Fruta	-0,0092	0,031	
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Verdura	0,148	0,080		
						Act. Física	3,080	0,008		
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Etnia	15,148	0,005	0,838	
						Tabaco	-10,107	0,005		
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Alcohol	0,894	0,012		
						Tipo parto	7,313	0,063		
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Tabaco	-3,584	0,005	0,643	
						Fruta	-0,068	0,012		
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Alcohol	0,282	0,000		
						Verdura	0,511	0,001		
0,244	3,014	4,121	0,016	6,777	0,005	Alcohol	0,207	0,011	0,919	
						Pescado	0,102	0,046		
							Tipo parto	-2,464	0,027	

El objetivo de realizar un análisis del estilo de vida de los voluntarios que participan en un estudio de biomonitorización, es poder dilucidar qué factores pueden estar influenciando los resultados. Así, mediante análisis estadísticos, podemos verificar cuales de las características tomadas en cuenta del estilo de vida de las madres causan un efecto positivo (contribuyen al aumento del daño) o un efecto negativo (contribuyen a una disminución) en los niveles de daño, tanto de ellas como de sus hijos.

El daño basal de las madres de la población I parece estar influenciado positiva y negativamente por el consumo de alcohol y verduras, respectivamente. Si bien se aprecia que esta influencia no es estadísticamente significativa, son las únicas variables que aumentaron la bondad del ajuste.

El daño oxidativo de las mismas se vio fuertemente influenciado por la etnia a la que pertenecen (latinoamericanas; blancas), aunque esta diferencia sólo es estadísticamente significativa para purinas oxidadas.

El daño oxidativo, en general, se vio modulado positivamente por el diagnóstico de enfermedades durante el embarazo, por el consumo de verduras y por la actividad física, y negativamente por el consumo de alcohol, vitaminas; frutas y por la edad. Además, fue necesario un mayor número de variables para explicar el daño oxidativo, en comparación con el daño basal, produciendo un mayor coeficiente de determinación.

Para lo hijos de la población I, el consumo de tabaco y de alcohol por parte de sus madres mostraron una fuerte influencia tanto en el daño basal como en el daño oxidativo de los mismos. También la etnia y el tipo de parto (instrumental, eutócico y cesárea) fueron variables asociadas a un aumento de los niveles de daño basal de los niños.

Tabla XIX: Modelos de regresión múltiple que mejor se ajustan al daño genético basal y oxidativo de madres e hijos de la población II, según sus características.

Variable dependiente	Resumen del modelo				Coeficientes				Tolerancia media
	R ² corregido	Error típico	ANOVA	Constante	Variables independientes				
			F	P	β_0	β_k	P_k		
Daño basal (Lisis)	0,200	5,739	4,997	0,013	18,870	Alcohol	-0,083	0,051	0,991
						Fruta	-0,059	0,014	
Purinas oxidadas (Neto FPG)	0,13	4,950	3,440	0,045	14,801	Edad	-0,344	0,029	0,967
						Vitaminas	2,318	0,103	
Pirimidinas oxidadas (Neto EndoIII)	0,244	5,615	4,441	0,011	12,769	Alcohol	-0,356	0,037	0,905
						Fruta	-0,496	0,004	
Daño basal (Lisis)	0,211	4,277	3,136	0,030	47,812	Género	0,298	0,080	0,824
						Edad	-0,307	0,035	
Purinas oxidadas (Neto FPG)	0,182	3,778	2,423	0,061	51,692	Verdura	0,078	0,020	0,880
						Género	4,340	0,022	
Pirimidinas oxidadas (Neto EndoIII)	0,182	3,778	2,423	0,061	51,692	Días gestación	-0,119	0,124	0,880
						Edad	-0,336	0,013	
						Etnia	-1,363	0,105	
						Enfermedades	-2,537	0,086	
						Género	3,294	0,051	
						Días gestación	-0,117	0,078	

MB II

CB II

Población II

Los resultados de las madres de la población II están influenciados por muchas menos variables que las de la población I, siendo además diferentes, no mostrando los hábitos de consumo ninguna influencia sobre el nivel de purinas oxidadas.

El nivel de daño basal en esta población, y considerando las variables de las que se dispone, se vio negativamente modulado por el consumo de alcohol y verduras; mientras que el nivel de pirimidinas oxidadas sólo se vio influenciado negativamente por la variable edad, si bien el consumo de vitaminas durante el embarazo parece tener un efecto positivo, no alcanza a ser significativo.

Finalmente, en el daño basal de los hijos de la población II, al igual que en la población I, vuelve a estar incidiendo significativamente el consumo de alcohol de sus madres. El género de los niños también parecer ser una variable de bastante influencia en los niveles de daño, sobre todo en el daño oxidativo donde aparecer incidir de manera significativa; sin embargo, los análisis de diferencia de medias por género en ambas poblaciones no mostraron diferencias significativas.

Por último, los días de gestación, aunque muy cerca de los niveles críticos establecidos, parecen contribuir significativamente en los niveles de purinas y pirimidinas oxidadas.

V. Discusión

El objetivo de esta Tesis ha sido dual, por una parte se ha profundizado en algunos aspectos metodológicos relacionados con el ensayo del cometa y, como continuación, se ha utilizado este ensayo para resolver cuestiones concretas tales como la elaboración de curvas de radiosensibilidad y su aplicación a un caso práctico de biomonitorización en cohortes madre-hijo para establecer la importancia de distintos factores relacionados con los hábitos de vida en los niveles de daño mostrado por las madres y los recién nacidos.

En primer lugar cabría situar el ensayo del cometa en un contexto actual, visualizando su desarrollo desde una perspectiva histórica.

Desde los primeros trabajos de Müller (1927) con *Drosophila melanogaster*, diseñando un ensayo que permitiera identificar y cuantificar el daño genético inducido, han sido muchos los investigadores del área de la toxicología genética que han disertado numerosas estrategias para cubrir tal objetivo, poniendo a punto múltiples técnicas y utilizando diversos organismos.

En lo que se refiere a los antecedentes del ensayo del cometa, en 1976 Cook *et al.*, publicaron un estudio acerca de la estructura nuclear basándose en la lisis celular que, después de dicho proceso donde se eliminan las membranas y el citoplasma, surge una estructura llamada nucleoide que consiste en una matriz, o andamiaje, compuesta de DNA, proteínas y RNA altamente enrollado como consecuencia de las torsiones negativas de la doble hélice al desarticularse los nucleosomas. Cuando el superenrollamiento negativo del DNA era relajado por la acción de agentes intercalantes, los lazos de DNA se expandían desde su unión al andamiaje proteico formando un halo alrededor del nucleoide. Efectos similares se observaron cuando se sometieron los nucleoides a tratamiento con radiación ionizante, concluyendo que sólo una rotura era suficiente para relajar el superenrollamiento de los lazos. Casi en paralelo, Rydber y Johanson (1978) habían procedido también a lisar células, pero embebiéndolas en agarosa. Habiéndose aceptado que la aparición del halo correspondía a la relajación de los lazos de DNA como consecuencia de la

inducción de SSB, en 1984 estos autores propusieron cuantificar el daño inducido por la radiación sometiendo el DNA de los nucleoides a un campo eléctrico en condiciones neutras. La hipótesis era que, bajo este campo eléctrico, el DNA con carga negativa debía migrar hacia el ánodo y la magnitud de la migración debería corresponder a la cantidad de daño inducido. Pero no fue sino hasta 1988 cuando Singh *et al.* propusieron utilizar la electroforesis con un pH fuertemente alcalino, bautizando formalmente la técnica como ensayo del Cometa, siendo esta versión la que se ha ido utilizando de manera casi mayoritaria debido a su mayor sensibilidad.

Así pues, podemos considerar que la popularidad de este ensayo comienza a principios de 1990 y, hoy en día, se considera que la técnica se encuentra en su máximo apogeo ya que es una de las más utilizadas para la evaluación de daño y reparación en el DNA debido a que ha demostrado su sensibilidad en una amplia variedad de tipos celulares, en comparación con otras técnicas. Además de su sensibilidad, su éxito se debe considerar como fruto de la simplicidad de su protocolo y de su bajo coste en términos tanto de tiempo como de dinero.

En paralelo al desarrollo del ensayo del cometa, se han ido proponiendo otras metodologías basadas en las premisas que sirvieron para desarrollar el ensayo del cometa, entre estas podemos citar la técnica de precipitación del DNA, la elución alcalina, la desnaturalización alcalina y la sedimentación de nucleoides. Aunque todas estas técnicas utilizan procesos de lisis celular similares, ninguna de ellas ha producido resultados aproximados a los obtenidos con el ensayo del cometa, generando además niveles basales de daño más altos (Green *et al.*, 1996).

Fruto de los trabajos pioneros con radiación ionizante se consideró que el DNA que migraba en la electroforesis debía corresponder a fragmentos de DNA, resultado de las DSB producidas por la radiación. Esta hipótesis atractiva explicaba que, a mayor dosis, los niveles de migración (tamaño de la cola) aumentan. Frente a esta propuesta, otros autores apoyaron la visión de que la cola estaba formada, fundamentalmente, por lazos de DNA relajados, generados por SSBs, más que fragmentos de DNA. La discusión sobre el origen

de la cola ha generado un gran número de trabajos y encendidas discusiones entre los especialistas (Fairbairn *et al.*, 1995; Klaude *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1997a, Singh y Stephens, 1997; Collins *et al.*, 2008). Como conclusión de los múltiples trabajos desarrollados para dilucidar este tema, se considera que, fundamentalmente, la cola está formada por lazos relajados de DNA, más que por fragmentos de DNA (Shaposhnikov *et al.*, 2008, 2009). Esto es interesante dado que son muchos los agentes genotóxicos que no inducen DSB pero que dan resultados claramente positivos en el ensayo del cometa. Enunciados como “el ensayo del cometa neutro se utiliza para la valoración de DSB” aparecen de manera recurrente tanto en publicaciones como en presentaciones. Al respecto, existe la creencia que las condiciones alcalinas son requeridas para poner de manifiesto SSB y que, por lo tanto, las condiciones cercanas a las neutras (o neutras) aseguran la detección solamente de DSB. Esta creencia surge probablemente de una falsa comparación del ensayo del cometa con las otras técnicas ya mencionadas para detectar roturas en el DNA, las que se basan en requerimientos similares de pH elevado para revelar SSB. Este requisito no es necesario para la cuantificación de SSB con el ensayo del cometa, lo que se demuestra al comparar dos estudios clásicos en la investigación y desarrollo de la técnica. Östling y Johanson (1984) describieron el comportamiento del DNA sometido a una electroforesis a pH 10 (muy por debajo del pH requerido para desnaturalizar el DNA), después de tratamiento con radiación ionizante. Dos años más tarde, Singh *et al.* (1988) realizaron el mismo procedimiento pero en condiciones alcalinas. Lo notable fue que ambos métodos fueron igualmente capaces de detectar las mismas bajas dosis de radiación (por debajo de 1 Gy). Estos resultados serían difíciles de explicar si solamente se detectase DSB a pH neutro, considerando que la radiación ionizante produce predominantemente SSB (Roots *et al.*, 1989). Östling y Johanson (1984) dieron una explicación en términos de nucleoides; después de la lisis la mayoría de las histonas son removidas pero el DNA está aún superenrollado siendo suficiente sólo una SSB para relajar un lazo (considerado como la unidad topológica independiente (Collins *et al.*, 2008)); así pues, la relajación puede ocurrir bajo ambas condiciones de pH.

Obviamente, bajo condiciones alcalinas, además ocurre una desnaturalización, por lo que no debiera de sorprender que ambas versiones difieran en detalles. Si comparamos la tinción homogénea que genera un cometa obtenido bajo condiciones neutras, el DNA bajo condiciones alcalinas aparece de manera granular, como si de fragmentos se tratase. Los fragmentos en la cola podrían eventualmente ocurrir si se generaran dos roturas en la misma hebra del lazo (situación probable en altos niveles de daño). También es posible que el DNA se desprenda de la matriz a alto pH y, luego de la neutralización, pueda aglomerarse. Sin embargo, el factor esencial que determina si un segmento de DNA aparece en la cola, en vez de en la cabeza, es la relajación del supererollamiento, que simplemente depende de una rotura y ocurre en función del pH. Así, es un hecho fácilmente observable que, a altos niveles de daño, aumentan la intensidad de la tinción de la cola, pero no la longitud de la misma. Esto es completamente coherente con el incremento del número de lazos que surgen de la relajación.

Independientemente de la discusión anterior, lo cierto es que el daño detectado en el DNA mediante el ensayo del cometa puede surgir por varios mecanismos incluyendo SSB, DSB, enlaces cruzados, sitios AP y la incompleta reparación por escisión al eliminar las diversas lesiones inducidas en el DNA como aductos. Las ventajas mostradas por el ensayo se han visto incrementadas por las distintas variaciones que se han ido introduciendo con el objetivo de hacer mas sensible la técnica y poder detectar otro tipo de lesiones que no sean necesariamente roturas en el DNA, pero que son susceptibles de serlo cuando estas lesiones son incubadas con enzimas específicas que reconocen diversos tipos de lesiones en el DNA.

Entre las ventajas principales de la técnica del cometa, a diferencia de otras técnicas alternativas propuestas, es que la obtención de datos se realiza a nivel de células individuales, pudiéndose detectar múltiples respuestas dentro de una población celular heterogénea. Esta característica es de gran importancia para los investigadores en oncología y radiología. Además, sólo se necesita un pequeño número de células para realizar un ensayo completo y cualquier población celular puede ser analizada. También cabría remarcar que la rapidez del ensayo es tal que los datos se pueden obtener dentro del mismo

día de la obtención de la muestra. Además, se puede evaluar el daño en el DNA de células en estado no proliferativo.

Las múltiples ventajas ya indicadas han hecho del ensayo del cometa una herramienta con numerosas aplicaciones. Así, el ensayo ha encontrado una amplia aceptación para la detección de daño y su reparación en numerosas áreas tales como la clínica, la genotoxicología, la biomonitorización ambiental y humana y la toxicología reproductiva, entre otras. Sin embargo, todavía es necesario profundizar en aspectos como la sensibilidad y la especificidad del ensayo, así como en la detección de posibles limitaciones de la técnica. Son numerosos los investigadores que están de acuerdo con lo propuesto por Tice (1995) de que su fácil aplicación conduce a que el ensayo puede llegar a ser erróneamente utilizado y que la mala interpretación de los resultados pueden llevar a conclusiones erróneas. Así, Tice en el año 2000, propone una pauta para la utilización del ensayo orientada hacia el área de la toxicología genética con el objeto de ser considerada como base para futuras aplicaciones.

Uno de los aspectos conflictivos de la técnica radica en la amplia variabilidad observada en muchos resultados obtenidos, lo que se considera que es debido, principalmente, a su gran sensibilidad. Esta gran sensibilidad de la técnica, además de ser una de sus principales ventajas, también es su principal inconveniente, pues la hace depender excesivamente de las condiciones metodológicas, donde pequeñas modificaciones en el protocolo pueden generar amplias variaciones en los resultados. Así pues, las condiciones de cada laboratorio, así como los factores de confusión existentes en el caso de los estudios de biomonitorización humana (estilo de vida, edad, dieta, variaciones interindividuales y estacionales etc.) son variables a tener en cuenta. Existen también otros factores que pueden contribuir a la obtención de resultados diferentes entre laboratorios como son la variabilidad de célula a célula, de gel a gel, de cultivo a cultivo, de individuo a individuo, así como también el uso de diferentes sistemas de análisis de imágenes o el recuento visual (Forchhamer *et al.*, 2008), el uso de diferentes parámetros para la expresión de los resultados *e.g.*, momento de la cola, porcentaje de DNA en la cola, entre otros.

En paralelo a esta discusión abierta sobre los factores de confusión (conceptuales y metodológicos), continúan generándose propuestas de modificaciones en el protocolo y en su aplicación para determinar nuevos efectos y utilizar nuevas células diana. Así, durante el presente año se han desarrollado nuevas propuestas como, por ejemplo, la adaptación de los protocolos para su aplicación en toxicología reproductiva, utilizando células espermáticas o células testiculares (Baumgartner *et al.*, 2009). También se han propuesto modificaciones para la evaluación *in vitro* del papel de la reparación por escisión de nucleótidos (NER), modificaciones que han sido similares a las propuestas para la evaluación de la reparación por escisión de bases (BER), con el objeto de analizar las diferencias interindividuales en linfocitos de poblaciones de personas saludables (Collins *et al.*, 2009). En este contexto, también hay que destacar la reciente revisión de Dhawan *et al.* (2009) sobre el uso del ensayo en múltiples organismos, cubriendo desde bacterias hasta humanos, pasando por algas, hongos, plantas inferiores y superiores, invertebrados (moluscos, gusanos, *Drosophila*), peces, anfibios, aves y roedores. De todo lo anterior se desprende que las previsiones futuras para el ensayo del cometa son muy prometedoras, incidiendo en múltiples áreas de investigación donde el único factor limitante de su utilización depende del ingenio investigador.

La aplicación del ensayo del cometa en estudios de biomonitorización humana todavía es relativamente escasa, y la dependencia de múltiples factores de confusión tanto individuales como ambientales, hace que se deba tenerse en cuenta la variabilidad inherente a la extrema sensibilidad del ensayo. Otro de los problemas de los estudios de biomonitorización humana es que idealmente se debe trabajar con un tamaño de muestra elevado (superior a 200 individuos) lo que requiere de una optimización del tiempo dedicado al ensayo, o incrementar el número de muestras con las que se puede trabajar simultáneamente. Todos estos son aspectos a mejorar cuando el ensayo del cometa se quiere aplicar a los estudios de biomonitorización humana.

1. Experimentos de validación

El ensayo del cometa se ha convertido en un test sensible y específico para la evaluación genotóxica tanto *in vitro* como *in vivo* (Rojas *et al.*, 1999). Hoy en día está siendo utilizado incluso en la industria farmacéutica como parte de la batería de ensayos de evaluación (Hartmann *et al.*, 2001) y está propuesto como un ensayo que puede ser utilizado como el segundo test *in vivo* en estudios de regulación (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, 2000; Hartmann y Suter, 2001). Pero, según el procedimiento estándar, y de acuerdo con algunas recomendaciones realizadas por Tice *et al.*, 2000, el ensayo del cometa no está diseñado para el análisis simultáneo de un gran número de muestras, ya que típicamente sólo una muestra puede ser depositada en un portaobjetos y debe ser manipulada separadamente en cada etapa del ensayo.

Teniendo en cuenta este problema, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis fue la optimización del ensayo del cometa mediante algunas modificaciones en el aspecto técnico que nos permitieran, poder analizar un mayor número de muestras en un mismo ensayo, incrementando la reproducibilidad y la eficiencia sin sacrificar la fiabilidad.

Para ello, nuestra principal aportación ha sido comparar la eficacia del método convencional del ensayo que utiliza portaobjetos, con el cual se puede analizar un máximo de 20 muestras con sus réplicas, con el método del Gelbond que brinda la opción de analizar 96 muestras con sus réplicas en un mismo ensayo. Los resultados de los experimentos muestran que los dos soportes utilizados (portaobjetos y Gelbond) detectan de manera eficiente el daño basal e inducido por el H₂O₂ y que, además, lo hacen con la misma sensibilidad a dosis bajas (control, 25, 50 y 100 µM); sin embargo, a dosis altas (200 y 250 µM), el Gelbond fue algo más sensible en la detección del daño producido por el agente, lo que aún reforzaría nuestra propuesta del método alternativo (**Figura 25**). McNamee *et al.* en el 2000 fueron los primeros en utilizar y demostrar la fiabilidad del soporte Gelbond utilizando células TK6 expuestas a bajas dosis de H₂O₂ (0-10 µM) y linfocitos aislados expuestos a bajas dosis de radiación ionizante (0-50 cGy); donde el límite de detección en las células TK6 fue de 1

μM , resultados que fueron similares a los previamente obtenidos con el método convencional (Kruszewski *et al.*, 1994; Collins *et al.*, 1997a). El límite de detección en los linfocitos fue de 10 cGy, resultados que también concuerdan con los obtenidos previamente cuando las muestras fueron preparadas en portaobjetos (Vijayalaxmi *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1994; Tice y Strauss, 1995). No se han llevado a cabo otros estudios comparando metodologías con los que podamos contrastar nuestros resultados; además, tanto los parámetros utilizados para la evaluación del daño genético como las dosis utilizadas en los trabajos citados, no son equivalentes a las nuestras por lo que la comparación entre laboratorios es complicada.

