



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTOS DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LA CINÉTICA
REPARATIVA EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GRISELL GUTIÉRREZ MAGALLÓN



MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente: M. en C. Alicia Beatriz Cervantes Peredo

Secretario: QFB. Bertha Resendíz Vázquez

Vocal: Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

1er Suplente: QFB. María Elena Bravo Gómez

2do Suplente: Dr. León Patricio Martínez Castilla

Lugar donde se desarrollo el tema:

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Depto. De Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Asesor del tema:

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

Sustentante:

Gutiérrez Magallón Grisell

Este proyecto fue parcialmente financiado por DGAPA: IN202007

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por haberme dado la oportunidad de ser hija de estos dos seres maravillosos a los que dedico este trabajo ya que gracias a ellos estoy logrando cumplir este gran sueño. A ellos quienes nunca me han dejado de apoyar y sobre todo de darme su amor incondicional, a quienes nunca podre pagar todos sus esfuerzos y confianza puesta en mí. A mis padres: Martha y Andrés a quienes amo sobre todas las cosas.

A mis hermanos (Daniel y Fredy) porque a pesar de las pequeñas peleas que a veces tenemos, sé que puedo contar con ellos en todo momento.

A mi hermana Karina porque más que ser mi hermana es mi amiga y siempre me ha apoyado y dado consejos sobre las decisiones que he tomado. A mi cuñado Carlos porque me ha brindado su amistad y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A Mahara por el apoyo otorgado durante todo este tiempo que he estado en el laboratorio, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis con ella. Por la paciencia que ha tenido conmigo para guiarme durante todo este tiempo, y sobre todo compartir conmigo sus conocimientos y experiencia.

Al Dr. Emilio Rojas por su apoyo y sus consejos durante la realización del proyecto.

A Paulina Ramos por todo su apoyo, por haber compartido todos sus conocimientos conmigo, por ayudarme a realizar todo este proyecto. Pero sobre todo por su amistad que me ha brindado desde el momento en que la conocí.

A todos mis compañeros del laboratorio (Cheros, Martín, Nahum, Pablo, Diego, Vicente, Mónica y Reyna) que me han ayudado desde lo académico hasta en lo personal. Muchas gracias por ser más que mis compañeros mis amigos y familia. Gracias Vero por ser un gran apoyo para mí y por tu amistad.

A todos mis amigos de la facultad (Clauss, Isela, Perla, Delia, Erik, Tona, Cesar, Moy, Lidia, Flor y Alberto) les agradezco todos los momentos vividos con ellos, que a veces fueron malos y pero en la mayor parte fueron buenos. Todo su apoyo no podre pagárselos jamás. Y a todas aquellas personas que conocí durante la carrera con los que conviví y me hicieron sentir que podía contar con ellos.

A mi gran amiga Silvia porque siempre me ayudado a levantarme cuando he sentido que ya nada tiene sentido. Sabes que nunca podre pagarte todos tus consejos y todo estos años de amistad.

A mis amigos de la secundaria, CCH y a todos aquellos que he conocido durante todo mi vida, porque todos ellos han dejado una enseñanza en mí.

A mi amiga Mireya por preocuparse por mí bienestar en todo momento, por todos sus consejos y sobre todo por las largas charlas en donde siempre me puedo desahogar.

A mis maestros quienes de una forma u otra dejaron una enseñanza en mí. Y sobre todo a aquellos que más que ser mis maestros se convirtieron en mis amigos: al maestro Simón Hernández, a la Dra. Elena Ramírez y sobre todo a Ernesto Sánchez.

A mis abuelos Celestino y Margarita que a pesar de que ya no estén aquí, se que siempre tuve su apoyo y amor.

A mi abue Pancha por quererme tanto, por apoyarme y cuidar de mi.

A mi familia en general que se que siempre estuvieron ahí para darme su amor y sobre todo su apoyo en la decisión que he tomado en la vida, todos han sido un gran motor para seguir luchando por mis sueños.

Índice

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCION.....	4
1. Generalidades de las neuronas.....	4
1.1 Neuroblastomas	5
2. Reparación del DNA	8
3. Reparación por escisión de nucleótidos y luz UV.....	9
4. Etapas de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)	11
5. Reparación del DNA en células terminalmente diferenciadas.....	14
6. Reparación por escisión de nucleótidos en neuronas.....	17
II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. HIPÓTESIS	21
IV. OBJETIVO GENERAL.....	21
V. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
IV. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22
VII. MATERIAL Y MÉTODO	23
1. Cultivos celulares.....	23
2. Protocolo de diferenciación a neurona para células MSN	23
3. Tratamientos con luz UVc.....	24
5. Citotoxicidad	25
6. Ensayo cometa para evaluar la cinética reparativa	25
7. Análisis estadístico	28
VIII. RESULTADOS.....	29
1. Citotoxicidad	29
2. Genotoxicidad y Cinética Reparativa.....	32
IX. DISCUSIÓN.....	41
X. CONCLUSIONES	45
ANEXO 1.	46
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ABREVIATURAS

(6-4)PPs	(6-4) Fotoproducto
AR	Ácido Retinóico
BPDE	Benzo[a]Pireno Diol-Epoxido
CPD	Anillo de Ciclobutano
DAR	Reparación Acoplada a los Dominios de Transcripción
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GGR	Reparación Global del Genoma
Luz UVc	Luz ultravioleta tipo C
mA	Miliampers
MMS	Metil-metanosulfonato
NER	Reparación por Escisión de Nucleótidos
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
QSN	Glutamina, Serina y Asparangina
SFB	Suero Fetal Bovino
TCR	Reparación Acoplada a la Transcripción
UDS	Síntesis de DNA no Programada
V	Volts

RESUMEN

La reparación del DNA a través del mecanismo de escisión de nucleótidos (NER) repara lesiones que producen una distorsión tridimensional en la estructura del DNA, como es el caso de los (6-4) fotoproductos y los anillos de ciclobutano que son generados por la radiación UV.

Si bien se asume que todos los tipos celulares cuentan con varios mecanismos de reparación del DNA, la reparación de las neuronas es un área de gran incertidumbre hoy en día. Es por ello y con base en la propuesta de que las neuronas al diferenciarse pierden la reparación global del genoma (subvía de NER) y solo mantienen la reparación acoplada a la transcripción (subvía de NER), es que el presente proyecto estudia la eficiencia de la reparación en el modelo de diferenciación neuronal MSN. Para ello, evaluamos la cinética reparativa, mediante la electroforesis unicelular alcalina, ante el reto con luz UVc en el modelo MSN indiferenciado y diferenciado y la comparamos con células 3T3 las cuales tienen atenuada la subvía de la Reparación Global del Genoma (GGR). Nuestros resultados indican que las neuronas diferenciadas tienen más efectos citotóxicos ocasionados por la luz UVc que las indiferenciadas mientras que los fibroblastos murinos 3T3, fueron los más radiosensibles. En cuanto a la capacidad de remoción de los rompimientos en el DNA ocasionados por la luz UVc, encontramos que solo las neuronas diferenciadas y las células 3T3 tienen capacidad parcial de reparación del DNA. De estos resultados podemos concluir que el estado de diferenciación en las neuronas le confiere capacidades

reparativas diferentes (más eficientes) para remover daños que ocasionan distorsión de la cadena de DNA como el daño inducido por luz UVc.

I. INTRODUCCION

1. Generalidades de las neuronas.

El sistema nervioso está compuesto por dos clases de células: las neuronas y las células gliales. Las neuronas tienen la habilidad de manipular los cambios a través de la membrana celular y son las responsables de procesar la información en el sistema nervioso (Hutchins J y Barger S, 1998).

La organización celular básica de las neuronas se asemeja a la de las otras células; sin embargo, se distingue por la especialización para la comunicación intercelular. Esto se pone en manifiesto por la morfología general en la organización específica de los componentes de la membrana para el señalamiento eléctrico y en la complejidad de las estructuras y funciones de los contactos sinápticos entre las neuronas (Purves D, et al. 2008).

La mayor parte de las neuronas están compuestas por tres partes definidas: el soma o cuerpo celular, múltiples dendritas y un axón. El soma contiene al núcleo y está rodeado de citoplasma. Una de sus funciones es el de asegurar la síntesis de muchos de los componentes requeridos para la estructura y el funcionamiento de las neuronas, por ello es que en el soma se encuentran todos los organelos responsables de esto (Hammond C, 2008).

Las dendritas son la diana primaria de las aferencias sinápticas desde otras neuronas y también se distinguen por su alto contenido en ribosomas y proteínas específicas del citoesqueleto que reflejan su función en la recepción y la integración de la información proveniente de otras neuronas (Purves D, et al. 2008).

La información transmitida por las sinapsis a las dendritas neurales es integrada y "leída" en el origen del axón que es la porción de la célula nerviosa especializada en la conducción de señales hacia el sitio siguiente de interacción sináptica. El axón es una de las extensiones singular del cuerpo de las células neuronales que pueden medir cientos de mm o aún más según el tamaño o tipo de neurona (Purves D, et al. 2008).