En el trabajo pionero de McNamee *et al.* (2000) no se llevó a cabo ningún estudio comparativo entre la metodología Gelbond y la clásica, por lo que nuestro trabajo es pionero en este sentido, trabajando en paralelo con las dos metodologías, y comparando los valores obtenidos tras los tratamientos. Es en base a estos resultados generados que podemos concluir que las sensibilidades de ambas metodologías son equivalentes y, por lo tanto, intercambiables. Además, este soporte mostró ser extremadamente estable y manipulable durante todas las etapas del ensayo. También facilitó el proceso de visualización ya que pueden colocarse en el microscopio 48 muestras sin necesidad de cambiar de portaobjetos después de contabilizar cada muestra, como ocurre en la versión convencional; de esta manera también se optimiza el espacio físico para el almacenamiento de muestras.

Como conclusión sobre la validación del Gelbond, nuestros resultados muestran que, a pesar de observar diferencias a dosis altas, la correlación del 98,7% encontrada entre los resultados de las dos técnicas confirma que, el hecho de aumentar el rendimiento de la técnica no supone una pérdida de sensibilidad en la detección del daño en el DNA ni en la fiabilidad de los resultados (**Figura 26**), por lo que es altamente recomendable la utilización del Gelbond® para el análisis y manipulación de un gran número de muestras.

Aparte de las consideraciones metodológicas, otro aspecto conflictivo del ensayo del cometa es qué es lo que se está midiendo o valorando con dicho ensayo. Así, la medida del daño en el DNA mediante la versión estándar del

cometa no nos proporciona información suficiente acerca de la etiología de las roturas generadas, que pueden representar el efecto directo de agentes clastogénicos, o bien ser el resultado del procesado de otras lesiones. Así, surge la necesidad de investigar la naturaleza de aquellos daños que no suponen una rotura directa, como son los sitiosapurínicos/apirimidínicos, que son álcali-lábiles y consecuentemente son transformados en roturas en las condiciones experimentales utilizadas o, como pueden ser las etapas intermedias del proceso de reparación de bases o nucleótidos, que implican roturas, como paso para la posterior eliminación de las bases dañadas. En base a esta necesidad, Collins *et al.* (1993) desarrollaron un paso extra en el protocolo que consistió en la digestión del DNA con enzimas que reconocen lesiones particulares y las transforman en roturas. La inclusión de esta modificación fue pensada principalmente con el objetivo de poder profundizar en las cuestiones relacionadas con el estrés oxidativo en humanos, inducido bien por procesos de exposición a la radiación ionizante o a compuestos químicos o, simplemente, como consecuencia de procesos normales como la respiración celular. El tema del estrés oxidativo preocupa a muchos investigadores dado su implicación en múltiples procesos y que, en bastantes casos, se supone que contribuye significativamente en el desarrollo del cáncer. Así, la mayoría de las investigaciones que han adoptado esta modificación, han centrado su interés en la evaluación de los niveles de 8-oxoG, considerado como el producto principal de oxidación del DNA con un claro potencial mutagénico (Dusinská y Collins, 1996; Gedik *et al.*, 2005). Aunque existen diversas metodologías para la medición del daño oxidativo en el DNA (GC-MS, HPLC, HPLC-EC) (Ravanat *et al.*, 1995; Nakajima *et al.*, 1996; Helbock *et al.*, 1998; Hofer y Möller, 1998), la mayoría conducen a una sobreestimación del daño, debido a la oxidación de la muestra durante el aislamiento y manipulación del material. Así, el ensayo del cometa parece ser un método muy apropiado para medir este tipo de daño (Collins *et al.*, 1997d).

Es por esto que otro de los objetivos de este trabajo fue poner a punto la modificación del ensayo mediante la utilización de las enzimas FPG y EndoIII y demostrar su buen funcionamiento en linfocitos humanos con daño oxidativo inducido por la exposición a un agente que produjera un daño oxidativo

conocido y específico. Un agente que cumple estos requisitos es el Ro 19-8022, el cual al ser expuesto a la luz visible produce lesiones en el DNA, específicamente 8-oxoG. Gracias a esta propiedad es fácil poder llevar a cabo estudios que relacionen el efecto observado con la dosis aplicada, para establecer dicha asociación. Los análisis estadísticos aplicados demuestran que ambas enzimas respondieron a las dosis de radiación aplicadas, donde cada una de ellas produjo efectos significativamente diferentes a los observados en los controles sin Ro y sin luz y con Ro y sin luz, entre los cuales no hubo diferencias **(Figuras 27 y 28)**. Esta aproximación enzimática, que convierte bases oxidadas en roturas, parece estar relativamente libre de problemas de oxidación espuria (Gedik *et al.*, 2005). Habiendo demostrado la eficiente detección de daño oxidativo mediante la utilización de las enzimas seleccionadas, coincidimos en proponer al ensayo del cometa, como ya lo han hecho otros investigadores (Duthie *et al.*, 1996; Pool-Zobel *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 1998a), como un buen biomarcador de estrés oxidativo que puede ser utilizado en distintas áreas como, por ejemplo, en biomonitorización humana y epidemiología molecular, entre otras. Además, esta modificación no sólo se puede utilizar para la detección de este tipo de daño, ya que cualquier lesión en el DNA que sea reconocida y reparada por alguna enzima, podría ser evaluada con este ensayo si es posible encontrar una enzima que funcione en las condiciones experimentales del ensayo del cometa. Por lo tanto, esta estrategia promete ser una herramienta muy buena para este tipo de estudios (Collins *et al.*, 1993; 1997a, b; 2001a; Dusinská y Collins, 1996).

Los linfocitos constituyen una población celular que proporciona una muestra biológica muy adecuada y de disponibilidad inmediata para ser utilizadas rutinariamente en estudios de genotoxicología. En los estudios de biomonitorización humana, las muestras normalmente van siendo obtenidas de manera lenta por lo que, entre la primera y la última muestra recogida, puede transcurrir un periodo de tiempo medido en meses o, incluso años. Si las muestras se procesan según se van recibiendo, se puede generar una gran variabilidad entre las primeras y las últimas debido a variaciones de procedimiento a lo largo del tiempo. En este contexto, parece lógico proceder a almacenar las muestras tal como van llegando para luego procesarlas y

analizarlas todas juntas. Logísticamente, las muestras requieren un almacenamiento adecuado por largos periodos de tiempo; por lo tanto, es importante contar con protocolos adecuados que permitan la obtención de resultados fiables. La manera más usual de proceder para el mantenimiento de muestras biológicas durante largos periodos consiste en su congelación. Convencionalmente, los linfocitos se congelan paulatinamente hasta $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (velocidad máxima de congelación: $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (Walter *et al.*, 1999)) en un medio rico en suero bovino fetal y conteniendo un 10% de DMSO para preservar la viabilidad de las células. Sin embargo, el principal requerimiento para llevar a cabo el ensayo del cometa es la integridad del DNA y no tanto la capacidad proliferativa de las células, como se puede requerir en otros casos (Collins, 2004).

Por lo tanto, obtener un protocolo de congelación/descongelación que minimice el daño en el DNA ha sido otro de nuestros objetivos. Así, para responder a esta pregunta, se realizaron experimentos para determinar si los procesos de aislamiento, congelación y descongelación de linfocitos humanos de sangre periférica, propuesto por nosotros, pueden inducir daño en el DNA detectable con el ensayo del cometa, en comparación con el observado en los linfocitos recién aislados y antes de su congelación.

Los resultados obtenidos indican que dichos procesos, en las condiciones desarrolladas, no suponen un efecto en el daño genético, ni basal ni oxidativo. Resultados similares fueron obtenidos previamente por Duthie *et al.* (2002), quienes evaluaron la posible capacidad del proceso de criopreservación de inducir daño en el DNA, ya sea a modo de roturas u oxidando bases, concluyendo que los niveles de purinas y pirimidinas oxidadas, evaluados con el ensayo del cometa, eran similares en linfocitos frescos y congelados.

En otro estudio reciente también se ha demostrado que linfocitos aislados tratados con un compuesto anticancerígeno (RH1), irradiados y controles pueden ser criopreservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes del análisis durante más de 30 meses sin que se produzca un deterioro significativo del DNA (Danson *et al.*, 2007).

Los procesos de congelación no sólo han de mantener la integridad del DNA, sino que deben mantener la capacidad de las células de responder a los agentes genotóxicos (físicos o químicos). Así, aunque algunos autores han considerado los procesos de aislamiento, congelación y descongelación como potenciales factores de confusión, diversos trabajos han demostrado que la respuesta de los linfocitos congelados frente al tratamiento con H₂O₂ no es significativamente diferente a la respuesta de los linfocitos frescos (Duthie *et al.*, 1996; Boyle *et al.*, 2000). Resultados similares fueron obtenidos por Visvardis *et al.* (1997) quienes observaron respuestas similares entre linfocitos frescos y congelados frente a la respuesta al tratamiento con H₂O₂ y con radiación gamma. Sin embargo, cuando los linfocitos fueron incubados durante dos horas, después de los tratamientos, para evaluar la cinética de reparación, las células que habían sido congeladas mostraron un bloqueo en la reparación del daño, en relación a los frescos. Así, Visvardis y colaboradores concluyeron que los linfocitos congelados deben ser estimulados con fitohemoaglutinina (PHA) para reparar con la misma eficiencia que los frescos, pero a una concentración que no estimule la proliferación celular. Estas observaciones son concordantes con las encontradas por O'Donovan *et al.* (1995).

Cuando se ha evaluado la influencia de los procesos de congelación en los niveles de daño genético utilizando otras técnicas, también se ha observado que el proceso no induce mayor frecuencia de intercambios entre cromátidas hermanas, ni modifica la capacidad de formación de colonias mutantes, ni altera la frecuencia de mutación en el *locus HPRT* (Murli *et al.*, 1987; Norimura *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 2001).

En cuanto a la viabilidad celular, aunque hemos observado una ligera disminución, los resultados muestran que no existe un aumento en el daño de los linfocitos. Hay que señalar que la viabilidad se mide usualmente, en la mayoría de los laboratorios, con azul de tripan, y las células que se tiñen son consideradas como no viables. Sin embargo, este compuesto no es un agente que mida propiamente la viabilidad, sino que simplemente indica la integridad de la membrana celular, por lo que podríamos decir que este método estaría subestimando la viabilidad celular. Así, las células con un alto grado de daño en su membrana (*e.g.*, células que crecen en monocapa y que se disgregan con

metodologías mecánicas) muestran ser positivas para esta tinción, sin que la integridad de su DNA ni su metabolismo se vean disminuidos por lo que, por definición, las células continúan siendo viables. En un estudio reciente utilizando células HeLa disgregadas con tripsina, o por el método de raspado, estas últimas presentaron un 20% de viabilidad en comparación con las tripsinizadas, que mostraron un 80%; sin embargo, las dos mostraron los mismos niveles (bajos) de daño. Además, las células tripsinizadas y las raspadas fueron cultivadas posteriormente durante 24 h, observándose que el porcentaje de células fijadas en el frasco de cultivo, pasado este tiempo, fue el mismo, lo que supone que las viabilidades eran similares (Collins *com. pers.*, 2008).

Consecuentemente, y de acuerdo con nuestros resultados, proponemos que los linfocitos humanos, aislados y almacenados a -80 °C por un periodo de tiempo bajo las condiciones propuestas, pueden ser utilizados satisfactoriamente para la evaluación de daño en el DNA. Se propone también al ensayo del cometa como una buena herramienta para evaluar daño genético en células congeladas.

2. Aplicabilidad del ensayo

Una vez demostrado que nuestros protocolos de congelación funcionan adecuadamente, que la utilización de las enzimas FPG y EndoIII permite medir de manera inequívoca daño oxidativo, y que la utilización del soporte Gelbond produce resultados equivalentes a los del soporte vidrio, pero incrementando de manera significativa el rendimiento, nuestro ensayo puede ser aplicado para resolver cuestiones específicas.

Así, en muchos trabajos se nos plantea la pregunta de cómo identificar, dentro de una población determinada, aquellos individuos con un elevado grado de inestabilidad genómica. La respuesta inequívoca a esta pregunta es muy importante dado que la inestabilidad genómica puede ir asociada a un riesgo elevado de padecer cáncer en un futuro. Una forma de medir la inestabilidad genómica es valorando la respuesta frente a un genotóxico estándar, como puede ser la radiación ionizante. Así pues, podemos considerar

la radiosensibilidad como una medida de inestabilidad genómica. De este modo, dentro del marco de las repuestas individuales, la radiosensibilidad es una característica inherente asociada a un aumento de los efectos de la radiación ionizante en el organismo (Twardella y Chang-Claude, 2002). En cuanto a esta respuesta, cabe mencionar que existen importantes diferencias entre los individuos, por lo que la radiosensibilidad se puede considerar un buen biomarcador de sensibilidad individual.

Para saber si un individuo es radiosensible o no, necesitamos saber cual es la respuesta media de una población de referencia, y así ver si una respuesta individual se aparta significativamente del valor medio, ya sea mostrando una marcada radiosensibilidad o radioresistencia. Esto exige la realización de una curva de calibración para determinar los valores de referencia.

Hasta el presente, la mayoría de los trabajos realizados con curvas de calibración y radiaciones se refieren al daño citogenético inducido, lo que permite una estimación dosimétrica confiable (Lloyd, 1998; Schröder y Heimers, 2002; Natarajan y Kesavan, 2005). Estos trabajos utilizan las técnicas de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas estructurales en la cuantificación de lesiones, mediante las que se calcula la dosis de radiación recibida por cada individuo. En nuestro caso, nos hemos propuesto utilizar el ensayo del cometa para la generación de una curva de calibración que nos permitiera conocer los niveles de daño radioinducido en el rango de 0 a 8 Gy de rayos gamma. Aunque el ensayo del cometa se presenta como una prueba rápida y sencilla, que puede ocupar una posición preferente respecto a otras metodologías citogenéticas clásicas (Moller, 2005), diversos autores sostienen la necesidad de una mejor estandarización de la técnica (Böcker *et al.*, 1997; Kassie *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2004b) en la elaboración de curvas dosis-respuesta para poder discriminar el origen de las discrepancias en los resultados obtenidos por los distintos investigadores. Es por esta razón que surge la necesidad de que cada laboratorio pueda disponer de sus propias curvas de calibración, evaluando los factores que inciden sobre la sensibilidad del método, principalmente a bajas dosis de radiación (Barquinero *et al.*, 1995). El esfuerzo conjunto de diferentes grupos de trabajo podría permitir disponer de distintas relaciones dosis-respuesta y observar si, en general, la curva correspondiente es similar en todos

los laboratorios o existen diferencias importantes. De esta manera, la unificación de criterios y metodologías podría conducir a un consenso necesario para una mejor interpretación y comparación de los resultados.

El buen ajuste obtenido en nuestra curva refuerza el tipo de respuesta esperada, así, nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Collins *et al.* (1996). Debido a que se observa un incremento lineal del porcentaje del DNA en la cola dentro de un rango de 0 a 8 Gy, la curva construida en este trabajo puede ser utilizada como curva de calibración. Debido a que el incremento de roturas/ALS por unidad de dosis ha sido determinado previamente por Ahnström y Erixon (1981), podemos establecer que el nivel de daño basal promedio de nuestra población es de 1,06 roturas/ 10^9 Da de DNA. Este valor está en completo acuerdo con el obtenido por Pitozzi *et al.* (2006), quienes obtuvieron un daño basal de 0,9 roturas/ 10^9 Da de DNA.

Las diferencias significativas entre dosis consecutivas permiten interpretar la discriminación del daño observado, en relación a los valores de cada dosis. Al respecto, mediante la validación realizada, se confirmó la utilidad de esta curva para la estimación de la radiosensibilidad de un individuo en particular, dependiendo del daño observado para una dosis determinada. Así, se corroboró la bondad de la curva al analizar dos individuos "a ciegas", que mostraron niveles de daño enmarcados dentro del intervalo de confianza de la curva calculado para las dosis analizadas. Específicamente, para el individuo A, desde la perspectiva de la radiosensibilidad individual, el 23,12% (2 Gy) y el 46,51% de DNA en la cola (6 Gy) están comprendidos dentro de los límites de confianza de los valores obtenidos para la curva de calibración ([21,13-27,57] y [45,72-51,3], respectivamente). Para el individuo B, aunque el resultado obtenido a 2 Gy cae fuera del intervalo de confianza correspondiente (28, 56% DNA en la cola), a la dosis de 6 Gy el valor obtenido está perfectamente contenido dentro del intervalo de confianza de la curva. Estas variaciones pueden ser atribuidas tanto a la variabilidad y sensibilidad de la técnica a bajas dosis, como a la variabilidad individual, lo cual estaría influyendo en la repetitividad de los resultados.

Tanto los resultados previos de nuestro laboratorio como la revisión del estado actual de la técnica, permiten comparar las distintas relaciones dosis-respuesta para rayos gamma; así, se observa que la forma general de las curvas obtenidas por otros laboratorios no siempre coinciden, lo que se puede atribuir a las pequeñas diferencias en los protocolos o a diferencias en las lesiones producidas por las distintas fuentes de radiación utilizadas en cuanto al tipo, la energía o la calidad. Aún así, se han establecido en un rango de daño detectable con el ensayo del cometa que está entre 0,06 y 3 roturas/ 10^9 Da de DNA (Collins *et al.*, 2008), lo que concuerda con los resultados aquí obtenidos.

La situación ideal sería que se llevaran a cabo este tipo de estudios en diferentes laboratorios, lo que permitiría interpretaciones consensuadas en cuanto al tipo de respuesta para este rango de dosis, más allá de la visión particular. Hay que enfatizar que, gracias a esta herramienta, es posible expresar los resultados en unidades reales (tales como roturas por célula o por Da de DNA); de esta manera se puede llegar a tener una visión más clara del significado biológico del daño en el DNA.

El daño genético observado en una determinada población se puede considerar como un biomarcador de exposición a agentes genotóxicos a una dosis biológicamente efectiva, aunque también puede considerarse como un biomarcador de sensibilidad, que permite discriminar entre individuos con distintos niveles de daño dentro de un colectivo supuestamente expuesto a los mismos agentes. Así, en la evaluación global del riesgo, el ensayo del cometa forma parte de aquellas técnicas que pueden ayudar a la identificación del peligro, por permitir la medición de dos biomarcadores distintos.

El daño en el DNA es considerado como un marcador de riesgo de cáncer ya que, generalmente es imprescindible para el desarrollo de un evento carcinogénico. Esto se ha demostrado utilizando diversos biomarcadores, como las aberraciones cromosómicas y los micronúcleos, (Hagmar *et al.*, 1998; Bonassi *et al.*, 2007). Sin embargo, todavía no se ha llevado a cabo ningún estudio que relacione altos niveles basales de daño en el DNA (medidos con el ensayo del cometa), con un elevado riesgo de cáncer. Hay que resaltar que estas investigaciones prospectivas requieren su tiempo y un volumen considerable de

trabajo para la biomonitorización de distintas cohortes, por lo que la falta de información con el ensayo del cometa no es más que una consecuencia de la reciente incursión de la técnica en este área.

Existen bastantes estudios que hacen una revisión del uso del ensayo del cometa alcalino en biomonitorización, tanto ambiental como laboral (Kassie *et al.*, 2000; Møller *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Møller, 2005; 2006a). En la actualidad son unos pocos cientos los estudios que han empleado el ensayo del cometa para medir, en la mayoría de los casos, el daño basal representado por roturas en el DNA y sitios AP, de modo que los estudios dedicados a medir daño más específico como el oxidativo, utilizando enzimas de restricción, no se caracterizan por ser numerosos. La mayoría de ellos se han centrado en la medición de daño en linfocitos de personas laboralmente expuestas a genotoxinas, obteniendo generalmente resultados positivos y que, además, suelen concordar con los obtenidos mediante otras metodologías como los micronúcleos y las aberraciones cromosómicas (Kruszewski *et al.*, 1998; Wojewódzka *et al.*, 1998; Somorovská *et al.*, 1999a, b; Cavallo *et al.*, 2002; Vodicka *et al.*, 2004a, b). Existen pocos estudios en poblaciones no expuestas, con la finalidad de obtener datos de niveles basales, no ligados a exposición alguna. Uno de estos estudios es el de Kopjar *et al.*, (2006), quienes estudiaron en un grupo de personas seleccionadas al azar de la población general, encontrando una correlación positiva entre la migración del DNA en el ensayo del cometa y el número total de aberraciones cromosómicas. En este estudio se plantea la siguiente pregunta: ¿Son algunas poblaciones más susceptibles que otras al daño en el DNA? En vista de su sensibilidad, el ensayo del cometa puede ser utilizado para evaluar posibles diferencias en los niveles de daño entre hombres y mujeres, adultos y niños, fumadores y no fumadores, o en función de la edad. Esta pregunta entronca con los objetivos de este trabajo de Tesis, uno de los cuales ha sido investigar si el nivel de daño oxidativo de un grupo de mujeres embarazadas se corresponde con el de sus hijos al momento de dar a luz, y si ciertos hábitos en el estilo de vida de las mismas influyen tanto en los niveles de daño propios como en el de sus hijos. En este contexto, existen algunos estudios recientes que han estado perfeccionando la medición del daño en el DNA y su reparación, tanto en linfocitos aislados de

sangre materna como de cordón umbilical (Decordier *et al.*, 2007; Knudsen y Hansen, 2007; Gaivão *et al.*, 2009), estudios con los que este trabajo de Tesis comparte objetivos.

De los resultados publicados, un estudio reciente no encontró diferencias entre madres y recién nacidos en la susceptibilidad al de daño en el DNA inducción *in vitro* por H₂O₂, o en la capacidad de reparación del mismo (Decordier *et al.*, 2007). En otro estudio, llevado a cabo en Alemania, se evaluaron los niveles basales de daño en madres e hijos (de aproximadamente 6 años) expuestos a hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) en el lugar de residencia, comparándolos con los resultados obtenidos en madres e hijos de zonas rurales, demostrando un incremento en los niveles de daño en el DNA en el grupo expuesto. Aunque este incremento mostró una débil asociación entre la exposición y los niveles de daño medidos con el ensayo del cometa, se detectó una fuerte correlación positiva entre los niveles de daño en el DNA de las madres con los de sus hijos (Wilheml *et al.*, 2007). De las observaciones de este trabajo se desprende la idea de que el sinergismo con otros potenciales agentes genotóxicos y una predisposición genética compartida, podrían desempeñar un papel importante.

Las dos poblaciones estudiadas en nuestro trabajo no mostraron ser diferentes en términos de daño basal, pero si que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de daño oxidativo (**Tabla XVI**). Así, la población I muestra resultados discordantes a los obtenidos en la población II, ya que los niveles de daño entre las madres y sus hijos, en la primera, no fueron distintos, a diferencia de lo que se observa en la población II (**Tabla XVII**). Además, los niveles de daño, tanto basal como oxidativo, de las madres de la población I no se correlacionan con los de sus hijos; en cambio, la población II, mostró una fuerte correlación de los niveles de daño entre madres e hijos.

Para intentar explicar estos resultados debemos poner especial atención en dos aspectos relevantes que pueden estar incidiendo: el primero es la imposibilidad de aplicar factores de corrección en la población I, debido a las carencias propias del soporte utilizado; es decir, no pudo llevarse a cabo la

eliminación de la variabilidad entre experimentos lo que, probablemente, habría evidenciado algún patrón de comportamiento de los resultados, como ocurrió en la población II. Aunque hemos demostrado en este trabajo que ambas versiones del ensayo son eficientes para medir el daño en el DNA, la estadística descriptiva y la comparación de ambas poblaciones indica que existen diferencias entre ellas, observándose que la población I está formada predominantemente por mujeres europeas, siendo la mayoría de ellas españolas. Esta mayor homogeneidad de la población I puede llevar a pensar que existen pocas diferencias intragrupo en cuanto a hábitos y estilo de vida, lo que se refleja en la uniformidad de los niveles de daño entre madres e hijos de la población I.

Además de estas dos posibles explicaciones, hay que tener en cuenta la variación intra e interindividual entre las muestras de sangre obtenidas de poblaciones humanas, lo que ha sido reconocido previamente en la revisión llevada a cabo por Møller (2006).

Del análisis comparativo de los estudios citados anteriormente, se observa la falta de consenso para identificar claramente factores de confusión en el ensayo del cometa. Para la fiabilidad de herramientas de tanta importancia en biomonitorización humana, debe obtenerse información adicional sobre el estilo de vida, posibles exposiciones a otras fuentes potencialmente genotóxicas, consumo de tabaco y alcohol, presencia de antioxidantes en la dieta, etc. Otras covariables como la contaminación ambiental y la estación del año en que se toman las muestras, también podrían ser consideradas como factores de confusión en algunos casos. La edad aparenta tener poca importancia en el ensayo del cometa y, hoy en día, el efecto del género se muestra inconsecuente en los diferentes estudios que lo han considerado.

Møller *et al.* en el año 2000, realizaron una revisión en la que los dos objetivos principales fueron evaluar qué factores pueden influir en los estudios de biomonitorización utilizando el ensayo del cometa, y si este ensayo es realmente útil en la determinación del riesgo individual. Su conclusión es que la inclusión del ensayo del cometa en biomonitorización es posiblemente prematura, aunque haya sido utilizado en muchos laboratorios. Esta opinión la

basan en la dificultad que encuentran al hallar asociaciones en los niveles de daño observado con el ensayo del cometa y las diferentes características de las poblaciones analizadas. Sin embargo y, a pesar de estas carencias, los investigadores consideran que el ensayo es una buena herramienta por que es capaz de discriminar a los grupos expuestos a agentes potencialmente genotóxicos.

En la búsqueda de factores de confusión que puedan influir sobre la respuesta observada se han identificado diversos factores que pueden, o no, ser relevantes en la determinación del daño basal en el DNA. El problema al que se han enfrentado numerosos investigadores es que los efectos de un factor de confusión normalmente se han evaluado en estudios diseñados para este propósito, por lo que el mismo factor puede no tener efectos en estudios longitudinales. Esto supone un fuerte obstáculo a la hora de proponer un factor como obligatorio en el diseño de un estudio.

En su trabajo, Møller *et al.* (2000) conscientes de lo difícil que es proponer factores de confusión que pueden influir en los resultados de biomonitorización utilizando el ensayo del cometa, consideran que entre los que deben ser contemplados y discutidos hay que considerar la edad, el género, el hábito de fumar, así como información acerca del nivel de actividad física, infecciones y dieta. Estos datos pueden ser de gran importancia ya que permiten la identificación de influencias de la respuesta del DNA, para identificar confusiones e interpretar los resultados obtenidos. Siguiendo estas recomendaciones, en este trabajo de Tesis hemos considerado pertinente tener en cuenta como factores de confusión la edad, la etnia, algunos antecedentes médicos, el uso de insecticidas, el consumo de tabaco y alcohol, así como algunos aspectos de la dieta y de la actividad física, en el caso de las madres; en los niños, los factores a considerar comprenden el género, las semanas de gestación al nacer, la talla, el peso y el tipo de parto.

En nuestro estudio, el alcohol fue el único factor que mostró influir en los niveles de daño de las madres de ambas poblaciones, pero de manera opuesta; así, aunque la influencia no fue significativa, la inclusión de este factor en el modelo fue transcendental para un buen ajuste. Por otra parte, la edad mostró

tener una influencia significativa en los niveles de pimidinas oxidadas en las madres. El alcohol ha sido una de las variables investigada como factor de confusión en cinco de los estudios encontrados en la literatura y, sólo en uno de ellos se encontró una asociación significativa entre el consumo de este y el daño en el DNA de linfocitos (Zhu *et al.*, 2000). De todas maneras y, al igual que nuestros resultados, Fracasso *et al.* (2002) han demostrado que el consumo de 45 g de alcohol al día no muestra un efecto en el daño en el DNA; esta cantidad es, aproximadamente, el doble de la consumida por las madres de nuestras poblaciones. En otros estudios no se hace referencia a la cantidad de alcohol consumida, por lo que no ha sido posible establecer comparaciones.

Aunque la edad es uno de los factores que más se incluye en los estudios de biomonitorización, en menos del 50% de los trabajos publicados se ha encontrado una asociación positiva entre la edad y los niveles de daño medidos con el ensayo del cometa. Entre los estudios positivos, Grover *et al.* (2003) sólo detectaron efectos significativos en el grupo control. Aunque es razonable especular acerca de una influencia positiva de la edad, como se ha demostrado utilizando otros biomarcadores, la mayoría de los estudios con el ensayo del cometa no ponen énfasis en este factor. Posiblemente debido a que en la mayoría de los estudios no existe una gran variabilidad en cuanto a la edad, faltan estudios diseñados especialmente para descubrir un posible efecto de la edad, incluyendo grupos numerosos de todas las edades para que los posibles efectos de este factor puedan ser visualizados de manera clara. La poca variación en el abanico de edades de los integrantes de las poblaciones estudiadas, como es nuestro caso, puede influir en la falta de conclusiones acerca del papel de este factor.

Por lo que respecta a los valores observados en los neonatos, vemos que en la población I, el alcohol consumido por las madres influye los niveles de daño basal. Sin embargo, en la población II el alcohol consumido por las madres tiene un efecto contrario en sus hijos. Esto sugiere que, posiblemente, el alcohol tenga efectos sobre otros factores no identificados y lo que se observa es el resultado de esta interacción. Lamentablemente, no se cuenta con otros estudios donde se haya analizado la influencia de este factor sobre los niveles de daño en el DNA de los recién nacidos, pero es ampliamente conocido que el

alcohol etílico es un potente agente genotóxico cuando se consume en exceso, y algunos estudios han demostrado que el ensayo del cometa es una herramienta capaz de detectar sus efectos en los niveles basales de daño de los que lo consumen (Rekhadevi *et al.*, 2009; Rombaldi *et al.*, 2009) y que puede tener consecuencias perjudiciales para los recién nacidos de madres que mantuvieron una ingesta de alcohol elevada durante el embarazo (Brooks, 1997). Sin embargo, hay que señalar que también hay estudios que obtienen resultados negativos acerca de los efectos del alcohol sobre los recién nacidos de madres que lo consumen (Pluth *et al.*, 2000).

En los neonatos de la población II, sorprendentemente, el género mostró influir de manera positiva en los niveles de daño, tanto basal como oxidativo; sin embargo, cuando se estudió este factor por si solo, fuera del modelo aplicado, no presentó asociación con los niveles de daño. En los estudios donde se ha investigado la modulación del daño en el DNA por el género, sólo Lam *et al.* (2002), han encontrado que ser varón es un factor que predispone a un incremento del daño genético; pero, en general, la mayoría de estudios, muestran resultados disconcordantes, sin una tendencia clara en ninguna de las dos direcciones (revisado por Møller *et al.*, 2000).

Hay que resaltar que los factores que mostraron alguna influencia son diferentes en función de la población considerada, lo que estaría confirmando lo difícil que es encontrar factores de confusión “universales” en el ensayo del cometa que sean aplicables, independientemente de la población analizada. Por lo tanto, podríamos concluir que no se ha podido establecer fehacientemente la influencia de ninguno de los factores considerados, como ha ocurrido en la mayoría de los estudios encontrados en la literatura, ya que al analizar cada uno por si solo, ninguno de ellos ha mostrado asociaciones claras con los niveles de daño obtenidos.

Por último, hay que señalar que esta parte del trabajo cabe considerarla como un estudio piloto, debido al pequeño número de individuos de cada población y, también, a que no se cuenta con suficiente bibliografía sobre la influencia del estilo de vida de madres embarazadas con el potencial riesgo genético, utilizando el ensayo del cometa. De todas maneras, hay que recordar

que nuestros datos constituyen una pequeña parte de un gran proyecto europeo (NewGeneris) en el que participan epidemiólogos, quienes manejan complejas bases de datos considerando múltiples factores de confusión en diferentes cohortes europeas. Es posible que de este estudio surjan resultados relevantes acerca del papel que ejercen los distintos factores de confusión en los niveles de daños cuantificados por el ensayo del cometa. Sin embargo, los niveles de daño basal de las poblaciones de madres e hijos analizadas por nosotros, no resultaron ser diferentes a los niveles considerados normales; de hecho, los niveles de daño de las madres tanto basal como oxidativo concuerdan con los valores observados en los 125 estudios revisados por Møller (2006b) y, de acuerdo a esto, niveles de daño de hasta un 20% de DNA en la cola debe ser considerados como normales.

Aparte de los factores aquí considerados como relevantes (alcohol, género y edad) y, aunque en este trabajo piloto de biomonitorización los otros factores considerados no hayan mostrado influir en los resultados, hay que señalar que se cuenta con una cantidad de bibliografía importante que pone de manifiesto que el consumo de tabaco, la dieta, la actividad física y la contaminación ambiental, así como cuadros infecciosos, la exposición residencial y el uso de insecticidas, entre otros, pueden influir en los niveles de daño medidos con el ensayo del cometa.

En síntesis, podemos decir que, en humanos, la utilización de este ensayo en todas sus versiones y modificaciones, puede llegar a desempeñar un papel muy importante en los estudios de biomonitorización. Si bien no se puede esperar que todas las exposiciones con consecuencias carcinogénicas se revelen como daño en el DNA de los linfocitos, el ensayo ha demostrado ser un buen método de valoración general de exposición a compuestos potencialmente genotóxicos en humanos (Møller *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2004; Møller, 2005; Møller, 2006a). Quizás, lo relevante del ensayo es que, además de medir daño general, también se puede utilizar como herramienta para la identificación de marcadores de dosis biológicamente efectivas, de efecto y de susceptibilidad individual. En los estudios de biomonitorización es importante contar con datos relacionados con el modo de acción de los agentes evaluados; en este sentido, el ensayo del cometa ha aportado información fundamental

sobre los mecanismos de genotoxicidad y respuestas celulares. Esto es crucial cuando se trata de interpretar los datos de biomonitorización en términos de riesgo de cáncer.

Respecto a la bondad del uso de enzimas específicas, que permiten la detección de diferentes tipos de lesiones en las bases del DNA, su incorporación en el ensayo del cometa convierte a esta técnica en una buena herramienta para detectar mecanismos específicos de acción de los agentes/exposiciones evaluados. Además de las enzimas que detectan daño oxidativo, que son las utilizadas en este estudio, hay que enfatizar que esta herramienta puede llegar a tener un futuro importante si se pueden encontrar/utilizar otras enzimas que detecten otros tipos específicos de lesiones. Si esto es posible, el ensayo del cometa, con estas modificaciones, se puede convertir en una poderosa herramienta para resolver aspectos mecanísticos de los efectos genotóxicos. Respecto al aspecto concreto del daño oxidativo en el DNA medido con el ensayo del cometa, éste no sólo puede tener relevancia en los estudios de riesgo de cáncer, sino que también se puede relacionar con otras enfermedades que se asocian con altos niveles de estrés oxidativo. Varias modificaciones del ensayo para medir la capacidad de reparación permiten el estudio de este importante marcador, a la vez que el estatus antioxidante puede ser medido evaluando el daño inducido en linfocitos por el H₂O₂. Así, la introducción de un marcador de estrés oxidativo y defensas antioxidantes, especialmente en los estudios de biomonitorización humana, se ha considerado como necesaria y esencial (Mayne, 2003).

Para finalizar esta discusión, cabría resaltar que el abordaje llevado a cabo en esta Tesis, tanto desde el aspecto técnico como del teórico, del ensayo del cometa, puede proporcionar una información valiosa y útil para quienes se introduzcan en el uso de esta técnica. Con esta finalidad didáctica, en el **ANEXO III** se procede a dar respuesta a las preguntas más recurrentes sobre el ensayo del cometa.

VI. Conclusiones

Después de haber realizado todos los análisis necesarios para evaluar nuestros datos y dar respuesta a los objetivos propuestos, y tras la discusión de los resultados obtenidos, de este trabajo de Tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que las optimizaciones desarrolladas en este trabajo permiten el análisis de múltiples muestras en un mismo estudio, sin la pérdida de sensibilidad y fiabilidad de los resultados obtenidos.
2. La optimización de la técnica en cuanto al cambio de soporte ha mostrado tener numerosas ventajas sobre la metodología convencional. El uso de la lámina Gelbond ha proporcionado un soporte extremadamente estable y fácil de manipular en todas las etapas de ensayo; de la misma manera que ha facilitado la visualización del daño en el microscopio por el hecho de contar con un elevado número de muestras en el mismo soporte.
3. Los protocolos aquí desarrollados han demostrado que los linfocitos humanos aislados de sangre periférica, criopreservados y almacenados de manera prolongada, pueden ser utilizados satisfactoriamente para la determinación tanto de los niveles endógenos de roturas en el DNA como de bases oxidadas mediante el ensayo del cometa; demostrándose también que dichos procesos no suponen un aumento del daño genético basal o inducido.
4. Se ha demostrado que la radiosensibilidad individual puede ser medida con el ensayo de cometa, lo que respalda a la técnica como un buen indicador de inestabilidad genómica individual. Además, se propone que la curva de calibración construida es un buen parámetro para la determinación de variaciones respecto de los niveles de daño genético basal.

5. Se ha establecido que la utilización de las enzimas FPG y EndoIII funciona eficientemente en la determinación del daño oxidativo, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que se propone su implementación en el ensayo del cometa como un buen biomarcador de estrés oxidativo en poblaciones humanas.
6. Se ha logrado demostrar que existe una relación considerable entre el daño genético observado en madres y el que presentan sus hijos recién nacidos por lo que se sugiere que existe una predisposición genética compartida, que podría desempeñar un papel importante en los niveles de daño primario observados en el DNA.
7. No se ha podido establecer fehacientemente una influencia significativa de ninguno de los factores de confusión considerados, ya que, al analizar cada uno de ellos por si solo, ninguno mostró asociación con los niveles de daño observados. Esto pone en evidencia los problemas asociados con la reciente inclusión del ensayo del cometa en los estudios de biomonitorización, por lo que surge la necesidad de desarrollar estudios específicos que tengan como objetivo principal la determinación de aquellos factores que puedan incidir en los niveles de daño en el DNA de poblaciones humanas.

VII. Bibliografía

- Ahnstrom, G., K. Erixon. 1981. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: Friedberg, E.C., P.C. Hanawalt (Eds.) DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures. Marcel Dekker Inc, New York and Basel, 403-418.
- Akaike, T., M. Suga, H. Maeda. 1998. Free radicals in viral pathogenesis: molecular mechanisms involving superoxide and NO. Proc Soc Exp Biol Med, 217:64-73.
- Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res, 31:347-364.
- Anderson, D., T.W. Yu, B.J. Phillips, P. Schmezer. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. Mutat Res, 307:261-271.
- Anderson, D., T.W. Yu, M.A. Browne. 1997a. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assays. Mutat Res, 390:69-77.
- Anderson, D. T.W. Yu, M.M. Dobrzynska, G. Ribas, R. Marcos. 1997b. Effects in the comet assay of storage condition on human blood. Teratog Carcinog Mutagen, 17:115-125.
- Angelis, K.J., M. Dusinská, A.R. Collins. 1999. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. Electrophoresis, 20:2133-2138.
- Angerer, J., J. Gündel. 1996. Biomonitoring and occupational medicine. Possibilities and limitations. Ann Ist Super Sanità, 32:199-206.

- Angerer, J., U. Ewers, M. Wilhelm. 2007. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health*, 210:201-228.
- Aquino-Parsons, C., C. Luo, C.M. Vikse, P.L. Olive. 1999. Comparison between the comet assay and the oxygen microelectrode for measurement of tumor hypoxia. *Radiother Oncol*, 51:179-185.
- Aswood-Smith, M.J. 1980. Low temperature preservation of cells tissue and organs. En: *Low temperature preservation in Medicine and Biology*. Aswood-Smith, M.J. y J. Frarrant (Eds.) 19-44.
- Azqueta, A., S. Shaposhnikov, A.R. Collins. 2009. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res*, 674:101-108.
- Baltaci, V., F. Kayikçioğlu, I. Alpas, H. Zeyneloğlu, A. Haberal. 2002. Sister chromatid exchange rate and alkaline comet assay scores in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 84:62-66.
- Barquinero, J.F., L. Barrios, M.R. Caballín, R. Miró, M. Ribas, A. Subias, J. Egozcue. 1995. Occupational exposure to radiation induces an adaptive response in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 67:187-191.
- Baumgartner, A., E. Cemeli, D. Anderson. 2009. The comet assay in male reproductive toxicology. *Cell Biol Toxicol*, 25:81-98.
- Belyaev, I.Y., S. Eriksson, J. Nygren, J. Torudd, M. Harms-Ringdahl. 1999. Effects of ethidium bromide on DNA loop organisation in human lymphocytes measured by anomalous viscosity time dependence and single cell gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta*. 1428:348-356.
- Bennett, D.A., M.D. Waters. 2005. Applying biomarkers research. *Environ Health Perspect*, 108:907-910.
- Betti, C., R. Barale, B.L. Pool-Zobel. 1993. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes

- and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. *Environ Mol Mutagen*, 22:172-180.
- Betti, C., T. Davini, L. Giannessi, N. Loprieno, R. Barale. 1995. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res*, 343:201-207.
 - Böcker, W., T. Bauch, W.U. Müller, C. Streffer. 1997. Image analysis of comet assay measurements. *Int J Radiat Biol*, 72:449-460.
 - Boiteux, S. 1993. Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J Photochem Photobiol B*, 19:87-96.
 - Bonassi, S., A. Znaor, M. Ceppi, C. Lando, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M.P. Bigatti, C. Bolognesi, A. Cebulska Wasilewska, E. Fabianova, A. Fucic, L. Hagmar, G. Joksic, A. Martelli, L. Migliore, E. Mirkova, M.R. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa, M. Fenech. 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28:625-631.
 - Boyle, S.P., V.L. Dobson, S.J. Duthie, J.A. Kyle, A.R. Collins. 2000. Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur J Nutr*, 39:213-223.
 - Brooks, P.J. 1997. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity—a review. *Alcohol Clin Exp Res*, 21:1073-1082.
 - Bruner, S.D., D.P. Norman, G.L. Verdine. 2000. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403:859-866.
 - Burrows, C.J., J.G. Muller. 1998. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chem Rev*, 98:1109-1152.
 - Calderón-Garcidueñas, L., N. Osnaya-Brizuela, L. Ramírez-Martínez, A. Villarreal-Calderón. 1996. DNA strand breaks in human nasal respiratory

- epithelium are induced upon exposure to urban pollution. *Environ Health Perspect*, 104:160-168.
- Carrano, A.V, A.T. Natarajan. 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC). Publication No 14. Mutat Res*, 204: 379-406.
 - Castellón, E., M. Clementi, C. Hitschfeld, C. Sánchez, D. Benítez, L. Sáenz, H. Contreras, C. Huidobro. 2006. Effect of leuprolide and cetrorelix on cell growth, apoptosis, and GnRH receptor expression in primary cell cultures from human prostate carcinoma. *Cancer Invest*, 24:261-268.
 - Cavallo, D., I. Iavicoli, A. Setini, A. Marinaccio, B. Perniconi, G. Carelli, S. Iavicoli. 2002. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. *Environ Mol Mutagen*, 40:184-189.
 - Cheng, L., L.E. Wang, M.R. Spitz, Q. Wei. 2001. Cryopreserving whole blood for functional assays using viable lymphocytes in molecular epidemiology studies. *Cancer Lett*, 166:155-163.
 - Collins, A.R. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants and cancer. *BioEssays*, 21:183-193.
 - Collins, A.R. 2003. Oxidative DNA damage biomarkers: a need for quality control. En: Cutter, R.G y H. Rodriguez (eds.) *Critical reviews of oxidative stress and ageing. World Scientific* 469-484.
 - Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26:249-261.
 - Collins, A.R. 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*, 681:24-32.
 - Collins, A.R., E. Horváthová. 2001. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans*, 29:337-341.