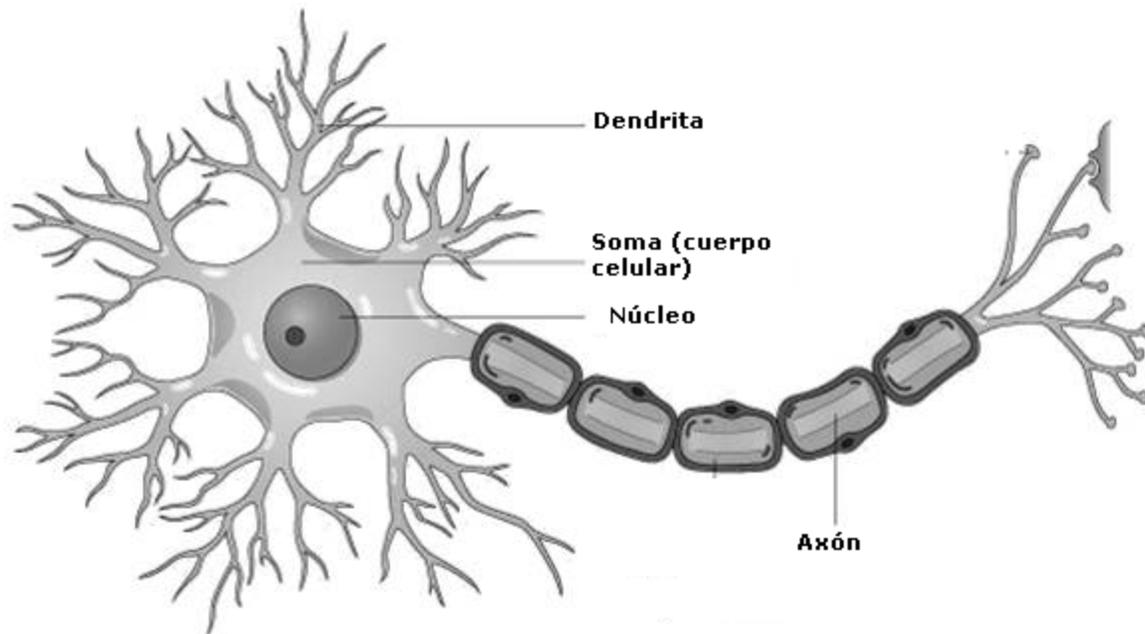


Fig. 1. Fisiología de la neurona.

1.1 Neuroblastomas

La etiología del neuroblastoma es aún desconocida. Pero hay estudios que sugieren que hay posibles factores ambientales involucrados como los son: la exposición prenatal a la hidantoína, fenobarbital o alcohol, debido a que hay una gran incidencia en la población infantil que lo padecen (Castleberry RP, 1997).

El neuroblastoma se origina en células precursoras de la cresta neural comprometidas para diferenciarse en los ganglios simpáticos y la médula suprarrenal. Este proceso fisiológico depende de la acción de neurotrofinas (NGF, BDNF, etc), que actúan sobre receptores con actividad de tirosincinasa (TRKA, TRKB y TRKC), de tal forma que su expresión equilibrada conduce a la diferenciación en neuronas muy especializadas o a la muerte celular por apoptosis (Castel V, et al. 2005). De los ligandos y los receptores que participan en la regulación de la diferenciación, del que menos se conoce es el Factor de

Crecimiento Neuronal (NGF) y su receptor, TRK-A. Clínicamente los neuroblastomas con expresión basal de TRK-A son asociados con favorables respuesta a las terapias y con una alta probabilidad de supervivencia (Castleberry RP, 1997).

En este caso se ha observado que hay una correlación entre el número de cromosomas y su posible tratamiento, es por ello que se determina el contenido total de DNA en estas células. Por ejemplo, en el caso de los niños en los cuales las células tumorales presentan hiperploidía se ha observado que responden bien ante el tratamiento con ciclofosfamida y doxorubicina; mientras que aquellos neuroblastomas que presentan diploidía reflejan un estado avanzado de la enfermedad y la respuesta ante la combinación de dichos fármacos es pobre (Castleberry RP, 1997).

En la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de modelos neuronales utilizados en el ámbito científico dado que tiene la capacidad de diferenciarse a neuronas (Nospikel T y Hanawalt P, 2000; Simpson P, et al. 2001;).

Cabe mencionar que el modelo Nt2 estrictamente no corresponde a un neuroblastoma, sin embargo es en el único modelo neuronal humano que se ha estudiado la expresión de genes participantes en la reparación del daño al ADN (Nospikel T y Hanawalt P, 2000), tema de interés central en este trabajo.

Tabla 1. Características de diferentes modelos celulares capaces de diferenciarse a neuronas.

	MSN^(a)	NT2^(d)	SH-SY5Y
Origen	Tumorigénica. Paciente masculino de 5 años de edad, sin previo tratamiento.	Tumorigénica. Paciente Caucásico de 22 años de edad.	Tumorigénica. Subclona de la línea celular SK-N-SH. Extraído de un paciente femenino de 4 años de edad ^(b)
Crecimiento	Crece en medio RPMI, suplementado con 10% de SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y 1% de QSN. 37° C y 5% de CO ₂	Crece en medio DMEM:F12, suplementado con 10% SFB y 0.1% de gentamicina. 37° C y 5% de CO ₂	Crece en medio F12:EMEM (1:1) suplementado con 15% de SFB, 2mM L-glutamina y 1% de aminoácidos no esenciales. 37° C y 5% de CO ₂
Diferenciación	Para su diferenciación a neurona requiere de los factores tróficos, que son: ácido retinóico (10 μM) y factor de crecimiento neuronal (60 ng/mL) durante un periodo de 6 días.	Para su diferenciación necesita 10 μM de ácido retinóico durante 5 semanas.	Para su diferenciación necesita de ácido retinóico 75 μM y factor de crecimiento neuronal (50 ng/mL) ^(c)
Otras características	□□□□□□□□□□□□□□□□ de enzimas que sintetizan norepinefrina. Presenta trisomias en los cromosomas 12, 15 y 22 además de la pérdida del Y. Número de cromosomas entre 57-58.	Tiene 63 cromosomas, presenta de forma normal al cromosoma Y.	Tiene actividad de dopamina-β-hidroxilasa y puede convertir al glutamato en GABA. Pierde sus características neuronales cuando se incrementa el número de pases.

(a) Raynolds CP, et al. 1986. (b) Biedler JL, et al. 1973. (c) Simpson P, et al. 2001. (d) www.atcc.org

2. Reparación del DNA

La constitución fisicoquímica de nuestro genoma no garantiza que tenga una gran estabilidad o una apropiada función a lo largo de la vida. Hay un gran número de lesiones que se pueden presentar en el DNA y estas pueden ser ocasionadas principalmente por tres causas globales. La primera causa de daño al DNA la ocasiona los agentes ambientales tales como la luz ultravioleta (componente de los rayos solares), radiación ionizante, y un sin número de agentes químicos. La segunda es generada por los productos del metabolismo celular que constituyen un permanente enemigo para la integridad del DNA. Dentro de esto se incluye las especies reactivas de oxígeno tales como: el anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno que son derivados de la respiración y de la peroxidación de lípidos, entre otros procesos fisiológicos. La tercera causa de daños globales está constituida por algunas uniones químicas en el DNA que pueden llevar a la inestabilidad de las condiciones fisicoquímicas (Hoeijmakers, J. 2001).

Es por ello que las células cuentan con diversos mecanismos de reparación para mantener la integridad de su genoma entre los cuales destacan: la reparación por escisión de bases, por escisión de nucleótidos, recombinación homologa y mal apareamiento (Hoeijmakers, J. 2001), y cada uno de ellos tiene la capacidad de reparar cierto tipo de daños, como se muestra en la figura 2.