- Collins, A.R., S.J. Duthie, V.L. Dobson. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14:1733-1735.
- Collins, A.R., A.G. Ma, S.J. Duthie. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*, 336:69-77.
- Collins, A.R., M. Dusinská, C.M. Gedik, R. Stětina. 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*, 104:465-469.
- Collins, A.R., V.L. Dobson, M. Dusinská, G. Kennedy, R. Stětina. 1997a. The comet assay: What can it really tell us? *Mutat Res*, 375:183-193.
- Collins, A.R., D.L. Mitchell, A. Zunino, J. de Wit, D. Busch. 1997b. UV-sensitive rodent mutant cell lines of complementation groups 6 and 8 differ phenotypically from their human counterparts. *Environ Mol Mutagen*, 29:152-160.
- Collins, A.R., M. Dusinská, M. Franklin, M. Somorovská, H. Petrovská, S. Duthie, L. Fillion, M. Panayiotidis, K. Raslová, N. Vaughan. 1997c. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ Mol Mutagen*, 30:139-146.
- Collins, A., J. Cadet, B. Epe, C. Gedik. 1997d. Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January. *Carcinogenesis*, 18:1833-1836.
- Collins, A.R., C.M. Gedik, B. Olmedilla, S. Southon, M. Bellizzi. 1998a. Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J*, 12:1397-400.
- Collins, A.R., K. Raslová, M. Somorovská, H. Petrovská, A. Ondrusová, B. Vohnout, R. Fábry, M. Dusinská. 1998b. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med*, 25:373-377.

- Collins, A.R., M. Dusinská, A. Horska. 2001a. Detection of alkylation damage in humal lymphocytes DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol*, 48:611-614.
- Collins, A.R., M. Dusinská, E. Horváthová, E. Munro, M. Savio, R. Stětina. 2001b. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*, 16:297-301.
- Collins, A.R., A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23:143-151.
- COM (Committee on Mutagenicity of Chemical in Food, Consumer Products and the Environment). 2000. Guidelines on a strategy for testing of chemicals for mutegenicity. <http://www.doh.gov.uk/com.htm>
- Cook, P., I. Brazell, E. Jos. 1976. Characterization of nuclear structure containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 22:303-324.
- Coussens, L.M., Z. Werb. 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420:860-867.
- Danson, S., M. Ranson, O. Denny, J. Cummings, T.H. Ward. 2007. Validation of the comet-X assay as a pharmacodynamic assay for measuring DNA cross-linking produced by the novel anticancer agent RH1 during a phase I clinical trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, 60:851-861.
- Decordier, I., K. De Bont, K. De Bock, R. Mateuca, M. Roelants, R. Ciardelli, D. Haumont, L.E. Knudsen, M. Kirsch-Volders. 2007. Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress. *Toxicol Lett*, 172:68-84.
- De Meo, M., M. Laget, M. Castegnaro, G. Dumenil. 1991. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions *Mutat Res*, 260:295-306.
- DFG. 2002. Deutsche Forschungsgemeinschaft. En: Angerer, J. (Ed.), *Biological Monitoring—Prospects in Occupational and Environmental Medicine*. Wiley-VCH.

- Dhawan, A., M. Bajpayee, D. Parmar. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol*, 25:5-32.
- Dixon, D.R., A.M. Pruski, L.R. Dixon, A.N. Jha. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis*, 17:495-507.
- Dusinská, M., A.R. Collins. 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* 24:405-411.
- Dusinská, M., A.R. Collins. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23:191-205.
- Dusinská, M., R. Fábri, E. Szabová, M. Somorovská. H. Petrovská. A.R. Collins. 1997. Occupational exposure to mutagens: monitoring of rubber factory workers. *Mutat Res*, 379:161-162.
- Duthie, S.J., A. Hawdon. 1998. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. *FASEB J*, 12:1491-1497.
- Duthie, S.J., A. Ma, M.A. Ross, A.R. Collins. 1996. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*, 56:1291-1295.
- Duthie, S.J., L. Pirie, A.M. Jenkinson, S. Narayanan. 2002. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*, 17:211-214.
- Duty, S.M., N.P. Singh, L. Ryan, Z. Chen, C. Lewis, T. Huang, R. Hauser. 2002. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum Reprod*, 17:1274-1280.
- Eastham, A.M., B. Marples, A.E. Kiltie, C.J. Orton, C.M. West. 1999. Fibroblast radiosensitivity measured using the comet DNA-damage assay correlates with clonogenic survival parameters. *Br J Cancer*, 79:1366-1371.

- Ejchart, A., N. Sadlej-Sosnowska. 2003. Statistical evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res*, 534:85-92.
- Elhajouji, A., A.P. Santos, P. van Hummelen, M. Kirsch-Volder. 1994. Metabolic differences between whole blood and lymphocytes cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo[α]pyrene. *Mutagenesis*, 9: 307-313.
- Elia, M.C., R.D. Storer, T.W. McKelvey, A.R. Kraynak, J.E. Barnum, L.S. Harmon, J.G. DeLuca, W.W. Nichols. 1994. Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environ Mol Mutagen*, 24:181-191.
- Eren, K., N. Ozmeriç, S. Sardeş. 2002. Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Investig*, 6:150-154.
- Esterbauer, H., G. Wäg, H. Puhl. 1993. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*, 49:566-576.
- European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD). 2003. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med*, 34:1089-1099.
- Fairbairn, D., K.L. O'Neill, M.D. Standing. 1993. Application of confocal laser scanning microscopy to analysis of H₂O₂-induced DNA damage in human cells. *Scanning*, 15:136-139.
- Fairbairn, D., D. Meyers, K. O'Neill. 1994. Detection of DNA damaging agents in environmental water samples. *Bull Environ Contam Toxicol*, 52:687-690.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olive, K.L. O'Neill. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, 339:37-59.

- Farrant, J. 1989. General observations on cell preservation. En: Low temperature preservation in Medicine and Biology. Aswood-Smith, M.J. y J. Farrant (Eds.) 1-18.
- Faust, F., F. Kassie, S. Knasmüller, R.H. Boedecker, M. Mann, V. Mersch-Sundermann. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 566:209-229.
- Forchhammer, L., E.V. Bräuner, J.K. Folkmann, P.H. Danielsen, C. Nielsen, A. Jensen, S. Loft, G. Friis, P. Møller. 2008. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*, 23:223-231.
- Fortoul, T.I., M. Valverde, M.C. López, M.R. Avila-Costa, M.C. Avila-Casado, P. Mussali-Galante, A. González-Villalva, E. Rojas, P. Ostrosky-Shejet. 2004. Genotoxic differences by sex in nasal epithelium and blood leukocytes in subjects residing in a highly polluted area. *Environ Res*, 94:243-248.
- Fracasso ME, Perbellini L, Soldà S, Talamini G, Franceschetti P. 2002. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mutat Res*, 515:159-169.
- Frankenberg-Schwager, M. 1989. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation. *Radiother Oncol*, 14:307-320.
- Gaivão, I., A. Piasek, A. Brevik, S. Shaposhnikov, A.R. Collins. 2009. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation. *Cell Biol Toxicol*, 25:45-52.
- García, O., I. Romero, J.E. González, T. Mandina. 2007. Measurements of DNA damage on silver stained comets using free Internet software. *Mutat Res*, 627:186-190.
- Gedik, C.M., S.W. Ewen, A.R. Collins. 1992. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*, 62:313-320.

- Gedik, C.M., A. Collins; ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). 2005. Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: results of an interlaboratory validation study. *FASEB J*, 19:82-84.
- Green, M.H., J.E. Lowe, C.A. Delaney, I.C. Green. 1996. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 269:243-266.
- Grollman, A.P., M. Moriya. 1993. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet*, 9:246-249.
- Gros, L., M.K. Saporbaev, J. Laval. 2002. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*, 21:8905-8925.
- Grover, P., K. Danadevi, M. Mahboob, R. Rozati, B.S. Banu, M.F. Rahman. 2003. Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, 18:201-205.
- Hagmar, L., S. Bonassi, U. Strömberg, A. Brøgger, L.E. Knudsen, H. Norppa, C. Reuterwall. 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, 58:4117-4121.
- Halliwell, B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review Nutrition*, 16:33-50.
- Halliwell, B. 2000. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr*, 72:1082-1087.
- Hartmann, A., W. Suter. 2001. The comet assay: the test of choice as the second *in vivo* test for *in vitro* positive pharmaceuticals? *Environ. Mol Mutagen*, 37:36.
- Hartmann, A., A. Elhajouji, E. Kiskinis, F. Poetter, H. Martus, A. Fjällman, W. Friauff, W. Suter. 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial

-
- genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem Toxicol*, 39:843-858.
- Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice; 4th International Comet Assay Workshop. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18:45-51.
 - Hazane, F., S. Sauvaigo, T. Douki, A. Favier, J.C. Beani. 2006. Age-dependent DNA repair and cell cycle distribution of human skin fibroblasts in response to UVA irradiation. *J Photochem Photobiol B*, 82:214-223.
 - Helbock, H.J., K.B. Beckman, M.K. Shigenaga, P.B. Walter, A.A. Woodall, H.C. Yeo, B.N. Ames. 1998. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:288-293.
 - Hellman, B., H. Vaghef, L. Friis, C. Edling. 1997. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health*, 69:185-192.
 - HESI. 2004. Health and Environmental Science Institute. <http://www.hesiglobal.org/S>.
 - Hofer, T., L. Möller. 1998. Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*, 11:882-887.
 - Hoffmann, H., J. Högel, G. Speit. 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis*, 20:455-466.
 - Hollander, M.C., J. Albert., J. Fornace. 1995. Cell cycle checkpoints and growth-arrest genes activated by genotoxic stress. In: Vos, J.M.H. (ed). *DNA repair mechanisms: impact on human disease and cancer*. (New York, Springer-Verlag). 219-237.

- Horváthová, E., M. Dusinská, S. Shaposhnikov, A.R. Collins. 2004. DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. *Mutagenesis*, 19:269-276.
- Ito, K., S. Kawanishi. 1997. Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer. *Biol Chem*, 378:1307-1312.
- Jackson, A.L., L.A. Loeb. 2001. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res*, 477:7-21.
- Jakubowski, M., M. Trzcinka-Ochocka. 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health*, 47:22-48.
- Johnstone, E.C., M.J. Lind, M.J. Griffin, A.V. Boddy. 2000. Ifosfamide metabolism and DNA damage in tumour and peripheral blood lymphocytes of breast cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 46:433-441.
- Jostes, R.F., T.E. Hui, F.T. Cross. 1993. Single-cell gel technique supports hit probability calculations. *Health Phys*, 64:675-679.
- Kadioglu, E., S. Sardas, S. Aslan, E. Isik, A.E. Karakaya. 2004. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*, 9:203-209.
- Kasamatsu, T., K. Kohda, Y. Kawazoe. 1996a. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay. *Mutat Res*, 369:1-6.
- Kasamatsu, T., K. Kohda, Y. Kawazoe. 1996b. Synergetic cytotoxicity of bleomycin and polyhydric alcohols: DNA strand breakage evaluated by "comet assay". *Biol Pharm Bull*, 19:632-635.
- Kassie, F., W. Parzefall, S. Knasmüller. 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res*, 463:13-31.

- Kehoe, R.A., F. Thamann, J. Cholack. 1933. Lead absorption and excretion in certain trades. *J Ind Hyg*, 15:306-319.
- Kehrer, J.P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149:43-50.
- Kino, K., H. Sugiyama. 2001. Possible cause of G-C→C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone. *Chem Biol*, 8:369-378.
- Kiskinis, E., W. Suter, A. Hartmann. 2002. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis*, 17:37-43.
- Kizilian, N., R.C. Wilkins, P. Reinhardt, C. Ferrarotto, J.R. McLean, J.P. McNamee. 1999. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. *Biotechniques*, 27:926-930.
- Klaude M, S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnström. 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*, 363:89-96.
- Klaunig, J.E., Y. Xu, J.S. Isenberg, S. Bachowski, K.L. Kolaja, J. Jiang, D.E. Stevenson, E.F. Walborg Jr. 1998. The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 106:289-295.
- Klebe, R.J., M.G. Mancuso. 1983. Identification of new cryoprotective agents for cultured mammalian cells. *In Vitro*, 19:167-170.
- Kleiman, N.J., A. Spector. 1993. DNA single strand breaks in human lens epithelial cells from patients with cataract. *Curr Eye Res*, 12:423-431.
- Kleinsasser, N.H., H. Weissacher, E.R. Kastenbauer, P. Dirschedl, B.C. Wallner, U.A. Harréus. 2000. Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 257:337-342.
- Knudsen, L.E., A.M. Hansen. 2007. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health*, 210:461-470.

- Kobayashi, H., C. Sugiyama, Y. Morikawa, M. Hayashi, T. Sufuni. 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in single gel cell electrophoresis assay. *MMS Commun*, 3:103-115.
- Kommission Human-Biomonitoring des Umweltbundesamtes. 1996. Human biomonitoring: Definitionen Möglichkeiten und Voraussetzungen. *Bundesgesundheitsbl*, 39:213-214.
- Kopjar, N., D. Zeljezić, V. Garaj-Vrhovac. 2006. Evaluation of DNA damage in white blood cells of healthy human volunteers using the alkaline comet assay and the chromosome aberration test. *Acta Biochim Pol*, 53:321-336.
- Kruszewski, M., M.H. Green, J.E. Lowe, I. Szumiel. 1994. DNA strand breakage, cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4 degrees C and 37 degrees C in L5178Y sublines. *Mutat Res*, 308:233-241.
- Kruszewski, M., M. Wojewódzka, T. Iwanenko, A.R. Collins, I. Szumiel. 1998. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. II. Base damage. *Mutat Res*, 416:37-57.
- Kumaravel, T.S., A.N. Jha. 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res*, 605:7-16.
- Kumaravel, T.S., B. Vilhar, S.P. Faux, A.N. Jha. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biol Toxicol*, 25:53-64.
- Lam, T.H., C.Q. Zhu, C.Q. Jiang. 2002. Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat Res*, 515:147-157.
- Le, Q.T., M.S Kovacs, M.J. Dorie, A. Koong, D.J. Terris, H.A. Pinto, D.R. Goffinet, K. Nowels, D. Bloch, J.M. Brown. 2003. Comparison of the comet assay and the oxygen microelectrode for measuring tumor oxygenation in head-and-neck cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 56:375-383.

- Lee, J., N. Koo, D.B. Min. 2004a. Reactive oxygen species, aging and antioxidative nutraceuticals. *Comprehens Rev Food Sci Food Safety*, 3:21-33.
- Lee, O.E., J. Lee, D. Sul, J. Lee. 2004b. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci*, 81:121-132.
- Liao, W., M.A. McNutt, W.G. Zhu. 2009. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48:46-53.
- Lovell, D.P., T. Omori. 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis*, 23:171-182.
- Lloyd, D.C. 1998 New developments in chromosomal analysis for biological dosimetry. *Radiat Prot Dosim*, 77:33-36.
- Lloyd, D.R., D.W. Phillips, P.L. Carmichael. 1997. Generation of putative intrastrand crosslinks and strand breaks by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol*, 10:393-400.
- Lyons, T.J. 1993. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 71:26B-31B.
- Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara, T. Sugimura. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation systems. En: de Serres, F.J., J.R. Fouts, J.R. Bend, R.M. Philpot, eds. *In vitro metabolic activation in mutagenic testing*, North Holland: Elsevier, 85-88.
- Mayne, S. 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarker of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 133:933-940.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247:C125-C142.
- McArt, D.G., G. McKerr, C.V. Howard, K. Saetzler, G.R. Wasson. 2009a. Modelling the comet assay. *Biochem Soc Trans*, 37:914-917.

- McArt, D.G., G.R. Wasson, G. McKerr, K. Saetzler, M. Reed, C.V. Howard. 2009b. Systematic random sampling of the comet assay. *Mutagenesis*, 24:373-378.
- McGlynn, A.P., G.R. Wasson, S. O'Reilly, V.J. McKelvey-Martin, H. McNulty, J.J. Strain, G. McKerr, F. Mullan, N. Mahmud, J. Scott, D.G. Weir, C.S. Downes. 2003. Detection of replicative integrity in small colonic biopsies using the BrdUrd comet assay. *Br J Cancer*, 88:895-901.
- McKelvey-Martin V., M. Butler, L.H. Stewart. 1992. Analysis of the DNA content and integrity in cells extracted from bladder washing and voided urine specimens, in bladder cancer patients, using the comet assay. *Mutat Res*, 271:163.
- McKelvey-Martin, V.J., M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo, A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res*, 288:47-63.
- McKelvey-Martin, V.J., E.T. Ho, S.R. McKeown, S.R. Johnston, P.J. McCarthy, N.F. Rajab, C.S. Downes. 1998. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, 13:1-8.
- McKenna, D.J., M. Gallus, S.R. McKeown, C.S. Downes, V.J. McKelvey-Martin. 2003. Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair (Amst)*, 2:879-890.
- McKenna, D.J., S.R. McKeown, V.J. McKelvey-Martin. 2008. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis*, 23:183-190.

- McKeown, S.R., T. Robson, M.E. Price, E.T. Ho, D.G. Hirst, V.J. McKelvey-Martin. 2003. Potential use of the alkaline comet assay as a predictor of bladder tumour response to radiation. *Br J Cancer*, 89:2264-2270.
- McLaren, D.B., T. Pickles, T. Thomson, P.L. Olive. 1997. Impact of nicotinamide on human tumour hypoxic fraction measured using the comet assay. *Radiother Oncol*, 45:175-182.
- McNamee, J.P., J.R. McLean, C.L. Ferrarotto, P.V. Bellier. 2000. Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res*, 466:63-69.
- Migliore, L., R. Colognato, A. Naccarati, E. Bergamaschi. 2006. Relationship between genotoxicity biomarkers in somatic and germ cells: findings from a biomonitoring study. *Mutagenesis*, 21:149-152.
- Moneef, M.A., B.T. Sherwood, K.J. Bowman, R.C. Kockelbergh, R.P. Symonds, W.P. Steward, J.K. Mellon, G.D. Jones. 2003. Measurements using the alkaline comet assay predict bladder cancer cell radiosensitivity. *Br J Cancer*, 89:2271-2276.
- Mórocz, M., J. Kálmán, A. Juhász, I. Sinkó, A.P. McGlynn, C.S. Downes, Z. Janka, I. Raskó. 2002. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 23:47-53.
- Møller, P. 2005. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96:1-42.
- Møller, P. 2006a. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Pharmacol. Toxicol*, 98:336-345.
- Møller, P. 2006b. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA. *Mutat Res*, 612:84-104.
- Møller, P., S. Loft. 2002. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr*, 76:303-310.