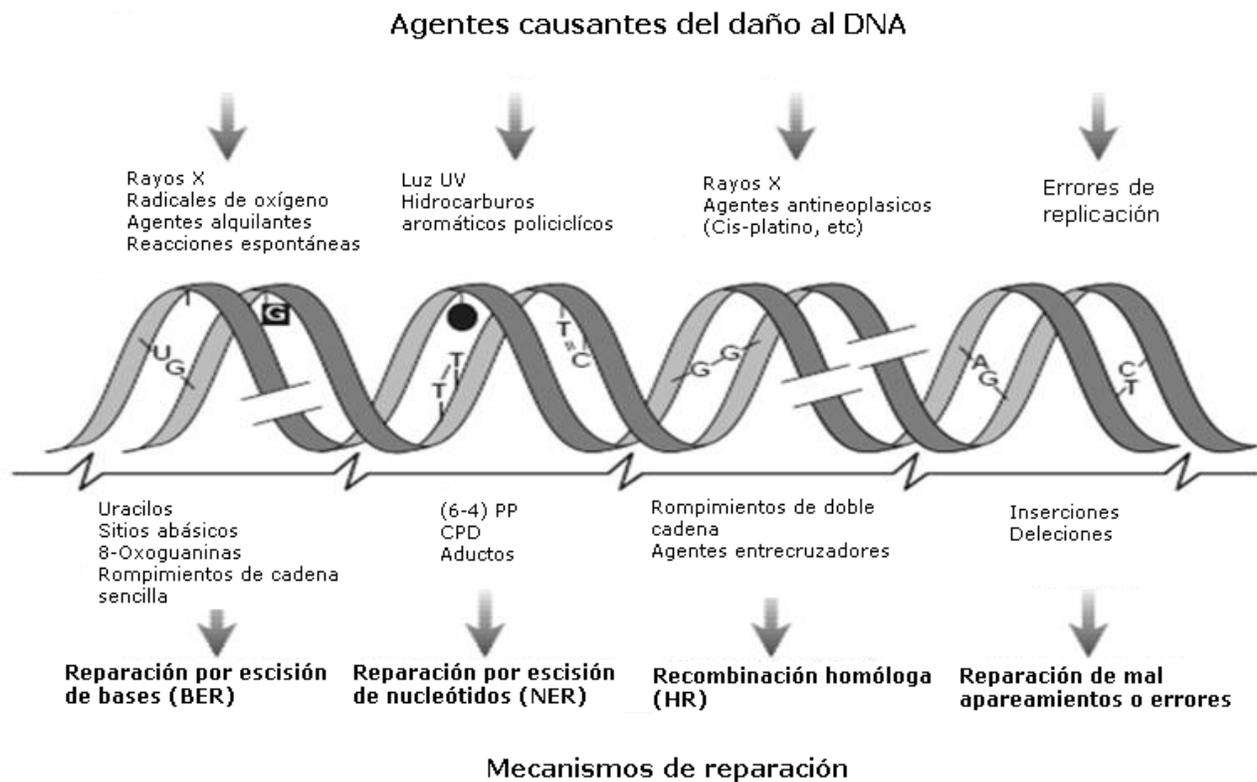


Fig.2. Agentes comunes que causan daño al DNA; ejemplos de las lesiones que estos ocasionan; y los mecanismos de reparación de DNA que responden a dichos estímulos. Modificado de Hoeijmakes, J 2001.

3. Reparación por escisión de nucleótidos y luz UV.

La Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER), es uno de los mecanismos de reparación del DNA más versátiles con el que cuentan las células, éste tiene la habilidad de reconocer y reparar lesiones que producen una distorsión tridimensional en la estructura del DNA, por ejemplo es capaz de reparar uniones covalentes entre la bases del DNA, llamados aductos, ocasionadas por sustancias químicas como las nitrosaminas, benzo[a]pireno, entre otros. Otra clase de agentes son los denominados entrecruzadores, que pueden ocasionar uniones covalentes con el DNA, en una sola cadena (intracadena) y entre ambas cadenas

(intercadena) como por ejemplo: cisplatino, mostazas nitrogenadas, etc. La NER no sólo es capaz de reparar daños ocasionados por sustancias químicas sino que también repara los daños ocasionados por la luz UV de corta longitud (UVB 290-320nm, y UVC <290nm) que puede causar la formación de uniones covalentes entre dos pirimidinas adyacentes en la misma cadena de DNA. Hay dos tipos de productos ocasionados por la luz UV, los anillos de ciclobutano (CPD) y los fotoproductos ((6-4)PP), cuya diferencia se basa en la posición en que se dan las uniones (Tornaletti, S. y Pfeifer, G. 1996). En el caso de los CPDs resulta en la formación de 2 uniones, una entre los carbonos 4 de cada pirimidina y la otra, entre los carbonos 5 lo que da como resultado la formación de un anillo de 4 carbonos. En el caso de los (6-4) PP es una sola unión, entre el carbono 6 y el carbono 4 de las pirimidinas, lo cual implica la transferencia del grupo amino presente en la posición 6 en timidina a la posición 5 de la otra pirimidina (Nouspikel, T. 2009a) ver figura 3.

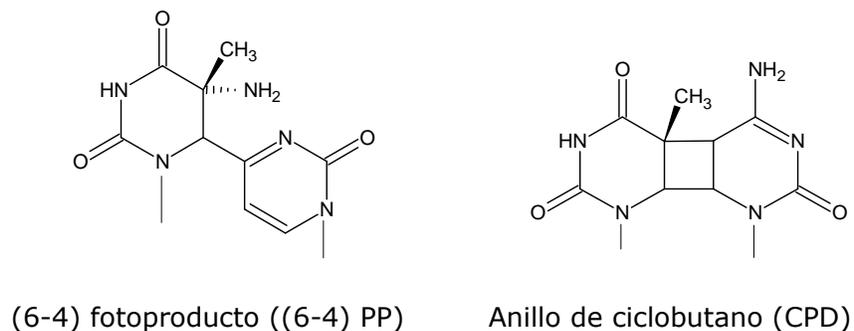


Fig. 3. Tipos de daños ocasionados por la luz UV en el DNA

4. Etapas de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

Un gran número de enzimas participan en las diferentes etapas de la NER, dichas etapas incluyen el reconocimiento del daño en el DNA; la incisión en la cadena dañada; la remoción del oligonucleótido que contiene el daño; la síntesis del oligonucleótido utilizando la cadena complementaria y finalmente, la ligación del oligonucleótido recién sintetizado con la hebra ya existente ver figura 4 (Hanawalt, P. 2002; Nospikel, T. 2009b).

Cabe mencionar que este mecanismo de reparación consta de dos subvías la Reparación Global de Genoma (GGR) que se encarga de reparar los daños ocasionados en el DNA a lo largo del genoma completo, y la Reparación Acoplada a la Transcripción (TCR) que como su nombre lo indica se lleva a cabo cuando el DNA se está transcribiendo (Figura 4).

La diferencia entre ambas vías consiste en el complejo proteico encargado del reconocimiento del daño, que para el caso de GGR está formado por HR23B y XPC, mientras que para TCR se encuentra formado por la polimerasa II y CSB; ya que los pasos subsecuentes se realizan de la misma manera tanto en GGR como en TCR.