- Møller, P., L.E. Knudsen, S. Loft, H. Wallin. 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 9:1005-1015.
- Müller, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66:84-87.
- Murli, H., S.M. Galloway, J.L. Ivett, D.M. Parry, J.J. Mulvihill. 1987 Baseline and mutagen-induced sister-chromatid exchanges in cultures of human whole blood and purified fresh or frozen lymphocytes. *Mutat Res*, 180:101-108.
- Nacci, D.E., S. Cayula, E. Jackim. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, 35:197-210.
- Nakajima, M., T. Takeuchi, K. Morimoto. 1996. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine in human cells under oxygen-free conditions. *Carcinogenesis*, 17:787-791.
- Nascimbeni, B., M.O. Phillips, D.K. Croom, P.W. Andrews, R.R. Tice. 1991. Evaluation of DNA damage in golden mice (*Ochrotomys nuttalli*) inhabiting a hazardous waste site. *Environ Mol Mutagen*, 17:55.
- Natarajan, A.T., P.C. Kesavan. 2005. Cytogenetic for dosimetry in cases of radiation accidents and assessing the safety or irradiated food material. *Current Science*, 89:369-365.
- Norimura, T., V.M. Maher, J.J. McCormick. 1990 A quantitative assay for measuring the induction of mutations in human peripheral blood T-lymphocytes. *Mutat Res*, 230:101-109.
- Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm. 1993. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis*, 8:519-525.
- NRC. 2006. National Research Council. Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants. *Human Biomonitoring for Environmental*

Chemicals. www.nap.edu/catalog/11700.html,

<http://www8.nationalacademies.org/cp/projectview.aspx?key=1255>.

- O'Donovan, M.R., S. Johns, P. Wilcox. 1995. The effect of PHA stimulation on lymphocyte sub-populations in whole-blood cultures. *Mutagenesis*, 10:371-374.
- Olive, P.L. 1989. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*, 117:79-92.
- Olive, P.L. 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int J Radiat Biol*, 75:395-405.
- Olive, P.L. 2002. The comet assay: An overview of techniques. *Methods in Molecular Biology*, 203:179-194.
- Olive, P.L. 2009. Impact of the comet assay in radiobiology. *Mutat Res*, 681:13-23.
- Olive, P.L., J.P. Banáth. 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res*, 294:275-283.
- Olive, P.L., J.P. Banáth. 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.L., J.P. Banáth, R.E. Durand. 1990a. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res.*, 22:86-94.
- Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand. 1990b. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J Nat Cancer Inst*, 82:779-783.

- Olive, P.L., D. Wlodek, J.P. Banáth. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*, 51:4671-4676.
- Olive, P.L., R.E. Durand, J. Le Riche, I.A. Olivotto, S.M. Jackson. 1993. Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res*, 53:733-736.
- Olive, P.L., J.P. Banáth, H.S. MacPhail. 1994. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res*, 54:3939-3946.
- Olive, P.L., T. Trotter, J.P. Banáth, S.M. Jackson, J. Le Riche. 1996. Heterogeneity in human tumour hypoxic fraction using the comet assay. *Br J Cancer Suppl*, 27:S191-195.
- Olive, P.L., M.R. Horsman, C. Grau, J. Overgaard. 1997. Detection of hypoxic cells in a C3H mouse mammary carcinoma using the comet assay. *Br J Cancer*, 76:694-699.
- Olive, P.L., J.P. Banáth, C. Aquino-Parsons. 2001. Measuring hypoxia in solid tumours—is there a gold standard? *Acta Oncol*, 40:917-923.
- Olliver, J.R., L.J. Hardie, Y. Gong, S. Dexter, D. Chalmers, K.M. Harris, C.P. Wild. 2005. Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14:620-625.
- O'Neill, K.L., D.W. Fairbairn, M.D. Standing. 1993. Analysis of single-cell gel electrophoresis using laser-scanning microscopy. *Mutat Res*, 319:129-134.
- Östling O., K.J. Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123:291-298.
- Östling, O., K.J. Johanson. 1987. Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 52:683-691.

- Östling, O., K.J. Johanson, E. Blomquist, E. Hagelqvist. 1987. DNA damage in clinical radiation therapy studied by microelectrophoresis in single tumour cells. A preliminary report. *Acta Oncol*, 26:45-48.
- Palyvoda, O., J. Polanska, A. Wygoda, J. Rzeszowska-Wolny. 2003. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol*, 50:181-190.
- Pfuhler, S., H.U. Wolf. 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 27:196-201.
- Pinhal, D., A.M. Gontijo, V.A. Reyes, D.M. Salvadori. 2006. Viable human buccal mucosa cells do not yield typical nucleoids: impacts on the single-cell gel electrophoresis/Comet assay. *Environ Mol Mutagen*, 47:117-126.
- Piperakis, S.M. 2009. Comet assay: a brief history. *Cell Biol Toxicol*, 25:1-3.
- Pitozzi, V., S. Pallotta, M. Balzi, M. Bucciolini, A. Becciolini, P. Dolara, L. Giovannelli. 2006. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. *Free Radic Res*, 40:1149-1154.
- Plappert, U., E. Barthel, K. Raddatz, H.J. Seidel. 1994. Early effects of benzene exposure in mice. Hematological versus genotoxic effects. *Arch Toxicol*, 68:284-290.
- Pluth, J.M., M.J. Ramsey, J.D. Tucker. 2000. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res*, 465:101-111.
- Polge, C., A.U. Smith, A.S. Parkes. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:666.
- Pool-Zobel, B.L., R.G. Klein, U.M. Liegibel, F. Kuchenmeister, S. Weber, P. Schmezer. 1992. Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague-Dawley rats. *Clin Investig*, 70:299-306.

- Pool-Zobel, B.L., N. Lotzmann, M. Knoll, F. Kuchenmeister, R. Lambertz, U. Leucht, H.G. Schröder, P. Schmezer. 1994. Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen*, 24:23-45.
- Pool-Zobel, BL, A. Bub, H. Müller, I. Wollowski, G. Rechkemmer. 1997. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18:1847-1850.
- Pool-Zobel, B.L., I. Dornacher, R. Lambertz, M. Knoll, H.K. Seitz. 2004. Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res*, 551:127-134.
- Ralph, S., M. Petras. 1997. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environ Mol Mutagen*, 29:418-430.
- Rao, G.V., G.S. Kumar, Y.R. Ahuja. 1997. Single cell gel electrophoresis on peripheral blood leukocytes of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 26:377-380.
- Ravanat, J.L., R.J. Turesky, E. Gremaud, L.J. Trudel, R.H. Stadler. 1995. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography–mass spectrometry and HPLC–electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography–mass spectrometry assay. *Chem Res Toxicol*, 8:1039-1045.
- Rekhadevi, P.V., M. Mahboob, M.F. Rahman, P. Grover. 2009. Genetic damage in wood dust-exposed workers. *Mutagenesis*, 24:59-65.
- Rojas, E., M. Valverde, M. Sordo, P. Ostrosky-Wegman. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 370:115-120.

- Rojas, E., M.C. Lopez, M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 722:225-254.
- Rojas, E., M. Valverde, M.C. Lopez, I. Naufal, I. Sanchez, P. Bizarro, I. Lopez, T.I. Fortoul, P. Ostrosky-Wegman. 2000. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 468:11-17.
- Rombaldi, F., C. Cassini, M. Salvador, J. Saffi, B., Erdtmann. 2009. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis*, 24:143-148.
- Roots, R., W. Holley, A. Chatterjee, E. Rachal, G. Kraft. 1989. The influence of radiation quality on the formation of DNA breaks. *Adv Space Res*, 9:45-55.
- Roti Roti, J.L., W.D. Wright. 1987. Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry*, 8:461-467
- Rundell, M.S., E.D. Wagner, M.J. Plewa. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation?. *Environ Mol Mutagen*, 42:61-67.
- Rundell, M.S., E.D. Wagner, M.J. Plewa. 2003. The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ Mol Mutagen*, 42:61-67.
- Rydberg, B. 1984. Detection of DNA strand breaks in single cells using flow cytometry. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 46:521-527.
- Rydberg, B., K. Johanson. 1978. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt, P.C., E.C. Friedberg, C.F. Fox, (ed). *DNA repair mechanisms*. New York, NY: Academic, 465-468.
- Salagovic, J., J. Gilles, L. Verschaeve, I. Kalina. 1996. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biol (Praha)*, 42:17-21.

- Sánchez, P., R. Peñarroja, F. Gallegos, J.L Bravo, E. Rojas, L. Benítez-Bribiesca. 2004. DNA damage in peripheral lymphocytes of untreated breast cancer patients. *Arch Med Res*, 35:480-483.
- Sánchez, C., M. Clementi, D. Benitez, H. Contreras, C. Huidobro, E. Castellón. 2005. Effect of GnRH analogs on the expression of TrkA and p75 neurotrophin receptors in primary cell cultures from human prostate adenocarcinoma. *Prostate*, 65:195-202.
- Santos, S.J, N.P. Singh, A.T. Natarajan. 1997. Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res*, 232:407-411.
- Sasaki, Y.F., E. Nishidate, F. Izumiyama, N. Matsusaka, S. Tsuda. 1997. Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutat Res*, 391:215-231.
- Sasaki, Y.F., K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, S. Tsuda. 2000. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol*, 30:629-799.
- Schröder, H., A. Heimers. 2002. Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by in vitro and in vivo X-rays. *Mutat Res*, 517:167-172.
- Sergerie, M., G. Bleau, R. Teulé, M. Daudin, L. Bujan. 2005. Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil*, 33:89-101.
- Shaposhnikov, S., V.B. Salenko, G. Brunborg, J. Nygren, A. Collins. 2008. Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments? *Electrophoresis*, 29:3005-3012.
- Shaposhnikov, S., E. Frengen, A. Collins. 2009. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization - a review. *Mutagenesis*, 24:383-389.

- Shibutani, S., M. Takeshita, A.P. Grollman. 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349:431-434.
- Singh, N.P. 1996. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. En: Pfeifer, G.P. (ed). *Technologies for detection of DNA damage and mutation* (New York and London: Plenum Press) 3-23.
- Singh, N.P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslink and apoptosis. *Mutat Res*, 455:111-127.
- Singh, N.P., A. Khan. 1995. Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocytes. *Mutat Res*, 337:9-17.
- Singh, N.P., R.E Stephens. 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res*, 383:167-175.
- Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175:184-191.
- Singh, N.P., R.E. Stephens, E.L. Schneider. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol*, 66:23-28.
- Singh, N.P., H. Lai, A. Khan. 1995. Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat Res*, 345:191-196.
- Singh, N.P., R.E. Stephens, H. Singh, H. Lai. 1999. Visual quantification of DNA double-strand breaks in bacteria. *Mutat Res*, 429:159-168.
- Singh, N.P., C.E. Ogburn, N.S. Wolf, G. van Belle, G.M. Martin. 2001. DNA double-strand breaks in mouse kidney cells with age. *Biogerontology*, 2:261-270.

- Smith, C.C., M.R. O'Donovan, E.A. Martin. 2006. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis*, 21:185-190.
- Somorovská, M., E. Jahnová, J. Tulinská, M. Zámečnicková, J. Sarmanová, A. Terenová, L. Vodicková, A. Lísková, B. Vallová, P. Soucek, K. Hemminki, H. Norppa, A. Hirvonen, A.D. Tate, L. Fuortes, M. Dusinská, P. Vodicka. 1999a. Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant. *Mutat Res*, 428:255-269.
- Somorovská, M., E. Szabová, P. Vodicka, J. Tulinská, M. Barancoková, R. Fábry, A. Lísková, Z. Riegerová, H. Petrovská, J. Kubová, K. Rausová, M. Dusinská, A.R. Collins. 1999b. Biomonitoring of genotoxic risk in workers in a rubber factory: comparison of the Comet assay with cytogenetic methods and immunology. *Mutat Res*, 445:181-192.
- Spanswick, V.J., J.M. Hartley, T.H. Ward, J.A. Hartley. 1999. Measurement of drug-induced DNA interstrand crosslinking using the single-cell electrophoresis (comet) assay. En: *Methods in Molecular Medicine*, 28: Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms, edited by: R. Brown and U. Böger-Brown. Human Press. Inc., Totowa, NJ. 143-154.
- Speit, G., A. Hartmann. 2006. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*, 314:275-286.
- Speit, G., T. Witton-Davies, W. Heepchantree, K. Trenz, H. Hoffmann. 2003. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res*, 542:33-42.
- Stocker, R., B.N. Ames. 1987. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipids peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8130-8134.
- Strauss, G.H. 1991. Non-random cell killing in cryopreservation: implications for performance of the battery of leukocyte tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat Res*, 252:1-15.

- Strauss, G.H., W.P. Peters, R.B. Everson. 1994. Measuring DNA damage in individual cells of heterogeneous mixtures: a novel application of an immunological typing technique. *Mutat Res*, 304:211-216.
- Surrallés, J., A. Creus, J. Catalán, H. Norppa, R. Marcos, N. Xamena. 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. *Mutat. Res*, 341:169-184.
- Szeto, Y.T., I.F. Benzie, A.R. Collins, S.W. Choi, C.Y. Cheng, C.M. Yow, M.M. Tse. 2005. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res*, 578:371-381.
- Terris, D.J., E.Y. Ho, H.Z. Ibrahim, M.J. Dorie, M.S. Kovacs, O.T. Le, A.C. Koong, H.A. Pinto, J.M. Brown. 2002. Estimating DNA repair by sequential evaluation of head and neck tumor radiation sensitivity using the comet assay. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 128:698-702.
- Tice, R.R. 1995. The single cell gel/ Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair individual cells. 315-339. En: Phillips, D.H & S. Venitt (eds.). *Environmental Mutagenesis*. Bios Scientific, Oxford, Inglaterra.
- Tice, R.R., G.H. Strauss. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells*, 13:207-214.
- Tice, R.R., G.H. Strauss, W.P. Peters. 1992. High-dose combination alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res*, 271:101-113.
- Tice, R.R., M. Furedi-Machacek, D. Satterfield, A. Udumudi, M. Vasquez, J.K. Dunnick. 1998. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenic female mice heterozygous for the p53 gene. *Environ Mol Mutagen*, 31:113-124.

- Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 35:206-221.
- Torbergesen, A.C., A.R. Collins. 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr*, 39:80-85.
- Tursi, F., M. Samaia, M. Salmona, G. Belvedere. 1983. Styrene oxidation to styrene oxide in human erythrocytes is catalyzed by oxyhaemoglobin. *Experientia*, 39: 593-594.
- Twardella, D., J. Chang-Claude. 2002. Studies on radiosensitivity from an epidemiological point of view - overview of methods and results. *Radiother Oncol*, 62:249-260.
- Vaghef, H., P. Nygren, C. Edling, J. Bergh, B. Hellman. 1997. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutat Res*, 395:127-138.
- Venkateswarlu, D., J. Leszczynski. 1998. Tautomeric equilibria in 8-oxopurines: implications for mutagenicity. *J Comput Aided Mol Des*, 12:373-382.
- Vijayalaxmi, G.H. Strauss, R.R. Tice. 1993. An analysis of gamma-ray-induced DNA damage in human blood leukocytes, lymphocytes and granulocytes. *Mutat Res*, 292:123-128.
- Vilhar, B. 2004. Help! There is a comet in my computer! A dummy's guide to image analysis used in the comet assay. University of Ljubljana, <http://www.botanika.biologija.org/exp/comet/Comet-principles.pdf>
- Vinson, J.A. 2006. Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology*, 13:151-162.

- Visvardis, E.E., A.M. Tassiou, S.M. Piperakis. 1997 Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and gamma-irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat Res*, 383:71-80.
- Vodicka, P., R. Kumar, R. Stetina, L. Musak, P. Soucek, V. Haufroid, M. Sasiadek, L. Vodickova, A. Naccarati, J. Sedikova, S. Sanyal, M. Kuricova, V. Brsiak, H. Norppa, J. Buchancova, K. Hemminki. 2004a. Markers of individual susceptibility and DNA repair rate in workers exposed to xenobiotics in a tire plant. *Environ Mol Mutagen*, 44:283-292.
- Vodicka, P., J. Tuimala, R. Stetina, R. Kumar, P. Manini, A. Naccarati, L. Maestri, L. Vodickova, M. Kuricova, H. Järventaus, Z. Majvaldova, A. Hirvonen, M. Imbriani, A. Mutti, L. Migliore, H. Norppa, K. Hemminki. 2004b. Cytogenetic markers, DNA single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers. *Environ Health Perspect*, 112:867-871.
- Von Sonntag, C. 1987. *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor y Francis, London.
- Walter, Z., M. Szostek, D. Węglarska, D. Raguszevska, M. Jabłonski, F. Lorenz, A.B. Skotnicki. 1999. Methods for freezing, thawing and viability estimation of hemopoietic stem cells. *Przegl Lek*, 56:34-39.
- Wiklund, S.J., E. Agurell. 2003. Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay. *Mutagenesis*, 18:167-175.
- Wilhelm, M., U. Ewers, J. Wittsiepe, P. Fürst, J. Hölzer, G. Eberwein, J. Angerer, B. Marczynski, U. Ranft. 2007. Human biomonitoring studies in North Rhine-Westphalia, Germany. *Int J Hyg Environ Health*, 210:307-318.
- Williams, J.R., J.B. Little, W.U. Shipley. 1974. Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature*, 252:754-755.

- Wiseman, H., B. Halliwell. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313:17-29.
- Wojewódzka, M., M. Kruszewski, T. Iwaneňko, A.R. Collins, I. Szumiel. 1998. Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation. I. Strand breakage. *Mutat Res*, 416:21-35.
- Wong, W.C., Y.T. Szeto, A.R. Collins. 2005. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Cur Top Nutraceutical Res*, 3:1-14.
- Wood, M.L., M. Dizdaroglu, E. Gajewski, J.M. Essigmann. 1990. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, 29:7024-7032.
- Yant, W.P., H.H. Schrenk, R.R Sayers, A.A Howarth, W.A. Reinhart. 1936. Urine sulfate determination as a measure of benzene exposure. *J Ind Hyg Toxicol*, 18:69.
- Yu, T., S.H. MacPhail, J.P. Banáth, D. Klovov, P.L. Olive. 2006. Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair (Amst)*, 5:935-946.
- Zhang, H., M.R. Spitz, G.E. Tomlinson, M.B. Schabath, J.D. Minna, X. Wu. 2002. Modification of lung cancer susceptibility by green tea extract as measured by the comet assay. *Cancer Detect Prev*, 26:411-418.
- Zhu, C.O., T.H. Lam, C.O. Jiang, B.X. Wei, O.R. Xu, Y.H. Chen. 2000. Increased lymphocyte DNA strand breaks in rubber workers. *Mutat Res*, 470:201-209.
- Zielhuis, R.L. 1984. Recent and potential advances applicable to the protection of workers' health-biological monitoring. II. En: Berling, A., R.E. Yodaiken, B.A. Henman (Eds.), *Assessment of toxic agents at the workplace-roles of ambient and biological monitoring*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston.

ANEXOS

ANEXO I. Obtención de células para la realización del ensayo del cometa *in vivo* e *in vitro*.

El ensayo del cometa puede ser aplicado a cualquier tipo de célula eucariótica, aunque Singh et al. (1999) también obtuvieron resultados positivos utilizando bacterias. Sin embargo, un requisito indispensable para llevar a cabo el ensayo es que las células a analizar estén individualizadas. Estas pueden ser obtenidas tanto de cultivos celulares para ensayos *in vitro*, como de fluidos y/o tejidos de organismos vivos. La existencia de una amplia gama de metodologías para la obtención de células aisladas ha sido bien documentada; sin embargo, no todas han sido igualmente eficientes considerando que un requisito básico para la obtención de material biológico, destinado al ensayo del cometa, es que se debe evitar al máximo tanto la inducción de daño como la posterior reparación del mismo (Plappert *et al.*, 1994; Pool-Zobel *et al.*, 1994).

1. Evaluaciones *in vitro*

Las condiciones experimentales *in vitro* que se deben emplear para demostrar la capacidad de un agente potencialmente genotóxico no son limitadas, pero para demostrar lo contrario, la ausencia de capacidad genotóxica de un agente sospechoso, sí lo son. Las condiciones experimentales que deben emplearse utilizando el ensayo del cometa, en principio no deben diferir de aquellas utilizadas en cualquier otro ensayo de genotoxicidad *in vitro*, excepto que el muestreo celular podría realizarse solamente al final del periodo de exposición.

Los requerimientos que aquí se plantean para la realización de ensayos *in vitro* han sido tomados de Tice *et al.* (2000), y siguen los acuerdos establecidos por el panel de expertos que han elaborado la guía actual de la OCDE para la evaluación de productos químicos.