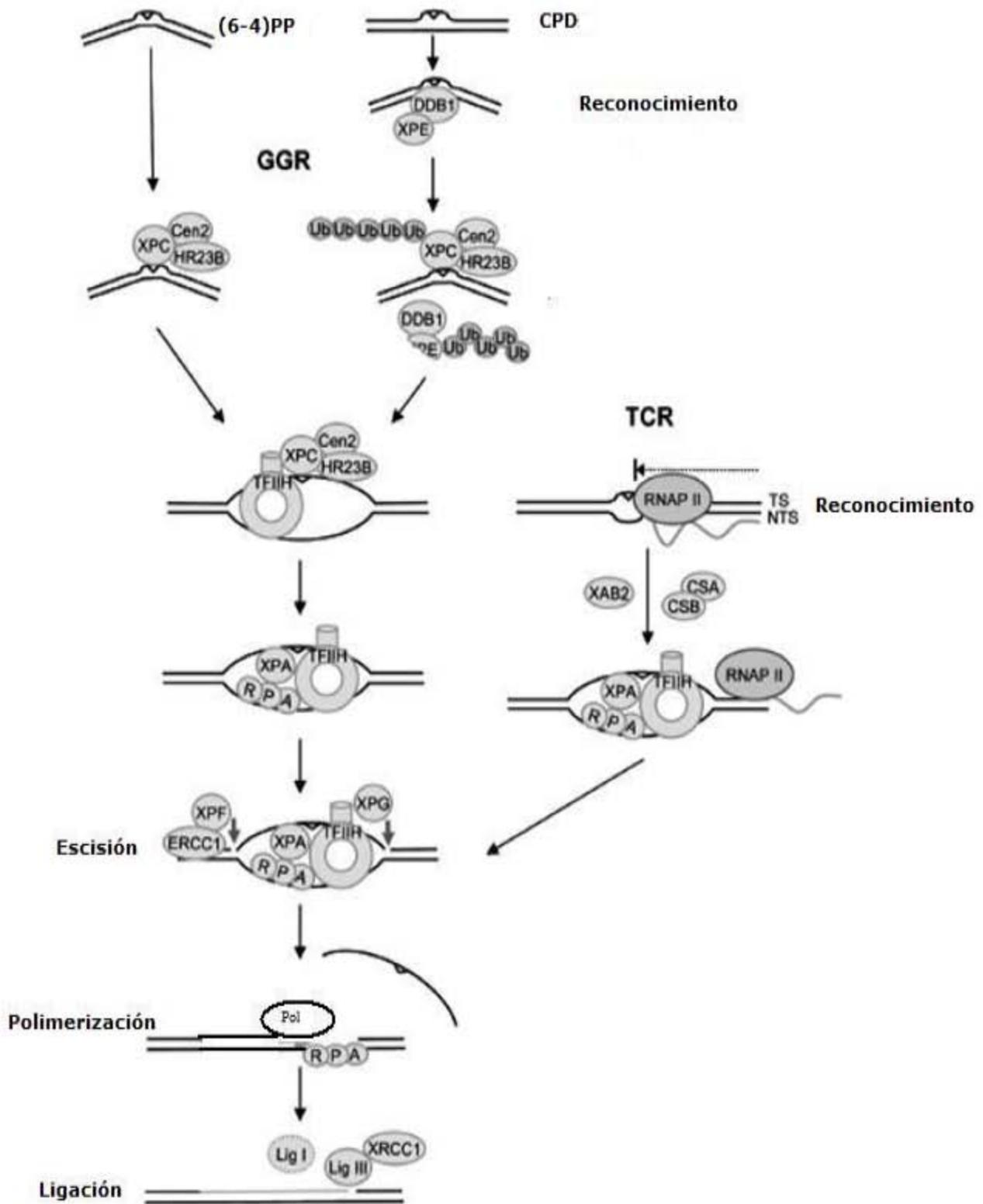


Fig 4. Subvías de la Reparación por Escisión de Nucleótidos, Reparación Global del genoma, GGR, y Reparación Acoplada a la Transcripción, TCR. Modificado de Nouspikel 2009a.

Hay dos prerequisites para que la NER se active: la distorsión en la estructura de la doble hélice, y la modificación química en el DNA. El complejo XPC, que reconoce la distorsión en el DNA, consiste en tres subunidades: XPC, HR23B y centrina 2 (Araki, M. et al 2001). XPC tiene una gran afinidad a las lesiones del DNA, una vez ahí ésta se poliubiquitina, éste es un proceso reversible, por lo que no resulta en la degradación de esta proteína, solo le confiere una mayor afinidad por el DNA (Sugasawa, K. 2006). HR23B interactúa con XPC para incrementar la actividad de la NER, aunque no se conoce a ciencia cierta la función de HR23B, se cree que está involucrada en el control de la ubiquitinización de XPC (Nospikel, T. 2009a).

Existe un problema en el reconocimiento del daño al DNA, cuando éste es ocasionado por la luz UV, los (6-4) PP son un buen sustrato para la NER, pero en el caso de los CPD que causan una leve distorsión es un sustrato pobre para dicha reparación, por lo que es de suma importancia la participación del complejo DDB que este a su vez está compuesto por DDB1 y DDB2/XPE, figura 4 (Payne, A. y Chu, G. 1994).

Posteriormente se abre la cadena alrededor del daño, proceso que realiza el complejo TFIIH, flanqueado por dos enzimas la XPD y la XPB. La primera tiene función de helicasa, ya que esta se encarga de abrir la cadena alrededor de la lesión, mientras que XPB actúa como ATPasa, (Nospikel T, 2009a).

Otra proteína que tiene gran afinidad por el DNA dañado es XPA, que está a su vez asociada a las tres subunidades de RPA. La función de XPA aun no es clara, en un principio se creía que esta estabilizaba la apertura de la cadena, pero

ahora se cree que su función está involucrada en el desplazamiento del complejo XPC. Mientras que la función de RPA es la de confirmar la presencia del daño (Nospikel T, 2009a).

El siguiente paso es la escisión de la cadena. El corte del extremo 3' está a cargo de la endonucleasa XPG, mientras que en el extremo 5' es el complejo XPF-ERCC1. En este caso XPF tiene la actividad de endonucleasa, mientras que el papel de ERCC1 aun no es claro, se cree que solo permite la estabilización de XPF. El fragmento escindido es de aproximadamente 25-30 nucleótidos, dependiendo de la lesión. La DNA polimerasa δ y ϵ son las encargadas de sintetizar el oligonucleótido en base a la cadena complementaria, para que finalmente ligasa III junto con XRCC1 lo unan a la cadena ya existente (Fig 4).

5. Reparación del DNA en células terminalmente diferenciadas.

Las células que no se dividen o que no cambian su fenotipo son denominadas como células terminalmente diferenciadas, las cuales son comunes en organismos superiores (Nospikel y Hanawalt 2002). Diversos grupos han estudiado la reparación del DNA en células diferenciadas, sin embargo, sus hallazgos son divergentes, probablemente por las características propias de cada modelo, al igual que su capacidad de respuesta para establecer la reparación acoplada a la transcripción. Dado que la NER es el mecanismo más versátil de reparación del DNA y está acoplado a la transcripción es en el cual, se han observado más cambios a través del proceso de diferenciación.

Al respecto Nospikel, T. (2007) ha revisado diversos trabajos en los cuales se compara la eficiencia de la reparación por escisión de nucleótidos en células

terminalmente diferenciadas tras la exposición a luz UV, datos que se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Tasa de actividad de la reparación del DNA en células terminalmente diferenciadas expuestas a luz UV.

Sistema biológico	Daño detectado	Mecanismo de reparación	Reparación en células diferenciadas
Células embrionarias ratón/pollo	UDS	NER	Baja con respecto a fibroblastos
Neuronas de rata	UDS	NER	Baja
Neuroblastoma de ratón	Supervivencia	NER	Decremento
Teratocarcinoma de ratón	CPDs	NER	Decremento
Embriocarcinoma de ratón	CPDs	NER	No repara
Neuroteratoma humano NT2	CPDs	NER	No repara
	(6-4)PPs		Reparación atenuada
Músculo estriado de pollo	UDS	NER	Decremento
Mioblasto L8 de ratón	CPDs	NER	Inicialmente con un decremento, baja recuperación
Adipositos 3T3-derivados de ratón	UDS	NER	Decremento
Linfocitos humanos	UDS	NER	Incremento
Granulositos HL60-derivados humanos	Supervivencia y UDS	NER	Incremento
Macrófagos HL60-derivados humanos	CPDs	NER	Decremento
Queratinocitos humanos	UDS	NER	Decremento en capas superiores
Queratinocitos de ratón	CPDs y (6-4)PPs	NER	Baja

Modificado de Nospikel T., 2007. UDS: Síntesis de DNA no programada, CPDs: anillos de ciclobutano, (6-4)PPs: fotoproductos, NER: reparación por escisión de nucleótidos.

De los datos resumidos en la tabla 2 se puede concluir que la NER está atenuada en las células terminalmente diferenciadas de varios tipos celulares,

incluyendo adipocitos, queratinocitos, neuronas, y macrófagos. Esta atenuación ocurre a nivel de la reparación global del genoma ya que la reparación de genes transcritos es eficiente, inicialmente este fenómeno fue descrito como reparación acoplada a la diferenciación, y actualmente se conoce como reparación acoplada a los dominios de transcripción (DAR) (Nospikel, T. 2009a).

Dentro de las células totalmente diferenciadas de nuestro interés particular se encuentran las neuronas, las cuales tienen ciertas particularidades que las hacen interesantes para su estudio; tal es el dato que desde que nacemos tenemos una cantidad determinada para el resto de nuestra vida, lo cual indica que si llegamos a perder a una de ellas ésta no es remplazada por otra.

Estudios realizados en cultivos primarios de neuronas de pollo han mostrado niveles bajos de síntesis no programada de DNA (UDS), tras la exposición a luz UV o a metil-metanosulfonato (MMS), con respecto a fibroblastos. Estos resultados son similares a los obtenidos en cultivos primarios de neuronas de ratón. Otro experimento realizado en un cultivo primario de retina de embrión de pollo que fue diferenciado a neurona, demostró que con la diferenciación se perdió la capacidad de reparación por escisión de nucleótidos. De forma interesante, se ha observado que cuando se utilizan inhibidores de la mitosis en células que no están totalmente diferenciadas éstas no pierden esta capacidad de reparación; lo cual indica que durante la diferenciación se llevan a cabo cambios en el DNA que son irreversibles con respecto a los mecanismos de reparación (Nospikel, T y Hanawalt, P. 2002).

En estudios realizados con neuroblastomas humanos se observó que éstos pierden la capacidad de reparar aductos formados por Benzo[a]Pireno Diol-Epoxido (BPDE) al ser diferenciados. Estos neuroblastomas muestran una expresión constitutiva de proteínas involucradas en la reparación de bases mal apareadas, lo cual indica que probablemente este mecanismo de reparación no se altera durante la diferenciación, como se han demostrado con la reparación por escisión de bases y de nucleótidos.

6. Reparación por escisión de nucleótidos en neuronas

Las neuronas representan un tipo celular único dado que se encuentran en estado postmitótico la mayor parte de su vida y tienen una tasa de replicación sumamente baja, lo cual las señala como células diferenciadas terminalmente objeto para estudiar la NER. Nospikel y Hanawalt (2002) hacen una revisión de trabajos en los cuales se emplearon diferentes modelos neuronales de animales y humanos para evidenciar la atenuación de la reparación global del genoma, y concluyen que diversos mecanismos de reparación incluyendo la NER, reparación de rompimientos de cadena, posiblemente la reparación por escisión de bases pero no la reparación de mal apareamientos parecen estar atenuadas en las neuronas.