A modo de consideraciones iniciales, aclararemos que un ensayo *in vitro* requiere de una fuente exógena de activación metabólica (*e.g.*, fracción S9), que no reproduce completamente lo que ocurriría *in vivo*. Durante el ensayo del cometa, se debe poner especial atención en impedir las condiciones que pueda conducir a resultados positivos que no reflejen genotoxicidad, pero que pueda generar daño en el DNA debido a la citotoxicidad (Williams *et al.* 1974; Elia *et al.*, 1994). Para realizar una correcta evaluación se deben tener en cuenta numerosos aspectos, como los que se citan a continuación.

1.1. Tipos de células

Teóricamente, cualquier tipo de célula eucariota puede ser analizada con el ensayo del cometa (con excepción de las células sanguíneas de la línea roja, que carecen de núcleo); sin embargo, para la mayoría de propósitos en genética toxicológica se prefieren líneas celulares bien caracterizadas o cultivos primarios. Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentran la del linfoma de ratón L5178Y así como células de ovario y de pulmón de hámster chino. Entre los cultivos primarios, se encuentran los linfocitos humanos y los hepatocitos de ratón. No se han establecido preferencias entre células proliferativas y no proliferativas, sin embargo estas últimas pueden ser menos propensas a dar falsos positivos, potencialmente asociados a los agentes que intervienen sobre la síntesis de DNA por medio de la alteración del metabolismo; si bien este tema aún no ha sido resuelto. Por último, el uso de cualquier tipo celular ha de ser debidamente justificado.

1.2. Condiciones de cultivo y de preparación

Para mantener células en buen estado, el medio y las condiciones de cultivo deben ser apropiados (frascos o placas, concentración de CO₂, temperatura y humedad). No existen estándares de las condiciones óptimas de un cultivo, ya que dependen del tipo celular que se utiliza; sin embargo, cualquiera que sea la línea celular elegida, habrá de ser rutinariamente

examinada de contaminaciones de micoplasma ya que, en estas condiciones, las células no deben ser utilizadas.

Para líneas celulares establecidas, las células son propagadas desde un patrón fiable e incubadas en un medio de cultivo apropiado que proporcione todos los requerimientos de la célula y se han de mantener a 37 °C. Generalmente, un medio completo debe contener medio de cultivo (los más utilizados son RPMI 1640, MEM y DMEM), suero fetal bovino, antibióticos (penicilina, estreptomycin) y aminoácidos no esenciales si se requieren (*L*-glutamina).

1.3. Activación metabólica

Las células deben ser expuestas al agente que se quiere evaluar con y sin sistema de activación metabólica. El sistema más comúnmente utilizado es la fracción S9 obtenida de hígado de ratas tratadas con agentes inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (Ames *et al.*, 1975) o una mezcla de fenobarbital y β -naftoflavona (Matsushima *et al.*, 1976). Normalmente, también se utiliza una fracción postmitocondrial suplementada con cofactores a concentraciones que van del 1% al 10% v/v de la concentración final en el medio. Las condiciones del proceso de activación metabólica dependen del tipo de agente que se quiera evaluar; así, en algunos casos se recomienda utilizar más de una concentración de S9. La construcción de algunas líneas celulares mediante ingeniería genética, que expresan enzimas activadoras específicas y que proveen de una potencial activación endógena, puede proporcionar una alternativa al empleo de la fracción S9.

1.4. Preparación del agente a evaluar

Las sustancias a evaluar en estado sólido deben ser disueltas o suspendidas en disolventes o vehículos apropiados y, si procede, deben ser diluidas con antelación al tratamiento de las células. Las sustancias en estado líquido pueden ser añadidas directamente al sistema de evaluación y/o diluidas con antelación al tratamiento. Las preparaciones de los agentes a evaluar, independientemente de su naturaleza, deben ser utilizadas en condiciones

frescas, a menos que su estabilidad a lo largo del tiempo haya sido demostrada y se hayan descrito condiciones óptimas para su conservación. No está de más aclarar que los solventes o vehículos utilizados no deben reaccionar ni con el agente en cuestión ni con la célula, y debe ser compatibles con el proceso de activación metabólica. Si se conoce poco del disolvente que se quiere emplear, se debe justificar su utilización incluyendo datos de compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda el uso de un disolvente acuoso, en el caso que el agente sea inestable en este medio, se debe utilizar un agente orgánico libre de agua.

1.5. Concentraciones de exposición

Los acuerdos alcanzados por el panel de expertos en la materia, establecen que los cultivos celulares que crecen en suspensión o en monocapas, deben ser expuestos con y sin sistema de activación metabólica durante 3 a 6 horas. Las exposiciones de duración diferente deben ser justificadas cuando se obtienen datos negativos. Debido a que un nivel de daño elevado en el DNA está asociado a la muerte celular, es crítico que las dosis más altas del agente en cuestión no induzcan una citotoxicidad excesiva, debiendo ésta ser evaluada rutinariamente en cada ensayo; además, esto es de utilidad para determinar el rango experimental en los estudios preliminares. Los métodos para determinar la citotoxicidad pueden ser aplicados finalizada la exposición (*e.g.*, exclusión por tinción vital) o durante una exposición prolongada (*e.g.*, recuento celular, niveles de ATP). Cuando se evalúa la viabilidad en el momento que la exposición ha finalizado, se deben evitar las dosis que han disminuido la viabilidad en más de un 30% en comparación con el control. Además, si con algunas concentraciones o dosis se observan cambios excesivos en el pH o en la osmolaridad, éstas no pueden ser evaluadas mediante el ensayo del cometa, ya que conducen a resultados falsos positivos, así como en los casos de las evaluaciones de daño cromosómico o mutaciones que, bajo estas condiciones, tampoco es recomendable su evaluación. Los investigadores deben especificar adecuadamente tanto la selección de las dosis utilizadas como los resultados de citotoxicidad. Cada ensayo del cometa *in vitro* debe contener, al menos, tres concentraciones analizables y, si durante la elección de las concentraciones se

detecta alguna que es citotóxica, se debe establecer un rango de concentraciones en torno a la misma que va desde la mayor concentración citotóxica aceptable a una menor o no tóxica. Para compuestos prácticamente no tóxicos, la concentración máxima debería ser de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 5 mg/mL o 0,01 M, cualquiera que sea la concentración mínima. Para sustancias relativamente insolubles y que, además, no sean tóxicas a concentraciones más bajas que la concentración a la cual no se disuelven, la máxima concentración a utilizar es aquella que se encuentra justo por encima del límite de solubilidad en el medio de cultivo al finalizar el periodo de exposición. En algunos casos (*e.g.*, cuando la toxicidad ocurre sólo a concentraciones más altas que aquella a la cual el agente es insoluble), es aconsejable evaluar más de una concentración con evidente precipitación. Esto puede ser útil para evaluar la solubilidad del agente antes y después de poner en marcha el ensayo, ya que la solubilidad puede variar durante el curso de la exposición debido a la presencia celular, al factor S9, al suero, etc. La insolubilidad se puede evaluar a simple vista y el precipitado no debería interferir en la realización satisfactoria del estudio.

1.6. Controles

Usualmente deben ser incluidos en cada experimento controles positivos y negativos, ambos con y sin activación metabólica. Cuando se utiliza activación metabólica, el control positivo debe ser el único que requiera de activación antes de inducir el daño en el DNA. Los niveles de migración inducidos en el DNA no siempre serán tan obvios como para que el investigador pueda identificarlos en el momento de la visualización. Algunos ejemplos de sustancias utilizadas como controles positivos en experimentos sin activación metabólica son el metil metasulfonato (MMS), el etil metasulfonato (EMS), la etilnitrosourea (ENU) y la 4-nitroquinolina-N-óxido (4-NQO). Algunos ejemplos de controles positivos utilizados en experimentos con activación metabólica son el benzo(α)pireno, la 7,12-dimetilbenzatraccina y la ciclofosfamida (monohidrato). Los controles negativos consisten en incluir el disolvente o vehículo utilizado en el medio de tratamiento y se debe proceder de la misma manera que en los tratamientos con el agente. Los controles no tratados también deben ser

incluidos en experimentos donde el vehículo o disolvente utilizado no tenga antecedentes de ser genotóxico o citotóxico. Según lo acordado por el panel de expertos, al menos se han de establecer dos cultivos por concentración que puedan ser evaluados satisfactoriamente, incluyendo los grupos de controles negativos y positivos. Los agentes gaseosos o volátiles deben ser evaluados utilizando métodos apropiados tales como frascos de cultivos sellados.

2. Evaluaciones *in vivo*

El ensayo del cometa ha contribuido enormemente tanto en las investigaciones en genética toxicológica como en sus numerosas aplicaciones *in vivo*. Debido a que una de sus ventajas más relevantes es la utilización de un número pequeño de células, literalmente cualquier tipo de célula o tejido puede ser analizado, con un único requerimiento que es el estado individual de las células a analizar. Un buen método de individualización de células es aquel que no contribuye ni al daño adicional en el DNA ni estimula la reparación del mismo. Los requerimientos que aquí se plantean para la realización de ensayos *in vivo* han sido tomados de Tice *et al.* (2000), y están basados en los acuerdos establecidos por el panel de expertos de la OCDE.

A modo de consideraciones iniciales, conviene aclarar que no es apropiada la utilización del ensayo del cometa cuando se cuenta con evidencias de que el agente a evaluar no alcanzará el tejido blanco durante el tratamiento. Se ha de tener especial cuidado para evitar las condiciones que puedan conducir a resultados positivos que no se deban a la genotoxicidad del agente, si no que surjan del daño en el DNA (*e.g.*, DSB) asociado a eventos apoptóticos o necróticos. El ensayo del cometa es capaz de detectar numerosas clases de daño con una alta sensibilidad si el método es optimizado. Debido a que la pauta aquí desarrollada describe las condiciones básicas del ensayo aplicado, el método debe ser ajustado específicamente a las condiciones de cada laboratorio con el fin de obtener resultados válidos y reproducibles.

2.1. Mantenimiento y preparación de los animales

Las ratas y los ratones son los animales mayormente utilizados aunque, cualquier otra especie de mamífero puede ser utilizada con la debida justificación. Comúnmente los estabularios de los laboratorios cuentan con cepas de animales adultos jóvenes, de buena salud, que son recomendados, siendo las variaciones de peso de animal mínimas y no deben fluctuar en más de un 20% respecto de su peso medio.

Las condiciones de mantenimiento y alimentación deben seguir las regulaciones apropiadas para el uso y cuidado de animales de laboratorio. La temperatura en la sala de experimentación debe ser de $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ y la humedad relativa debe ser de al menos el 30% y, preferiblemente, no sobrepasar el 70%. La iluminación debe ser artificial con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. La alimentación debe estar en concordancia con una dieta convencional de laboratorio y sin limitaciones del agua de bebida. La elección de la dieta puede estar influenciada por la necesidad de asegurar una mezcla adecuada de la misma con el agente a evaluar cuando la administración es por esta vía. Dependiendo del diseño experimental y de los estándares del laboratorio, los animales pueden mantenerse enjaulados individualmente o en pequeños grupos del mismo género.

La elección de los animales debe ser al azar y distribuidos de la misma manera entre el grupo expuesto y el control. Los animales deben tener una identificación única, y mantenidos en sus jaulas por al menos 5 días antes del inicio del experimento, para permitir la aclimatación a las condiciones del laboratorio.

Aunque los mamíferos son los animales más utilizados en los estudios de genotoxicidad, la plasticidad del ensayo del cometa permite ser aplicado a casi cualquier especie animal (Dhawa *et al.*, 2009) **(ANEXO I)**.

2.2. Preparación del agente a evaluar

Los agentes sólidos deben ser disueltos o resuspendidos en un disolvente o vehículo apropiado y posteriormente diluido, si así se requiere, antes de dosificarlo al animal. Los agentes líquidos deben ser directamente administrados o previamente diluidos, si así se requiere. Las preparaciones del agente deben ser frescas, a menos que se haya demostrado su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento adecuado.

El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a los niveles de dosis utilizados y no debe causar sospechas de potenciales reacciones químicas con el compuesto a evaluar. La utilización de disolventes poco conocidos debe estar justificada adjuntando los datos que indican su compatibilidad. El uso de disolventes acuosos debe ser considerado como primera opción.

2.3. Controles

Al igual que los estudios *in vitro*, normalmente deben ser incluidos controles negativos y positivos en cada ensayo *in vivo* realizado independientemente. Con excepción de la aplicación del agente a evaluar, los animales del grupo control deben ser manipulados de manera idéntica a los del grupo tratado. El control positivo debe ser un agente conocido, que produzca migración del DNA cuando es administrado a niveles de exposición a los que se espera un incremento de daño genético. Las dosis deben ser elegidas de manera que los efectos sean evidentes pero que no se permita el reconocimiento de los tratamientos durante la evaluación microscópica del daño. Se acepta que el agente que actúa de control positivo sea administrado de una manera distinta al agente a evaluar y se evalúe sólo una vez, siempre y cuando el resto de los animales tratados sean evaluados durante el mismo periodo de tiempo; no así los controles negativos, que deben ser evaluados cada vez, a menos que se acepte la variabilidad entre animales y sea esto demostrado con datos históricos. En el estudio también se incluyen animales no tratados, a menos que se disponga de información histórica respecto a los controles que demuestre que el disolvente utilizado no produce ningún efecto nocivo ni menos genotóxico.

2.4. Género y cantidad de animales a tratar

La falta de datos concretos, entre y dentro de los laboratorios, con respecto al grado de variabilidad entre animales, entre especies, cepas, género, tejido, momento de muestreo, etc., ha conducido a una amplia discusión sobre el número mínimo de animales por sexo, por grupo de dosis y por momento de muestreo. El panel de expertos propone incluir 4 animales de un mismo género en cada grupo de dosis, para cada momento de muestreo. En algunas situaciones, por ejemplo en un grupo de dosis intermedia, un mínimo de tres animales por género y por grupo de dosis puede ser considerado aceptable, con la debida justificación. En experimentos donde se cuenta con una base de datos históricos significativa que demuestra que, bajo esas condiciones experimentales, la variabilidad entre animales es mínima, es aceptado incluir sólo 2 animales en cada grupo control (positivo y negativo). Los datos históricos deben ser considerados como una información aceptable para la identificación de controles. Por otro lado, si se cuenta con una base de datos relevante con estudios de la misma especie, utilizando la misma ruta de exposición, que demuestra que no existe variabilidad de la citotoxicidad entre machos y hembras, la evaluación de un solo sexo es considerada suficiente. En esta situación, ser macho o hembra no proporciona ninguna ventaja, por lo que la elección del sexo del animal se deja a discreción del investigador; sin embargo, cuando una exposición a productos químicos en humanos es específica en relación al sexo, como por ejemplo algunos agentes farmacéuticos, los experimentos deben ser evaluados en animales del sexo apropiado.

2.5. Dosis: niveles, límite y administración

En situaciones en las que no se conoce la toxicidad del compuesto, se requiere que los experimentos de determinación del rango de dosis de trabajo se realicen en el mismo laboratorio, utilizando la misma especie de animales, cepa, sexo y el mismo régimen de tratamiento que se aplicarán una vez determinado el rango de dosis. La dosis más alta a evaluar se establece como aquella que produce signos de toxicidad tales que, basados en el mismo régimen de dosificación, la dosis inmediatamente más alta produzca mortalidad

o signos inaceptables de toxicidad en el animal, o toxicidad excesiva en el tejido blanco al final del periodo de exposición. Como norma, deben emplearse en cada experimento un mínimo de dos dosis valorables.

Con respecto a la dosis mínima, se recomienda que sea aproximadamente el 50% de la dosis alta. Los agentes que necesitan de una activación a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas o los agentes mitogénicos) pueden considerarse como excepciones a los criterios de selección de dosis y necesitan ser analizados caso a caso.

En consecuencia, con la actual guía OCDE para la evaluación de productos químicos, el límite de dosis para los agentes no tóxicos es de 2.000 mg/Kg de peso para un tratamiento o múltiples tratamientos de 14 días consecutivos, y 1.000 mg/Kg de peso para experimentos que excedan de 14 días consecutivos. Para los casos donde no existe toxicidad específica para el animal o tejido, se acepta la evaluación sólo a la dosis límite. Los niveles de exposición humana previstos pueden indicar la necesidad de utilizar un nivel de dosis más alto que la dosis límite aquí establecida.

El agente a evaluar es administrado usualmente por vía oral, por medio de sonda estomacal, por intubación mediante una cánula adecuada, o por inyección intraperitoneal. El volumen máximo de líquido que puede ser administrado vía sonda estomacal o inyección se basa en el peso del animal. De acuerdo con la guía de la OCDE, el volumen máximo no debe exceder a 20 mL por Kg de peso, debiendo ser justificado el uso de volúmenes superiores. La variabilidad del volumen debe ser minimizada mediante el ajuste de concentración para asegurar el mismo volumen en todas las dosis.

2.6. Selección del tejido blanco

En principio, el ensayo el cometa puede ser aplicado a cualquier tipo de tejido. Según el panel de expertos, en ausencia de información sobre el tejido que actúa el agente a evaluar, el más apropiado es el hígado, seguido por el intestino cuando el primero no muestra resultados de toxicidad positivos pudiendo ser analizados a la vez. Esta selección del tejido blanco está basada en

los estudios de Sasaki *et al.* (2000) quienes evaluaron 163 compuestos carcinogénicos en roedores y 30 no carcinogénicos con el ensayo del cometa a las 3, 8 y 24 horas de exposición, resultando ser el hígado y el colon órganos más sensibles que la vejiga, la médula ósea, el cerebro, el riñón, el pulmón y el estómago.

2.7. Momento del muestreo y obtención de células aisladas

Los datos de los experimentos *in vivo* obtenidos por Sasaki *et al.* (2000) demostraron que el 7% de los agentes que resultaron ser positivos, lo fueron sólo a las 3 horas después del tratamiento; el 3% lo fue a las 8 horas y otro 7% lo fue sólo a las 24 horas después de la exposición.

Otros estudios *in vivo* utilizando el ensayo del cometa concuerdan con estos resultados, por lo que los acuerdos del panel de expertos basados en estos estudios, establecen 2 momentos en los que se deben recoger muestras y que los más adecuados para hacerlo, son entre las 3 y 6 horas y entre las 22 y 26 horas después de un único tratamiento agudo. Sin embargo, para prevenir la utilización innecesaria de animales, si el primer muestreo arroja resultados positivos, esto puede excluir la necesidad de un segundo muestreo.

Con respecto a la obtención de las células aisladas, el procedimiento más utilizado es someter el tejido a un proceso de tripsinización o a la acción de la colagenasa (Pool-Zobel *et al.*, 1992; Betti *et al.*, 1993), a la disgregación utilizando tijeras pequeñas o a una homogenización para la liberación de los núcleos. Durante la destrucción del tejido el uso de EDTA está permitido como agente quelante de calcio/magnesio y así prevenir la activación de las endonucleasas; también, está permitido añadir agentes que anulen la acción de los radicales, como el DMSO para prevenir el daño en el DNA inducido por la oxidación. Las conclusiones obtenidas, señalan que no existe un método de disgregación celular mejor que otro y que cualquiera de ellos es aceptable, siempre y cuando quede demostrado que la metodología elegida no aumenta el nivel de daño en el DNA.

2.8. Citotoxicidad

La evaluación de la citotoxicidad del compuesto es un dato clave a la hora del análisis de los resultados y depende básicamente de la técnica de viabilidad por exclusión que se emplee (*e.g.*, azul de tripan). Sin embargo, la aproximación citada es poco informativa si los procesos de disgregación son mecánicos. Se propone la utilización de una tinción dual que contiene diacetato de 5-6-carboxifluoresceína, mezclado con bromuro de etidio (Strauss, 1991), que identifica las células metabólicamente competentes y/o la integridad de la membrana. Otras aproximaciones también han sido utilizadas para evaluar la citotoxicidad; así, Sasaki *et al.* (1997) evaluaron mediante histopatología la incidencia de células apoptóticas o necróticas en experimentos que mostraron ser positivos en el ensayo del cometa. Aunque la validación de los estudios no ha identificado niveles de toxicidad aceptables para el ensayo del cometa con tratamientos *in vivo*, una viabilidad menor del 70-80% de las células en el tejido blanco del animal control debe ser considerada como elevada.

ANEXO II: Tabla que resume los estudios de valoración de daño del DNA utilizando el ensayo del cometa aplicado en diversas áreas (biomonitorización ambiental y humana) utilizando organismos centinelas procariotas (bacterias) y eucariotas (desde protozoos hasta humanos). Se indica el modelo utilizado en cada caso, el agente de interés, el tipo celular, los resultados y la referencia de cada uno de los estudios aquí detallados (Tomado de: Dhawan y Bajpayee, 2009).