Sin embargo, este aspecto de las neuronas no puede deslindarse del hecho que en diversas enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, y enfermedad de Pick se ha descrito la re-entrada al ciclo celular de las neuronas. Este suceso que parece reflejar buenas noticias en cuanto a las terapias de neuroregeneración no lo es, puesto que las neuronas desafortunadamente no

llegan a completar la mitosis y mueren por apoptosis (Yang Y, et al. 2001). A este respecto se ha hipotetizado que la razón por la cual se presenta esta catástrofe mitótica radica en la gran acumulación de lesiones en el genoma que no se transcribe de la neurona; por lo que la atenuación de la reparación global del genoma puede contribuir a la pérdida neuronal que se presenta en varias neurodegeneraciones (Nospikel, T. 2009b).

La NER es capaz de reparar un número elevado de lesiones en el DNA, para lo cual requiere la participación de varias proteínas cuyo déficit desencadena manifestaciones clínicas que pueden variar considerablemente. Hay varias enfermedades genéticas que han sido ligadas a mutaciones en genes involucrados en la reparación global del genoma y la reparación acoplada a la transcripción, subvías de la NER. En común, algunos pacientes cursan con alteraciones neuronales como retraso mental y/o enfermedades neurodegenerativas, las características de dichas enfermedades se resumen en la tabla 3.

Tabla 3. Enfermedades relacionadas con mutaciones en genes de la reparación por escisión de nucleótidos.

Enfermedad	Sintomatología	Genes	Subvía alterada
Xeroderma Pigmentoso	Enfermedad hereditaria caracterizada por fotosensibilidad, anormalidades en piel y cornea, cáncer de piel y son propensos a padecer cáncer, como cáncer de pulmón o del tracto gastrointestinal. Cerca del 20% de los pacientes cursan con síntomas neurológicos típicos de las neurodegeneraciones.	XPC, XPE	GGR
		XPV	Translesión en la síntesis de DNA (Pol ϵ)
		XPA-XPG	NER
Síndrome Cockayne	Fotosensibilidad, anormalidades oculares (cataratas, progresiva pigmentación retinopatía, etc.), caries dentales, sordera, etc. Presentan neurodegeneración.	CSA, CSB	TCR
		XPB, XPD, XPG	NER
Síndrome UV-sensibles	Es caracterizada por una leve fotosensibilidad al exponer áreas de la piel al sol, pero tiene baja predisposición al cáncer de piel.	CSB	TCR
Tricotiodistrofia	Se caracteriza por fragilidad en el cabello, fotosensibilidad, baja estatura, baja fertilidad, deterioro intelectual.	TTDA, XPB, XPD	Transcripción

Modificado de Nospikel, T, 2009b; TCR: Reparación Acoplada a la Transcripción, GGR: Reparación Global del Genoma, NER: Reparación por Escisión de Nucleótidos.

II. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los mecanismos de reparación del DNA más estudiados por su importancia son la reparación por escisión de bases y de nucleótidos. Este último mecanismo de reparación ha sido ampliamente estudiado y se han descrito dos subvías que lo llevan a cabo, la reparación global del genoma y la reparación acoplada a la transcripción. Este mecanismo de reparación del DNA (NER) es activado por lesiones en el DNA ocasionadas por la luz UVc (CPD y (6-4) PP). Con base en estos antecedentes y los resultados poco concluyentes de la reparación acoplada a dominios en transcripción; el presente trabajo explora la eficiencia de la reparación por escisión de nucleótidos en un modelo de diferenciación neuronal a través de cinéticas reparativas evaluadas mediante la electroforesis unicelular alcalina. Cabe mencionar que consideramos los antecedentes del "reparadox" (Hanawalt P, 2001), en el cual se describe la atenuación de la reparación global del genoma en la línea de fibroblastos murinos, 3T3, como modelo para comparar la respuesta reparativa del neuroblastoma humano MSN tras el reto con luz UVc.

III. HIPÓTESIS

Las células de neuroblastoma humano MSN en estado indiferenciado repararan con mayor eficiencia los daños generados por la luz U.V. que las células diferenciadas.

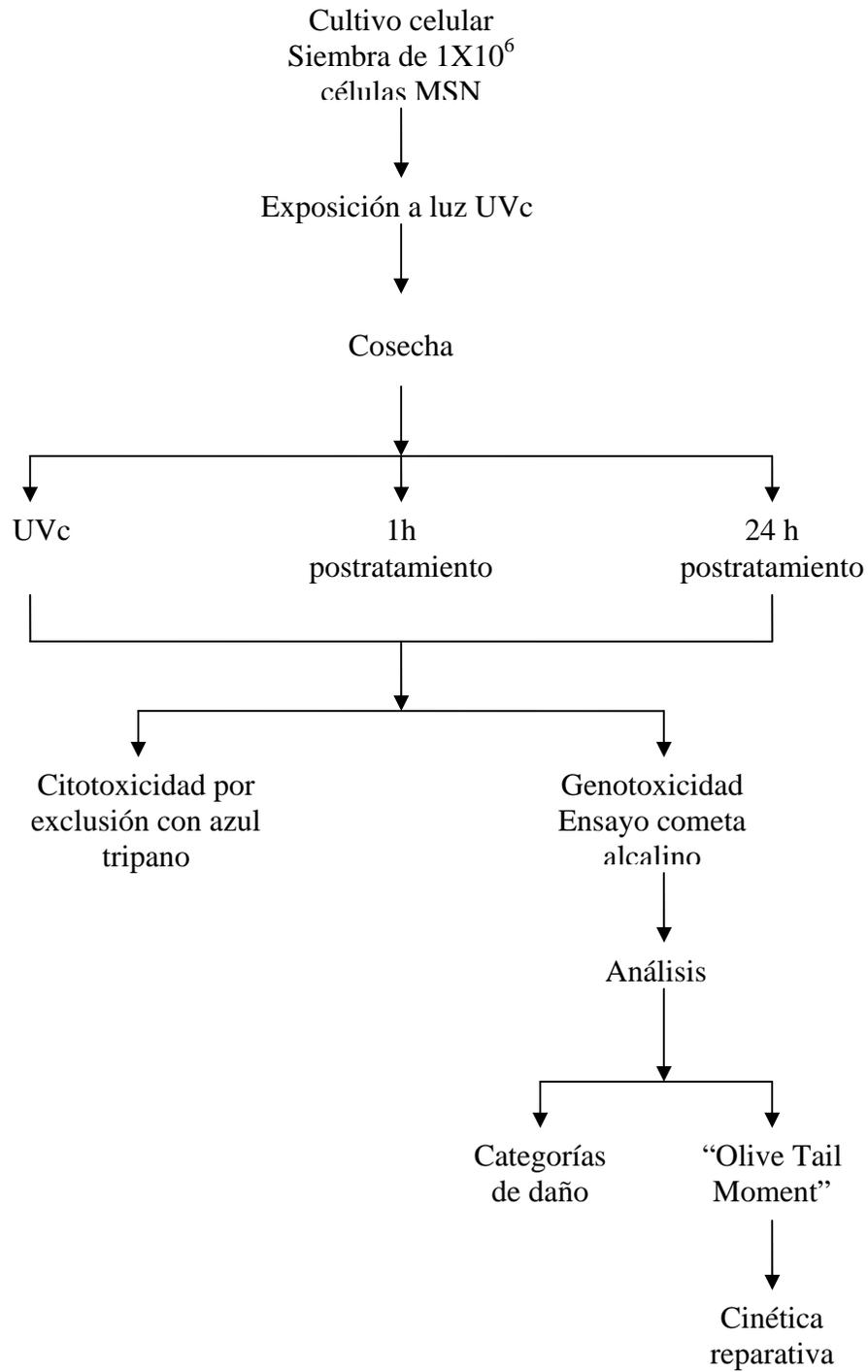
IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética reparativa en el neuroblastoma humano MSN antes y después de su diferenciación tras la exposición a luz U.V.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el tiempo de exposición en el cual tanto las células MSN en su estado indiferenciado como en los fibroblastos 3T3 tras 24 hrs postratamiento mueren en un 50%, a través de curvas de citotoxicidad.
- Comparar dichos tiempos a la exposición de luz UVc, en las células en su estado diferenciado.
- Establecer la sensibilidad a la radiación del modelo MSN en comparación a los fibroblastos murinos 3T3.
- Evaluar la cinética de reparación del DNA en células indiferenciadas, diferenciadas y fibroblastos 3T3 ante el reto con luz UVc

IV. DISEÑO EXPERIMENTAL



VII. MATERIAL Y MÉTODO

1. Cultivos celulares

Se cultivaron dos líneas celulares; el neuroblastoma humano MSN y fibroblastos murinos transformados 3T3, se emplearon los medios RPMI 1640 y medio D-MEM respectivamente, suplementados con 10 % suero fetal bovino, 1% de antibióticos (penicilina y estreptomina) y 1% de aminoácidos no esenciales, en el caso del medio RPMI se adicionó 1% de QSN (Glutamina, Serina y Asparagina). Se incubaron a 37° C y 5% de CO₂. Las características del neuroblastoma MSN y de los fibroblastos murinos 3T3 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de las líneas celulares empleadas.

	MSN^(a)	Fibroblastos murinos 3T3^(b)
Origen	Tumorigénica. Paciente masculino de 5 años de edad, sin previo tratamiento.	Células embrionarias de ratón
Crecimiento	Crece en medio RPMI, suplementado con 10% de SFB, 1% aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y 1% de QSN. 37° C y 5% de CO ₂	Crece en medio DMEM, suplementado con 10% SFB, 1% de antibióticos y 1% de aminoácidos no esenciales 37° C y 5% de CO ₂
Diferenciación	Para su diferenciación a neurona requiere de los factores tróficos, que son: ácido retinóico (10 µM) y factor de crecimiento neuronal (60 ng/mL) durante un periodo de 6 días.	_____
Otras características	Se detectaron la presencia de enzimas que sintetizan norepinefrina. Presenta trisomias en los cromosomas 12, 15 y 22 además de la pérdida del Y. Número de cromosomas entre 57-58.	

(a) Reynolds CP, et al. 1986. (b) www.atcc.org

2. Protocolo de diferenciación a neurona para células MSN

Para llevar a cabo la diferenciación celular estas son incubadas con medio RPMI suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico y 1% de QSN; además de lo factores tróficos (ácido retinóico (AR) y

factor de crecimiento neuronal (NGF)), durante un periodo de 6 días, haciendo cambio de medio cada 48 hrs (Figura 5).

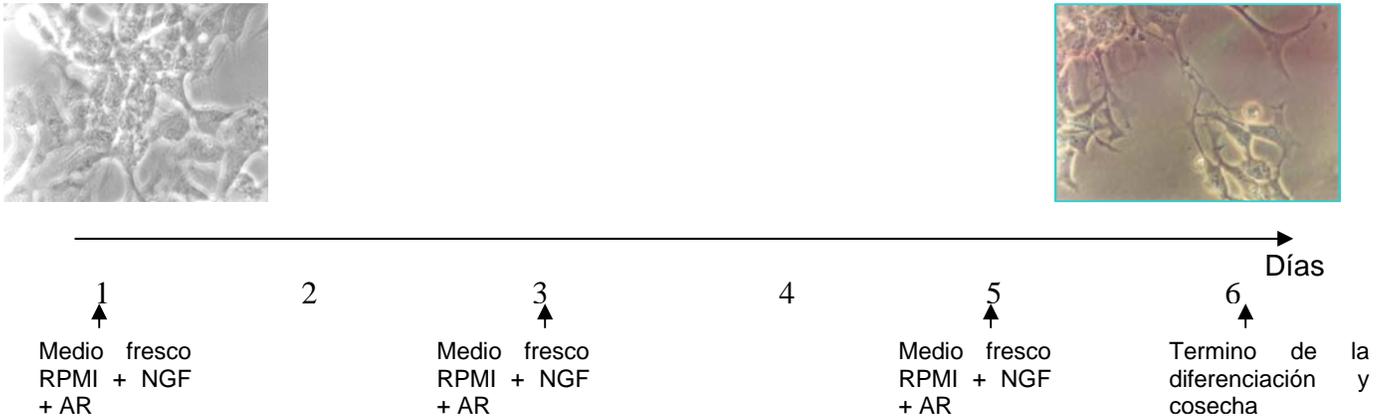


Figura 5. Esquema de tratamiento para diferenciación neuronal del modelo MSN

3. Tratamientos con luz UVc

Para los tratamientos con luz U.V, se exponen las cajas de cultivo a diferentes dosis de radiación; empleando la lámpara Philips T.U.V. 15W/GST8 254 nm, estableciéndose para ello varios tiempos de exposición, este paso se realizó en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Una vez irradiadas, se cosecharon de forma inmediata con el mismo PBS en tubos ependorf etiquetados con el tiempo de exposición. Para el seguimiento de los postratamiento de 1 y 24 h se retiró el PBS, se adicionó medio nuevo y se incubaron a 37° C y 5% de CO₂ el tiempo establecido. Transcurrido el tiempo se cosechaban de la misma manera.

5. Citotoxicidad

Se determinó la citotoxicidad de las células en los diferentes tiempos de muestreo (UVc, 1h y 24h), mediante la tinción de exclusión con el colorante azul tripano, la cual permite diferenciar entre las células vivas (no teñidas) de las muertas (teñidas de azul). Esta técnica se basa en el hecho de que las células vivas tienen íntegra la membrana celular, mientras que en las células muertas que tienen la membrana dañada el colorante penetra lo cual ocasiona la tinción.

Para ello se mezclaron alícuotas de 10 μ L de la suspensión de las células con 10 μ L del colorante y se colocaron en la cámara de Neubauer, la cual se evaluó a través del microscopio de luz en un aumento de 10X para poder realizar el conteo de las células. Esto se realizó por duplicado y se expresaron los resultados en porcentaje.

6. Ensayo cometa para evaluar la cinética reparativa

La técnica consiste en preparar laminillas embebiendo células en agarosa para darles soporte, posteriormente, se sumergen en una solución de lisis la cual es una solución con alto contenido de detergentes y sales para lisar las membranas celulares, después, las laminillas son sumergidas en un amortiguador alcalino durante 10 minutos para posteriormente exponerlas a un campo eléctrico por 10 minutos a 25 V y 300 mA (0.8V/cm). Después se neutralizan con una solución a base de Tris, pH 7.5 para después ser deshidratadas con alcohol al 96% y teñidas con 20 μ L de bromuro de etidio para poder analizarlas al microscopio de epifluorescencia a un aumento de 20X (Figura 6). Para detalles

metodológicos ver ANEXO 1. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado cada uno de ellos y de cada laminilla se evaluaron 50 núcleos. El análisis se realizó, dado que el microscopio está acoplado a un digitalizador de imágenes, mediante el programa KOMET v.31 de Kinetic Imagin. De los parámetros que despliega el programa, nosotros utilizamos el denominado "Olive Tail Moment" (OTM) que es el que se muestra en las gráficas. Otra forma de evaluar la genotoxicidad, fue asignando categorías de daños a las células, la primera de ellas consideró a las células que no presentaban fragmentación y sólo se observaba el ADN compacto, a éstas se les denominó sin daño; la segunda categoría fue aquella en donde las imágenes presentaban tanto cabeza como cola del cometa, llamadas con daño, y por último a aquellas que presentaban sólo fragmentación sin que hubiera una cabeza de cometa bien definida (totalmente dañadas).