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Bacteria				
<i>Escherichia coli</i> JM101	X-rays	Whole organism <i>in vivo</i>	↑	Singh <i>et al.</i> , 1999
Plant models				
<i>Euglena gracilis</i>	1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG), benzo[<i>a</i>]pyrene, mitomycin C and actinomycin D	Whole organism <i>in vivo</i>	↑	Aoyama <i>et al.</i> , 2003
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4-Mitroquinoline-1-oxide (4-NQO), <i>N</i> -nitrosodimethylamine, and hydrogen peroxide	Whole organism <i>in vivo</i>	↑	Erbes <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhodomonas</i>	UV (UVA + UVB) radiation	Whole organism <i>in vivo</i>	↑	Sastre <i>et al.</i> , 2001
<i>Vicia faba</i>	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU) and methyl methanesulfonate (MMS)	Root tip meristematic cells	↑	Gichner and Plewa 1998
Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L)	Ethyl methanesulfonate	Nuclei from leaf tissue	↑	Gichner and Plewa 1998
	Age	Leaf nuclei		Koppen <i>et al.</i> , 1999
	Kinetics of DNA repair	Leaf nuclei		Gichner <i>et al.</i> , 2000
	Ethyl methanesulphonate (EMS) and <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosourea (ENU)	Whole roots <i>in vivo</i>	↑	Gichner, 1999; 2003
	<i>O</i> -phenylenediamine (<i>o</i> -PDA), hydrogen peroxide and ethyl methanesulphonate (EMS)	Isolated root nuclei	–	Gichner, 2003
	Heavy metal (Cd, Cu, Pb, and Zn)	Leaf nuclei	↑	Gichner <i>et al.</i> , 2006
	Polychlorinated biphenyls		↑	Gichner <i>et al.</i> , 2007
Potato plants (<i>Solanum tuberosum</i> var. <i>Korela</i>)	Heavy metal (Cd, Cu, Pb, and Zn)	Nuclei from leaf tissue	↑	Gichner <i>et al.</i> , 2006
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Uranium	Root or shoot cells	–	Vandenhove <i>et al.</i> , 2006
<i>Impatiens balsamina</i>	Cr ⁺⁶ and airborne particulate	Stem, root and leaves.	↑	Poli <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacopa monnieri</i> L.	Ethyl methanesulfonate, methyl methanesulfonate cadmium	Nuclei isolated from roots and leaves	↑ Dose- and time-dependent roots > leaves	Vajpayee <i>et al.</i> , 2006

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Animal models				
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Phenol, hydrogen peroxide, and formaldehyde, influent and effluent water samples	Whole animal <i>in vivo</i>	↑	Lah <i>et al.</i> , 2004
Invertebrates				
Bivalves				
Freshwater bivalve zebra mussel (<i>Dreissena polymorpha</i>)	Polybrominated diphenyl ethers (pbdes)	Hemocytes	↑↑	Riva <i>et al.</i> , 2007
	Sodium hypochlorite and chlorine dioxide) and peracetic acid		↑	Bolognesi <i>et al.</i> , 2004
	Pentachlorophenol		↑	Pavlica <i>et al.</i> , 2001
	Varying temperatures		↑	Buschini <i>et al.</i> , 2003
	Polluted waters		↑	Klobucar <i>et al.</i> , 2003
<i>Mytilus edulis</i>	Cadmium (Cd) and chromium (Cr)	Gills	–	Pruski and Dixon, 2002
	Styrene	Haemolymph cells	↑	Mamaca <i>et al.</i> , 2005
	Tritium	Haemocytes	↑	Jha <i>et al.</i> , 2005
	Marine waters (Denmark), French Atlantic Coast	Gill and haemolymph	↑	Rank and Jensen, 2003; Akcha <i>et al.</i> , 2003
	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Gill and haemocytes	↑	Large <i>et al.</i> , 2002
	Seasonal variation	Haemocytes	↑	Shaw <i>et al.</i> , 2000
Freshwater mussels (<i>Unio tumidus</i>)	Polyphenols	Digestive gland cells	↑	Labieniec and Gabryelak, 2006
Golden mussel (<i>Limnoperna fortunei</i>)	Guaiba Basin water	Haemocytes	↑	Villela <i>et al.</i> , 2007
Bivalve mollusc <i>Scapharca inaequivalvis</i>	Organotin compounds (MBTC, DBTC and TBTC)	Erythrocytes	↑	Gabbianelli <i>et al.</i> , 2006
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Environmental stress	Haemocytes	↑	Frenzilli <i>et al.</i> , 2001
	Heavy oil spill	Gills		Laffon <i>et al.</i> , 2006a
	Cadmium	Digestive gland cells		Dailianis <i>et al.</i> , 2005
Vent mussels (<i>Bathymodiolus azoricus</i>)	Hydrostatic pressure change	Haemocytes and gill tissues	↑	Dixon <i>et al.</i> , 2004; Pruski and Dixon, 2003
Green-lipped mussel (<i>Perna viridis</i>)	Benzo[a] pyrene	Haemocytes	↑	Siu <i>et al.</i> , 2004
Freshwater mussel <i>Utterbackia imbecillis</i>	Chemicals used in lawn care (atrazine, glyphosate, carbaryl, and copper)	Glochidia	↑	Conners and Black, 2004
Oyster (<i>Crassostrea gigas</i>)	Cryopreservation	Spermatozoa	↑	Gwo <i>et al.</i> , 2003

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Manila clam (<i>Tapes semidecussatus</i>)	Sediment-bound contaminants	Haemolymph, gill and digestive gland	↑	Coughlan <i>et al.</i> , 2002; Hartl <i>et al.</i> , 2004
Clams (<i>Mya arenaria</i>)	Petroleum hydrocarbons	Haemocytes and digestive gland cells	–	Hamouten <i>et al.</i> , 2002
Earthworms				
<i>Eisenia foetida</i>	Chemical-treated soil	Coelomocytes	↑ Dose-dependant	Verschaeve <i>et al.</i> , 1993
	Soil from coke ovens	Coelomocytes	↑	Salagovic <i>et al.</i> , 1996
	Soil from industrialized contaminated	Coelomocytes	↑	Xiao <i>et al.</i> , 2006
	Sediment from polluted river	Coelomocytes	↑	Rajaguru <i>et al.</i> , 2003
	Wastewater irrigated soil	Coelomocytes	↑	Qiao <i>et al.</i> , 2007
	Commercial parathion	Coelomocytes	↑	Bustos-Obregon and Goicochea, 2002
	Imidacloprid and RH-5849	Sperm cells	↑	Zang <i>et al.</i> , 2000
	PAH-contaminated soil and hydrogen peroxide, cadmium (in vitro)	Eleocytes	↑	Di Marzio <i>et al.</i> , 2005
	Nickel chloride	Coelomocytes	↑	Reinecke and Reinecke, 2004
<i>Aporrectodea longa</i> (Ude)	Soil samples spiked with benzo[a]pyrene (B[a]P) and/or lindane	Intestine and crop/gizzard cells	↑ Intestine > crop	Martin <i>et al.</i> , 2005
Other invertebrates				
Fruitfly (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Ethyl methanesulfonate (EMS), methyl methanesulfonate (MMS), <i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitrosourea (ENU) and cyclophosphamide (CP)	Gut and brain cells of first instar larvae	↑	Siddique <i>et al.</i> , 2005a, b
	Cypermethrin		↑	Mukhopadhyay <i>et al.</i> , 2004
	Lechates of industrial waste		↑	Siddique <i>et al.</i> , 2005b
	Cisplatin		↑	García Sar <i>et al.</i> , 2008
Sea urchins (<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>)	Dispersed crude oil	Coelomocytes	↑ Concentration-dependent	Taban <i>et al.</i> , 2004
Grass shrimp (<i>Palaemonetes pugio</i>)	UV, benzo[a] pyrene, and cadmium	Embryos	↑ Damage and decreased repair	Hook and Lee, 2004
	Estuarine sediments	Hepatopancreas	↑	Lee <i>et al.</i> , 2004
	Coal combustion residues			Kuzmick <i>et al.</i> , 2007

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Sea anemone (<i>Anthopleura elegantissima</i>)	Hydrogen peroxide ethylmethanesulphonate (EMS) or benzo(a)pyrene (B[a]P)	Blood cells	↑ Dose response	Mitchelmore and Hyatt, 2004
Vertebrates				
Fishes				
Chub (<i>Leuciscus cephalus</i>)	PAHs, PCBs, organochlorine pesticides (OCPs), as well as heavy metals	Hepatocytes	↑	Winter <i>et al.</i> , 2004
	Exhaustive exercise	Erythrocytes	↑	Aniagu <i>et al.</i> , 2006
Estuarine mullet (<i>Mugil</i> sp.) and sea catfish (<i>Netuma</i> sp.)	Organochlorine pesticides and heavy metals High temperature	Erythrocytes	↑	de Andrade <i>et al.</i> , 2004a, b
Freshwater teleost fish <i>Mystus vittatus</i>	Endosulfan	Gill, kidney, and erythrocytes	↑ In all cells	Sharma <i>et al.</i> , 2007
Eastern mudminnow (<i>Umbra pygmaea</i> L.)	Rhine water for 11 days	Blood erythrocytes	↑	Alink <i>et al.</i> , 2007
Neotropical fish <i>Prochilodus lineatus</i>	Diesel water soluble fraction acute (6, 24, and 96 h) and subchronic (15 days) exposures	Erythrocytes	↑	Vanzella <i>et al.</i> , 2007
Freshwater goldfish <i>Carassius auratus</i>	Technical herbicide Roundup containing Glyphosate salt	Erythrocytes	↑↑ Dose-dependent	Cavas and Könen, 2007
	ADDB and PBTA-6			Masuda <i>et al.</i> , 2004
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	Sediment collected from polluted sites In Cork Harbour (Ireland)	Hepatocytes	↑	Hartl <i>et al.</i> , 2007
Brazilian flounder <i>Paralichthys orbignyana</i>	Contaminated estuary waters	Blood cells	↑↑	Amado <i>et al.</i> , 2006
Bullheads (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and polychlorinated biphenyl (PCB) polluted waters	Erythrocyte	↑	Pandrangi <i>et al.</i> , 1995
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) and polychlorinated biphenyl (PCB)-polluted waters	Erythrocyte	↑	Pandrangi <i>et al.</i> , 1995
Brown trout (<i>Salmo trutta fario</i>)	PCB77 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl)	Erythrocytes	–	Belpaeme <i>et al.</i> , 1996
Marine flatfish	Ethyl methanesulphate	Blood, gill, liver and kidney	↑ In all tissues	Belpaeme <i>et al.</i> , 1998
Trout <i>Oncorhynchus mykiss</i>	Cryopreservation (Freeze-thawing)	Spermatozoa	Slight increase	Labbe <i>et al.</i> , 2001
European eel (<i>Anguilla anguilla</i>)	Benzo(a)pyrene, Arochlor 1254, 2-3-7-8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone	Erythrocytes	↑	Nigro <i>et al.</i> , 2002
Eelpout (<i>Zoarces viviparus</i>)	Oil spill (PAH)	Nucleated erythrocytes	↑	Frenzilli <i>et al.</i> , 2004

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Gilthead sea bream <i>Sparus aurata</i>	Copper	Erythrocytes	↑↑	Gabbianelli <i>et al.</i> , 2003
Dab (<i>Limanda limanda</i>)	PAHs and PCBs polluted waters of English channel Gender and age	Blood cells	↑ In adults and males	Akcha <i>et al.</i> , 2003
Hornyhead turbot (<i>Pleuronichthys verticalis</i>)	Sediments collected from a natural petroleum seep (pahs)	Liver cells	↑	Roy <i>et al.</i> , 2003
<i>In vitro</i>				
Carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	Organic sediment extracts from the North Sea (Scotland)	Leukocytes	↑	Kammann <i>et al.</i> , 2000
Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Cadmium	Hepatocytes	↑	Risso-de Faverney <i>et al.</i> , 2001
	Oxidative stress and its prevention by	Erythrocytes	↑	Villarini <i>et al.</i> , 1998
	Indolinic and quinolinic nitroxide radicals		↓	
	Tannins		↓	Fedeli <i>et al.</i> , 2004
	Diaryl tellurides and ebselen		↓	Tiano <i>et al.</i> , 2000
Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	Surface waters of German rivers, Rhine and Elbe	Hepatocytes and gill cells	↑	Schnurstein and Braunbeck, 2001
Rainbow trout hepatoma cell line (RTH-149)	Water samples from the polluted Kishon river (Israel)	Liver	↑	Kamer and Rinkevich, 2002
Rainbow trout gonad (RTG-2) cell line liver (RTL-W1) cell line	4-Nitroquinoline- <i>N</i> -oxide <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine, benzo[<i>a</i>]pyrene, nitrofurantoin, 2-acetylaminofluorene, and dimethylnitrosamine, and surface waters	Gonad epitheloid liver	↑ Dose-dependent response	Nehls and Segner, 2005
Amphibians				
Amphibian larvae (<i>Xenopus laevis</i> and <i>Pleurodeles waltl</i>)	Cadmium (CdCl ₂) Captan (<i>N</i> -trichloromethylthio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide)	Erythrocytes	↑ Concentration- and time-dependent	Mouchet <i>et al.</i> , 2007; 2006
Amphibian larva (<i>Xenopus laevis</i>)	Benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate methyl methanesulfonate	Erythrocytes	–	Mouchet <i>et al.</i> , 2005a
	Aqueous extracts of five sediments from French channels		↑	Mouchet <i>et al.</i> , 2005b
Toad (<i>Bufo raddei</i>)	Petrochemical (mainly oil and phenol) polluted area	Liver cells and erythrocytes	↑	Huang <i>et al.</i> , 2007
Toad <i>Xenopus laevis</i> and <i>Xenopus tropicalis</i>	Bleomycin induced DNA damage and repair	Splenic lymphocytes	↑ DNA damage <i>X. tropicalis</i> > <i>X. laevis</i> DNA repair in <i>X. laevis</i> > <i>X. tropicalis</i>	Banner <i>et al.</i> , 2007

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Tadpoles of <i>Rana N. Hallowell</i>	Imidacloprid [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)- <i>N</i> -nitroimidazolidin-2-ylideneamine] and RH-5849 [2'-benzoyl-1'- <i>tert</i> -butylbenzoylhydrazinyl]	Erythrocytes	↑	Feng <i>et al.</i> , 2004
<i>Rana hexadactyla</i> tadpoles	Sulfur dyes (Sandopel Basic Black BHLN, Negrosine, Dermapel Black FNI, and Turquoise Blue) used in the textile and tannery industries	Erythrocytes	↑↑	Rajaguru <i>et al.</i> , 2001
Bullfrog (<i>Rana catesbeiana</i>) tadpoles	Herbicides AAtrex Nine- <i>O</i> (atrazine), Dual-960E (metalochlor), Roundup (glyphosate), Sencor-500F (metribuzin), and Amsol (2,4-d amine)	Erythrocytes	↑↑	Clements <i>et al.</i> , 1997
Tadpole <i>Rana clamitans</i> , <i>Rana pipiens</i>	Agricultural regions industrial regions	Erythrocytes	↑ Industrial regions > agricultural regions	Ralph and Petras, 1997
<i>In vitro</i>				
<i>Xenopus laevis</i>	High peak-power pulsed electromagnetic field	Erythrocytes	↑ Due to rise in temperature	Chemeris <i>et al.</i> , 2004
Birds				
Wild nestling white storks (<i>Ciconia ciconia</i>)	Heavy metals and arsenic	Blood cells	↑ Correlated with arsenic	Baos <i>et al.</i> , 2006
	Toxic acid mining waste rich in heavy metals		↑↑	Pastor <i>et al.</i> , 2001a, b; Pastor <i>et al.</i> , 2004
Black kites (<i>Milvus migrans</i>)	Heavy metals and arsenic	Blood cells	↑ Correlated with copper and cadmium	Baos <i>et al.</i> , 2006
	Toxic acid mining waste rich in heavy metals		↑ (2- to 10-fold)	Pastor <i>et al.</i> , 2001a, b; Pastor <i>et al.</i> , 2004
Turkey	Short term storage	Sperm	↑	Kotłowska <i>et al.</i> , 2007
Chicken	T-2 toxin and deoxynivalenol (DON)	Spleen leukocytes	↑	Frankic <i>et al.</i> , 2006
Chicken	Storage conditions (4°C)	Liver and breast muscle cells	↑ Liver cells > breast muscle cells	Faullimel <i>et al.</i> , 2005
Rodents				
Aldh2 knockout mice	Ethanol	Hepatic cells	↑ Oxidative damage	Kim <i>et al.</i> , 2007
P53(+/-) mice	Melphalan	Liver, bone marrow, peripheral blood and the distal intestine	DNA cross-links in all cells tested	Cordelli <i>et al.</i> , 2004
SKH-1 mice	UV A + Fluoroquinolones (clinafloxacin, lomefloxacin, ciprofloxacin) UVA + 8-methoxypsoralene (8-MOP)	Epidermal cells	↑↑ For fluoroquinolones ↓ for MOP	Wirnitzer <i>et al.</i> , 2006

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Dyslipidemic ApoE(-/-) mice	Ageing Diesel exhaust particles	Aorta, liver, and lung	↑ Oxidative damage in liver; in lung or aorta	Folkmann <i>et al.</i> , 2007a,b
Balb/c mice	Trypanosoma cruzi infection	Peripheral blood, liver, heart, and spleen cells	↑ In heart and spleen	Ribeiro <i>et al.</i> , 2007
CD-1 mice	Lead acetate	Nasal epithelial cells, lung, whole blood, liver, kidney, bone marrow, brain and testes	↑ In all organs on prolonged exposure; in testes	Valverde <i>et al.</i> , 2002
Swiss albino mice	Sanguinarine alkaloid, argemone oil	Blood, bone marrow cells and liver	↑ Dose-dependent in blood and bone marrow	Ansari <i>et al.</i> , 2004, 2005
	Cypermethrin	Brain, liver, kidney, bone marrow, blood, spleen	↑	Patel <i>et al.</i> , 2006
	Steviol	Stomach cells, hepatocytes,	↑	Sekihashi <i>et al.</i> , 2002
		Kidney and testicle cells	-	
	Apomorphine, 8-oxo-apomorphine-semiquinone	Brain cells	↑	Picada <i>et al.</i> , 2003
	Ethanol, grape seed oligomer and polymer procyanidin fractions	Brain cells	↓ Ethanol-induced protection by grape seed	Guo <i>et al.</i> , 2007
Male CBA mice	Pesticide formulations (Bravo and Gesaprim)	Hepatic cells, bone marrow cells spleen cells	↑↑	Zeljezic and Garaj-Vrhovac, 2004
Isogenic mice	Sulfonamide, protozoan parasite Toxoplasma gondii	Peripheral blood cells, liver cells and brain cells	↑ In peripheral blood cells	Ribeiro <i>et al.</i> , 2004
Cirrhotic rats	Rutin and quercetin	Bone marrow cells	↑↑	Da silva <i>et al.</i> , 2002
<i>In vitro</i>				
FE1 Muta Mouse lung epithelial cell line.	Carbon black	Lung epithelial cell line	↑	Jacobsen <i>et al.</i> , 2007
L5178Y mouse lymphoma cells	Ketoprofen, promazine, chlorpromazine, dacarbazine, acridine, lomefloxacin, 8-methoxypsoralen, chlorhexidine, titanium dioxide, octylmethoxycinnamate	Lymphoma cells	Positive with phototoxic compound	Struwe <i>et al.</i> , 2007
Murine primary cultures of brain cells and a continuous cell line of astrocytes	Xanthine/xanthine oxidase, hydrogen peroxide Superoxide dismutase, catalase, or ascorbic acid.	Brain cells	↓ By antioxidants	Cemeli <i>et al.</i> , 2003
Chinese hamster Ovary cell line (CHO)	Endosulfan	Ovary cells	↑	Bajpayee <i>et al.</i> , 2006