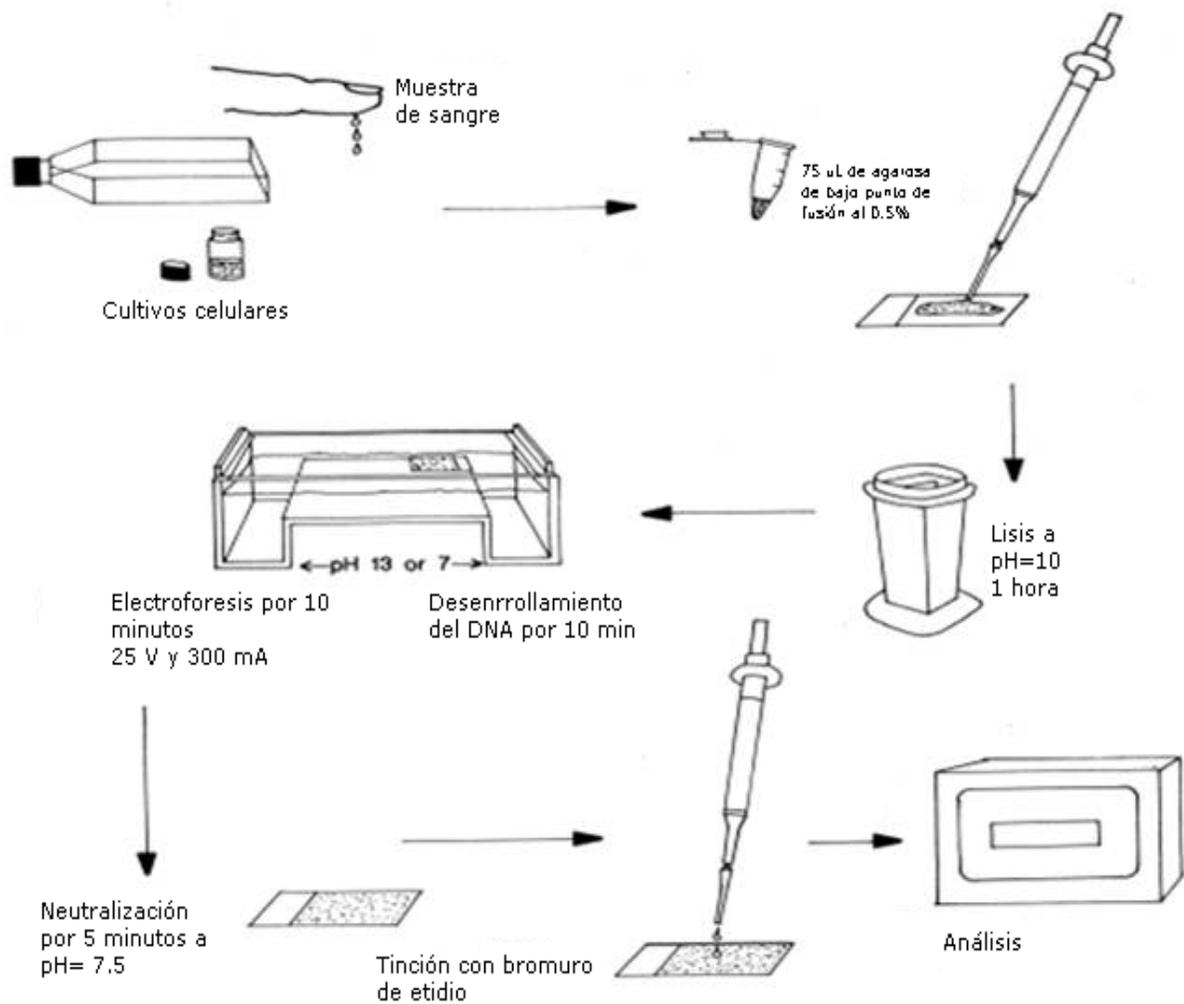


Fig 6. Esquema de la metodología del Ensayo cometa o electroforesis unicelular. (Modificado de Rojas et al., 1999).

La cinética reparativa se evaluó mediante esta metodología asumiendo que la exposición a luz UV genera lesiones tridimensionales en el ADN que reclutan a la maquinaria de reparación por escisión de nucleótidos en pocos minutos (Alapetite C, et al, 1997; Kleijer W, et al, 2007; Andrzej et al, 2008; Trzeciak AR, et al. 2008) y este mecanismo es el que genera los rompimientos de cadena sencilla en el ADN que son detectados por la electroforesis unicelular. De tal manera que esperamos que a partir de una frecuencia de rompimientos basal, que se incrementa tras la exposición al reto con luz UVc sea posible apreciar una

disminución en el número de rompimientos a través del tiempo si es que los mecanismos de reparación no son eficientes o bien, que se mantengan de la misma magnitud o mayor si es que los mecanismos de reparación son eficientes (figura 7).

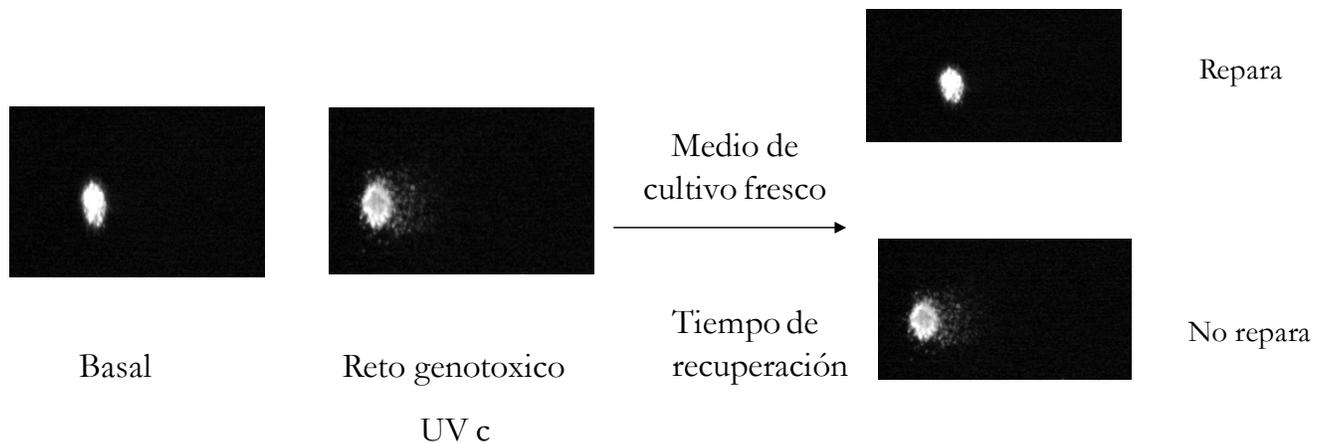


Figura 7. Esquema representativo del ensayo del reto mediante electroforesis unicelular para determinar capacidad reparativa.

7. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados por categorías de daños y viabilidad se empleó la prueba ANOVA con la corrección de Bonferroni, realizado por el programa Graph PAD In Stat, versión 1.14 (1990).

El análisis de las cinéticas reparativas se realizó mediante una prueba estadística paramétrica, t de Student, empleando el programa Graph PAD In Stat, versión 1.14 (1990). El intervalo de confianza establecido fue del 95% con distribución de dos colas.

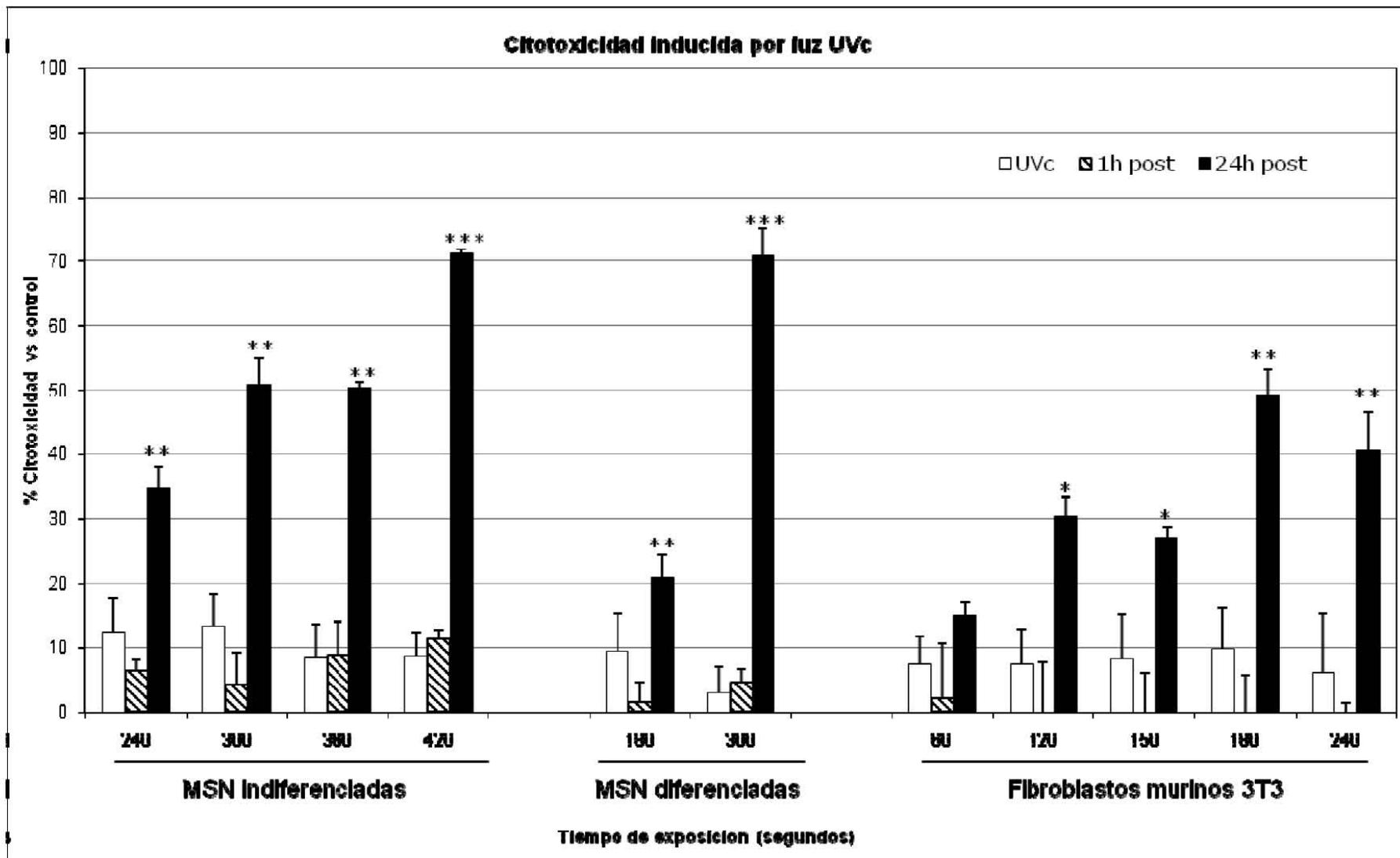
VIII. RESULTADOS

1. Citotoxicidad

Los resultados obtenidos para determinar el tiempo de exposición a radiación UVc en el modelo indiferenciado a través de curvas de citotoxicidad, se muestran en el gráfico 1. La citotoxicidad de la radiación UVc en las neuronas diferenciadas se determinó empleando tiempos de exposición semejantes a los puntos de mayor respuesta en el neuroblastoma indiferenciado y los fibroblastos 3T3 cuyos resultados se muestran en el gráfico 1. En él es posible apreciar que la citotoxicidad inmediatamente después de la exposición fue baja al igual que a la hora de recuperación; sin embargo tras 24 horas postratamiento se observan valores estadísticamente significativos.