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
	Cypermethrin, pendimethalin, dichlorovous			Patel <i>et al.</i> , 2007
Humans				
Clinical				
Breast cancer patients and controls	Radiosensitivity	Peripheral blood mononuclear cells	↑	Djuzenova <i>et al.</i> , 2006
Breast cancer patients and controls	Radiosensitivity	Peripheral blood mononuclear cells	↑ And reduced DNA repair	Popanda <i>et al.</i> , 2003
Normal individuals	Chlorhexidine	Buccal epithelial cells and peripheral blood lymphocytes	↑	Eren <i>et al.</i> , 2002
Transitional cell carcinoma patients and controls	DNA strand breaks	Exfoliated cells extracted from bladder washing	↑ In patients	Mckelvey-Martin <i>et al.</i> , 1997
Axia telangiectasia heterozygote	X-irradiation	Peripheral leukocytes	↑ (three times high) in patients	Djuzenova <i>et al.</i> , 1997
Nijmegen breakage syndrome (NBS) patients	X-irradiation	Peripheral blood mononuclear cells	↑ In patients	Bürger <i>et al.</i> , 2006
Alzheimer disease patients	–	Peripheral blood mononuclear cells	↑ In patients	Migliore <i>et al.</i> , 2005
Breast cancer patients	–	Peripheral blood mononuclear cells	↑ In patients	Sánchez <i>et al.</i> , 2004
Type 2 diabetes mellitus	Oxidative DNA damage	Peripheral blood cells	↑	Pitozzi <i>et al.</i> , 2003
Cancer (testicular cancer, lymphoma and leukemia) patients	DNA integrity	Spermatozoa	Decreased DNA integrity	O'Donovan, 2005
Dietary intervention				
Healthy subjects	Tomato drink	Blood	↓	Porrini <i>et al.</i> , 2005
	Green vegetables	Lymphocytes		Kang <i>et al.</i> , 2004
	Grape juice			Park <i>et al.</i> , 2003
Smokers	Vitamin C supplementation	Blood lymphocyte	↓	Moller <i>et al.</i> , 2004
Technical anesthesiology staff	Vitamin E and vitamin C	Blood lymphocyte	↓ In oxidative damage	Sardas <i>et al.</i> , 2006
Occupational				
Airport personnel	Jet fuel vapors, jet fuel combustion products	Exfoliated buccal cells and lymphocytes	↑	Cavallo <i>et al.</i> , 2006a
Agricultural workers	Pesticides	Lymphocytes	–	Piperakis <i>et al.</i> , 2006
			↑	Zeljezic and Garaj-Vrhovac, 2001; Paz and Miño <i>et al.</i> , 2004
Rubber factory workers	Substances used in the rubber industry	Peripheral blood	↓ In exposed population	Laffón <i>et al.</i> , 2006b

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
Outdoor workers in Mexico cities	Air pollutants	Blood lymphocytes	↑	Tovalin <i>et al.</i> , 2006
Rickshawpullers	Exhaustive exercise	Lymphocytes	↑	Pandey <i>et al.</i> , 2005
Nuclear medicine personnel	Ionizing radiation	Peripheral blood leukocytes	↑	Kopjar <i>et al.</i> , 2005
Workers	Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)	Human T and B lymphocytes and granulocytes	↑ B lymphocytes > T lymphocytes > granulocytes	Sul <i>et al.</i> , 2002
	Benzene in printing	Human T and B lymphocytes and granulocytes	↑	Palus <i>et al.</i> , 2003
	Lead (Pb) and cadmium (Cd)	Peripheral	↑	Chen <i>et al.</i> , 2006
	Asbestos cement plant	Lymphocytes	↑	Dusinská <i>et al.</i> , 2004
	Fenvalerate (FE) exposure	Lymphocytes	↑	Bian <i>et al.</i> , 2004
	Organic solvents	Sperm	↑	Heuser <i>et al.</i> , 2007
		Peripheral blood	↑	
	Coke oven emissions (coe)	Blood lymphocytes		Wang <i>et al.</i> , 2007
	Welders (Cd, Co, Cr, Ni, and Pb)	Lymphocytes		Botta <i>et al.</i> , 2006
	Pesticide formulators (organophosphorus pesticides)	Lymphocytes	↑	Shadnia <i>et al.</i> , 2005
	Copper smelters (Inorganic arsenic)	Leukocytes	↑	Palus <i>et al.</i> , 2005
	Chrome-plating workers (chromium -VI)	Lymphocytes	↑↑	Gambelunghe <i>et al.</i> , 2003
	Workers in foundry and pottery (Silica)	Lymphocytes	↑	Basaran <i>et al.</i> , 2003
Nurses	5-Fluorouracil, cytarabine, gemcitabine, cyclophosphamide, and ifosfamide	Lymphocytes	Slight increase	Ursini <i>et al.</i> , 2006
Lifestyle				
Normal individuals	Endurance exercise	Lymphocytes	↑	Mastaloudis <i>et al.</i> , 2004
Active and passive smokers	Smoking	Lymphocytes	↑	Fracasso <i>et al.</i> , 2006
Normal individuals	Smoking Diet (vegetarian or nonvegetarian)	Lymphocytes	↑	Hoffmann <i>et al.</i> , 2005a, b; Dhawan <i>et al.</i> , 2001; Speit <i>et al.</i> , 2003
Rural Indian women	Biomass fuels	Lymphocytes	↑	Pandey <i>et al.</i> , 2006
Normal individuals	Benzo(a)pyrene, beta-naphthoflavone (BNF)	Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	↑	Annas <i>et al.</i> , 2000

Model	Agent tested	Cell used	DNA damage	Reference
<i>In vitro</i>				
Episkin	UV, Lomefloxacin and UV or 4-nitroquinoline-N-oxide (4NQO) and protection by Mexoryl	Skin fibroblast cells	↑ Reduced by Mexoryl	Flamand <i>et al.</i> , 2006
Sperms	Reproductive toxins	Male germ cells	↑	Shen and Ong, 2000; Fraser 2004
Prostate tissues primary culture	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), its <i>N</i> -hydroxy metabolite (<i>N</i> -OH-PhIP) and benzo[<i>a</i>]pyrene (B[<i>a</i>]P)	Prostrate cells	↑ Dose-related	Martin <i>et al.</i> , 2002
Human keratinocytes	UVA or UVB	Skin cells	↑	Lehmann <i>et al.</i> , 1998
MCF-7 cells	Estradiol	Breast cells	↑ Concentration-dependent	Bajpayee <i>et al.</i> , 2005
JM1 cells	Estradiol	Lymphoblast cells	–	Bajpayee <i>et al.</i> , 2005
HepG2 cells	Endosulfan	Liver cells		Lu <i>et al.</i> , 2000
	Indirect acting genotoxins (cyclophosphamide)			Yusuf <i>et al.</i> , 2000
Mini organ cultures of human inferior nasal turbinate epithelia	Sodium dichromate, <i>N</i> -nitrosodiethylamine (NDEA) and <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitroso-guanidine (MNNG)	Nasal cells	↑ With sodium dichromate and MNNG –with NDEA	Buehrlen <i>et al.</i> , 2007
	Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), benzo[<i>a</i>]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), or <i>N</i> -methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG)		↑ With BPDE and MNNG— with MEHP	Kleinsasser <i>et al.</i> , 2004
Human lymphocytes	Heterocyclic amine and prevention by monomeric and dimeric flavanols and black tea polyphenols	Lymphocyte	↓ In oxidative damage	Dhawan <i>et al.</i> , 2002
	C60 Fullerenes		↑	Dhawan <i>et al.</i> , 2006
	Municipal sludge leachates		↑	Bakare <i>et al.</i> , 2007

↑: significant increase in DNA damage, ↑↑: highly significant increase in DNA damage, ↓: decrease in DNA damage, –: no DNA damage report.

ANEXO III. Preguntas frecuentes sobre el ensayo del cometa**Pregunta 1:**

¿Se necesita utilizar la versión alcalina del ensayo para visualizar SSBs?

No, existen también otros métodos tales como la desnaturalización alcalina. Todos ellos dependen de un pH alto para separar la doble hebra de la molécula de DNA, comenzando por los puntos de roturas. Como la tasa de separación de las hebras dependerá de la frecuencia de roturas, ésta se evalúa como la proporción de SSBs presentes después de cierto periodo de desnaturalización.

Por otra parte, el protocolo original del ensayo del cometa de Östling y Johanson (1984), se describió utilizando pH 10 (pH lo suficientemente neutro para no permitir la desnaturalización de la doble hebra de DNA), y se encontró efecto a bajas dosis de radiación ionizante. El rango de dosis detectable fue muy similar al rango detectable establecido posteriormente por Singh *et al.*, (1988) quienes utilizaron un pH alcalino. La explicación más probable es en términos de la estructura del DNA, los nucleoides (estructuras que permanecen después de una lisis con Tritón X-100 y sal a 2,5 M) que poseen un superenrollamiento en sentido negativo. Las células que no han sido tratadas poseen un DNA superenrollado, muy empaquetado y no presentan migración después de la electroforesis. Así, las células que han sido dañadas, relajan el superenrollamiento de los lazos los cuales son desplazados por la aplicación del campo eléctrico.. Por lo tanto, una única rotura sería suficiente para relajar el superenrollamiento de un lazo. Con esto podemos deducir que tanto la versión neutra como la alcalina de ensayo detectan SSBs y DSBs.

Pregunta 2:

¿La versión neutra del cometa sólo detecta DSB?

No. La respuesta 1 sirve para aclarar esta pregunta, aunque existen versiones especiales del ensayo neutro aplicando una lisis prolongada a una elevada temperatura con o sin proteinasa K, la que aparentemente detecta sólo DSB (Olive *et al.*, 1991). En este caso, probablemente la digestión destruye la matriz nuclear y, por lo tanto, la sujeción de los lazos, por lo que los fragmentos de doble hebra son capaces de migrar de manera convencional.

La formación de colas sin implicar roturas (simples o dobles) es posible en condiciones neutras. La relajación de la torsión con EB (intercalante) a bajas dosis promueve la formación de colas, mientras que altas concentraciones de esta tinción causan la disminución de la cola a medida que se acumulan las torsiones positivas; este efecto no se visualiza en la versión alcalina (Belyaev *et al.*, 1999).

Pregunta 3:

¿Cómo se puede prevenir el desprendimiento de los geles de los portaobjetos?

Asumiendo que se está utilizando el método recomendado para cubrir los portaobjetos con agarosa, no parece recomendable utilizar los portaobjetos *fully frosted* u otros portaobjetos precubiertos obtenidos comercialmente. El desprendimiento de la agarosa de los portaobjetos es un riesgo al que está expuesto cualquiera que, en algún momento, utilice la técnica. Ninguna de las estrategias para impedir el problema parece funcionar ya que en cualquier momento vuelve a ocurrir, lo que es un poco frustrante ya que, parece imposible proponer una solución efectiva. Algunos proponen que los portaobjetos se deben secar a temperatura ambiente en lugar de someterlos a altas temperaturas. Otros opinan que la humedad no proporciona una buena adherencia de los geles. Otra observación alude a que el tiempo que se dejan las preparaciones en lisis puede favorecer al desprendimiento cuando los geles contienen trazas de medio con suero. Para paliar este problema, se recomienda utilizar las láminas Gelbond® en lugar de los portaobjetos de vidrio. Estas

láminas poseen una cara hidrofílica que asegura en un 100% la adherencia de los geles; aunque la solución es un poco más cara, la opción es altamente recomendable.

Pregunta 4:

¿Cuán importante es la duración de la lisis?

Normalmente, se considera que una hora es el tiempo mínimo requerido. La lisis durante toda la noche también se considera apropiada, a menos que se tengan problemas de desprendimiento de agarosa, en cuyo caso no es recomendable prolongar el proceso.

Pregunta 5

¿Cuán importante es el pH?

El ensayo del cometa detecta roturas en el DNA, pero no todas las lesiones en dicho material se manifiestan en forma de roturas; aunque algunas de esas lesiones se pueden convertir en roturas cuando son reconocidas por endonucleasas específicas. Otras, como las alquilaciones de bases y fosfatos pueden transformarse en roturas dependiendo del pH y del tiempo del tratamiento alcalino; estas lesiones que se pueden revelar a un alto pH se denominan sitios álcali-lábiles o ALS (también son ALS los pasos intermedios de reparación por escisión de bases y las bases sin azúcares producidas por la acción de glicosilasas). La concentración de NaOH más utilizada en el ensayo del cometa es de 0,3 M, que proporciona un pH aproximadamente de 13, el cual es suficiente para convertir la mayoría de los ALS en roturas. Una concentración de NaOH de 0,03 M proporciona un pH de 12,1 que es mucho menos eficiente en reconocer estas lesiones, lo que se puede interpretar que con estas condiciones de pH se detecta la mayoría de las roturas, mientras que a pH 0,3 se detectan roturas y ALS.

Hay que recordar que no todas las lesiones del DNA son ALS y no todos los ALS son igualmente álcali-lábiles. Como se ha comentado a lo largo de este

trabajo de Tesis, la estandarización de cada una de las etapas de este ensayo no se ha establecido, por lo que es probable que cada tipo de lesión requiera un pH y un tiempo óptimo.

Pregunta 6:

¿Cuán importante es el voltaje?

El voltaje es el que determina el movimiento del DNA en el gel. Estrictamente hablando, es el gradiente de voltaje sobre el gel lo que determina el movimiento y éste dependerá de la resistencia, la que será menor en el sector de las cámaras laterales del tanque de electroforesis, y será mayor en el sector donde se ubican las preparaciones ya que están cubiertas por una delgada capa de tampón. Si se incrementa el volumen de tampón (aumentando el grosor de la capa que cubre las preparaciones), se incrementará la corriente por la reducción de la resistencia total, y también disminuirá el gradiente de voltaje. Como guía general, la mayoría de las electroforesis se realizan con un gradiente de voltaje de alrededor de 1 V/cm en el sector de las muestras con una capa de tampón de entre 1 y 2 mm.

Pregunta 7:

¿Cuán importante es la intensidad?

La intensidad de corriente puede ser importante, debido a que la mayoría de las fuentes de potencia proporcionan un máximo de 400 a 500 mA, por lo que se propone ajustar el volumen de tampón por debajo del punto estos valores de amperaje. La recomendación es ajustar siempre a 300 mA de manera que se utilice siempre el mismo volumen de tampón sobre las muestras (misma resistencia) y así disminuir la variabilidad entre electroforesis.

Pregunta 8:

¿Puede causar problemas el hecho de tener células no viables entre la población celular a analizar? ¿Qué porcentaje de células es aceptable?

La viabilidad de las células es medida usualmente con el test de exclusión utilizando azul de tripan. Actualmente, este test no está considerado como indicador de viabilidad, sino de la integridad de la membrana. Por ejemplo, las membranas de las células que se individualizan por acción mecánica son fácilmente dañadas y se ha demostrado que no existen diferencias en el daño con respecto a aquellas obtenidas mediante tripsinización; no obstante, los resultados del test de exclusión con azul de tripan de las células raspadas fue positivo en un 80%, en contraste con el 90% negativo de las obtenidas utilizando tripsina.

Además, una parte de las células obtenidas por tripsinización y por raspado fueron nuevamente cultivadas durante 24 h; después de este tiempo, la proporción de células que se adhirieron para volver a crecer, en ambos casos fue la misma. Realmente, las células que se mantienen en crecimiento poco favorable o poco saludable pueden mostrar un mayor nivel de daño basal que las que puedan sufrir una rotura de la membrana, así, el mejor test de viabilidad es un experimento donde el control negativo muestre un bajo nivel de roturas.

Pregunta 9:

¿El ensayo del cometa puede ser utilizado para la detección de células apoptóticas?, ¿Los llamados cometas “hedgehog”, son un signo de apoptosis?

Los cometas “hedgehog” pueden ser producidos por tratamiento de las células con 0,1 M de H₂O₂ durante sólo 5 minutos sobre hielo (condiciones que no inducen al proceso de apoptosis) y que se procesan inmediatamente. Si las células tratadas son incubadas por media hora, los cometas tipo “hedgehog” no son frecuentes, lo que quiere decir que las células han reparado el daño inducido por el H₂O₂, lo que permite suponer que este tipo de cometas no necesariamente indican apoptosis. En el proceso de apoptosis, los fragmentos de DNA son muy pequeños (más pequeños que la longitud de las hebras que

comprenden un nucleosoma) y desaparecen completamente por difusión; sin embargo, en ciertas ocasiones particulares los *hedgehogs* sí pueden ser un signo de apoptosis (*i.e.*, estados tempranos de apoptosis).

Durante la visualización de las muestras, no es raro observar cometas fantasmas (imágenes débiles de cometas con un pequeño porcentaje de tinción en el DNA). Tal vez este tipo de cometas sí pueden representar apoptosis. Aunque los *hedgehogs* pudieran estar indicando apoptosis, sólo se puede confirmar si se está seguro por otros medios que el proceso de apoptosis está ocurriendo; obviamente en este caso no necesitan ser visualizados para afirmarlo.

Pregunta 10:

¿El ensayo del cometa puede ser utilizado para detectar daño en el DNA mitocondrial (mtDNA)?

No. Las moléculas de mtDNA son muy pequeñas (alrededor de 17 kb) y por supuesto no están ancladas a la matriz nuclear. Este material ha sido visualizado mediante hibridación *in situ* fluorescente mediante las pruebas denominadas candado (en inglés "padlock") (Shaposhnikov *et al.*, 2006) y aparecen agrupadas alrededor del núcleo de células embebidas pero, tan pronto como comienza el análisis, el mtDNA empieza a dispersarse y, durante la electroforesis, las moléculas de mtDNA virtualmente no existen.

Pregunta 11:

¿Cómo se mide otro tipo de daño, además de las roturas?

Después de la lisis de las células en el gel, las preparaciones son incubadas con enzimas específicas que detectan lesiones en las bases y las eliminan produciendo roturas en el DNA. Luego se compara la cantidad de roturas detectadas con la incubación enzimática, con respecto a las incubadas sólo con el buffer de reacción de enzimas. Las enzimas mayormente utilizadas son: la endonucleasa III que convierte las pirimidinas oxidadas en roturas; la

formamidopirimidina DNA glicosilasa, que convierte las purinas oxidadas en roturas especialmente la 8-oxoGua; la AlkA, que convierte bases alquiladas en sitios AP (apurínicos o apirimidínicos); y la T4 endonucleasa V, que convierte dímeros de pirimidina en roturas. Desafortunadamente, todavía no se encuentra una enzima que pueda detectar aductos voluminosos. Al respecto, la proteína UvrABC es una compleja enzima bacteriana utilizada para este propósito con otras técnicas, pero no ha sido posible aplicarla aún a los nucleoides embebidos en geles de agarosa. Algunas de estas enzimas tienen asociada una actividad AP liasa o endonucleasa que producen roturas en los sitios AP dejados por una glicosilasa. En otros casos, estos sitios se revelan a un alto pH convirtiéndose en roturas.

Pregunta 12:

¿El ensayo del cometa puede ser utilizado para medir reparación del DNA?

Sí, y no sólo de una única forma. Una de las maneras más simples consiste en tratar las células de interés con un agente genotóxico y medir el daño remanente (como roturas en el DNA o como sitios sensibles a enzimas) cada cierto intervalo durante un periodo de incubación. Así, se puede medir la cinética de la reparación celular después de bajas dosis (fisiológicas). Otro método es el de reparación *in vitro*, aproximación bioquímica que mide la capacidad de reparación. Consiste en la preparación de un sustrato de células dañadas con un agente que produzca un exceso de daño de un tipo relevante para la enzima de interés; luego, se prepara un extracto con las células de las que se quiere evaluar la capacidad de reparación, y se incuba junto con el sustrato durante 10 a 20 minutos, periodo en el que las roturas son acumuladas por acción de los eventos de escisión. La tasa de reparación del daño oxidativo varía entre individuos. También pueden ser utilizados agentes inhibidores de la síntesis de DNA (*e.g.*, hidroxiaurea más citosina arabinósido o afidicolina) para bloquear el paso de resíntesis de nucleótidos durante el proceso de reparación por escisión, produciendo una acumulación de roturas. Esto conduce a la medición de la capacidad de reparación ya que la incisión es un paso limitante.

Pregunta 13:

¿Cuál es el mejor parámetro para medir el daño?

El porcentaje de DNA en la cola, ha mostrado una muy buena linealidad con respecto a la dosis dentro de un rango razonable. La longitud de la cola tiende a su máximo a bajos niveles de daño. Se recomienda no utilizar el momento de la cola (producto de la longitud de la cola y el contenido relativo de DNA en la cola) ya que se considera un parámetro poco informativo; si se analiza un artículo que indica los niveles de daño con este parámetro, poco podemos imaginar sobre la apariencia de los cometas, mientras que con el porcentaje de DNA en la cola, inmediatamente podemos imaginarlo; además, proporciona una gradación fácil de los niveles de daño, de manera que podemos saber que no se ha llegado a un nivel de daño de saturación del ensayo.

El momento de la cola podría ser útil si todos los investigadores que lo utilizan, lo hicieran con la misma unidad de medida y se calibrara de la misma manera el sistema de análisis.

Pregunta 14:

¿Se necesita adquirir un programa de análisis de imagen?

No, aunque dependiendo del objetivo del estudio, puede preferirse un programa de análisis de imágenes. En el caso de aplicarse como un test de toxicología genética, Hartmann *et al.* (2003) recomiendan el uso de análisis de imágenes.

A modo de alternativa, se puede utilizar la aproximación del recuento visual, asignando una clase de daño a cada cometa, de acuerdo al aspecto de la cola. Convencionalmente, se distinguen 5 clases, desde 0 (cola no visible) a 4 (casi todo el DNA en la cola). Se ha demostrado que la visión y el cerebro humano, es capaz de categorizar la apariencia de la cola, pero no puede hacer más distinciones que éstas. La correspondencia entre el análisis visual y el análisis de imágenes en términos de %DNA en la cola, ha presentado una

excelente correlación para diferentes muestras. Hay que resaltar que el recuento visual es más rápido y, además, no debe olvidarse el costo bastante elevado del sistema de análisis de imágenes.