Dado que se conoce que los fibroblastos murinos 3T3 tienen atenuada la subvía de reparación global del genoma (GGR) y que esto los hace más sensibles a los daños ocasionados por la luz UV, se empleó esta línea celular como un modelo sensible para detectar alteraciones en la reparación del DNA. Esta sensibilidad alta se determinó al exponer estos fibroblastos a los mismos tiempo de exposición a UVc que las células MSN indiferenciada mostrando una citotoxicidad muy elevada (datos no mostrados). Es por ello que decidimos utilizar tiempos de exposición a UVc más cortos, cuyos resultados se muestran en el gráfico 1. En donde se muestra que tienen el mismo comportamiento que las células MSN tanto indiferenciadas como diferenciadas, es decir, inmediatamente después de la exposición y tras 1 h de recuperación no hay cambios en la citotoxicidad, pero si los hay a las 24 h de recuperación.

Los resultados de citotoxicidad determinados por una tinción de exclusión mostraron efectos significativos sólo 24h después de la exposición, lo cual sugiere que las células mueren al no reparar los daños ocasionados en el DNA.



Grafica 1. Citotoxicidad determinada mediante la tinción de exclusión con azul tripano en células MSN indiferenciadas, MSN diferenciadas y fibroblastos 3T3, expuestas a luz UVC por diferentes periodos de tiempos. ANOVA con corrección de Bonferroni * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.001$ vs control y *** $p < 0.0001$ vs control.

2. Genotoxicidad y Cinética Reparativa

El primer análisis de los resultados de genotoxicidad determinados mediante la electroforesis unicelular se realizó por categorías de daño, estableciendo tres categorías, a) núcleos sin daño (aquellas imágenes en circunferencia sin fragmentación de ADN), b) núcleos dañados (aquellas imágenes semejantes a un cometa, en las cuales hubo fragmentación de ADN) y c) núcleos totalmente dañados (aquellas imágenes semejantes a nubes conformadas por ADN fragmentado en su totalidad). Estos resultados se muestran en los gráficos 2,3 y 4 para las células indiferenciadas, diferenciadas y los fibroblastos murinos 3T3 respectivamente.

Los resultados del neuroblastoma MSN en estado indiferenciado (gráfico 2) muestran que en los controles la distribución por categorías se concentró en núcleos sin daño y núcleos dañados en su mayoría. Sin embargo, esto cambia tras la exposición a luz UVC (panel A) ya que la población de células se concentra prácticamente en su totalidad en la categoría de núcleos con daño, desapareciendo la categoría de núcleos sin daño. Al darles el tiempo de recuperación de una hora se observó que sigue predominando la categoría de núcleos con daño (panel B). En el tiempo de recuperación de 24 horas hay un cambio estadísticamente significativo en la categoría de núcleos totalmente dañados, lo cual nos indica que la distribución por categorías se concentro en núcleos con daño y totalmente dañados (panel C).

En el caso de las células diferenciadas (gráfico 3) los controles se distribuyen en las categorías de células sin daño y células con daño. Cuando estas

células son irradiadas se nota una tendencia a la desaparición de la categoría de células sin daño, aunque estadísticamente no se presenta un cambio significativo. En el caso de la categoría de núcleos totalmente dañados solo se muestra una diferencia significativa a los 300 s de exposición, este mismo comportamiento se observa en 1 h postratamiento (panel B). Sin embargo a las 24 horas no se observó cambio en ninguna de las categorías (panel C).

Para los fibroblastos murinos 3T3 (gráfico 4) el comportamiento de los controles es similar al de las células MSN indiferenciadas y diferenciadas. Cuando estas células son irradiadas la categoría de sin daño desaparece y se nota una tendencia al aumento en la categoría de totalmente dañadas (panel A). Después de darle una hora de recuperación se observó que estadísticamente no hay cambios significativos en ninguna de las categorías (panel B); aunque se nota una tendencia de aumento en la categoría de totalmente dañadas. A las 24 horas postratamiento vuelve a haber un cambio significativo en la categoría de sin daño, y sólo se presenta un cambio significativo en la categoría de totalmente dañadas en la exposición a 240 segundos aunque muestra tendencia a incrementarse conforme aumenta el tiempo de exposición (panel C).

Una vez determinado que la mayoría de la población celular analizada se encontraba en la categoría de núcleos con daño, nos dimos a la tarea de evaluar a esta población nuclear de forma cuantitativa con el programa KOMET v.31 de Kinetic Imagin, utilizando el parámetro de Olive Tail Moment (OTM) el cual integra los niveles de fragmentación del ADN y la distancia a la que migran dichos

fragmentos en el campo eléctrico en un plano tridimensional; estos resultados se muestran en el gráfico 5.

Para el caso de las células MSN indiferenciadas se observa un cambio significativo con respecto a los controles después de la exposición a UVc y esta tendencia se mantiene tras los tiempos de recuperación de 1 y 24 horas habiendo un incremento en el valor de dicho parámetro conforme se incrementa el tiempo de exposición.

En el caso de las células MSN diferenciadas se observan valores elevados en la genotoxicidad inducido por la luz UVc. En el caso de exposiciones por 180 segundos hay cambios estadísticamente significativos con respecto al control, aunque se aprecia que a la hora y a las 24 horas postratamiento el daño en el ADN permanece. A los 300 segundos también hay diferencias estadísticamente significativas; sin embargo en este caso se observa que la genotoxicidad disminuye conforme pasa el tiempo de recuperación aunque no hay diferencias a través de los periodos de recuperación establecidos.

Los fibroblastos 3T3 muestran un incremento estadísticamente significativo inmediatamente después de la exposición, al igual que tras la hora y a las 24 horas de postratamiento. Es decir, los incrementos en el OTM inducidos por la UVc permanecen aún después de las 24 h postratamiento.

En el gráfico 6 se muestra el porcentaje de reparación con respecto a los controles para las células MSN indiferenciadas, diferenciadas y los fibroblastos 3T3. En esta se puede observar que las células MSN indiferenciadas no reparan los daños ocasionados por la luz UVc, sólo en el caso de los 240 segundos de

exposición se aprecia que a la hora de recuperación éstas reparan los daños sólo en un 50% y a las 24 horas no lo remueven en su totalidad.

Las células MSN diferenciadas expuestas a 180 segundos de UVc no reparan, mientras que tras la exposición a 300 segundos, éstas reparan el daño generado por la luz UVc de manera parcial. Los fibroblastos murinos repararon de manera parcial los daños ocasionados por la luz UVc si bien, no regresan al estado basal éstos si muestran una tendencia a remover los daños mas eficientemente que el neuroblastoma.

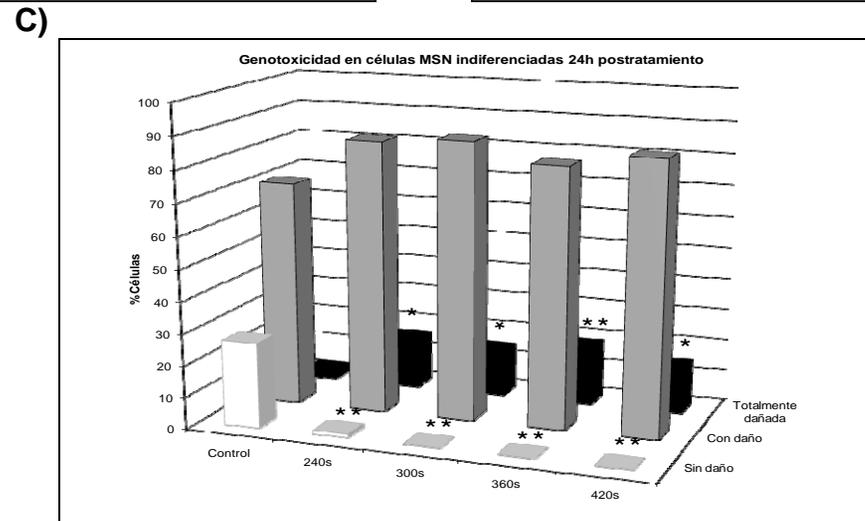
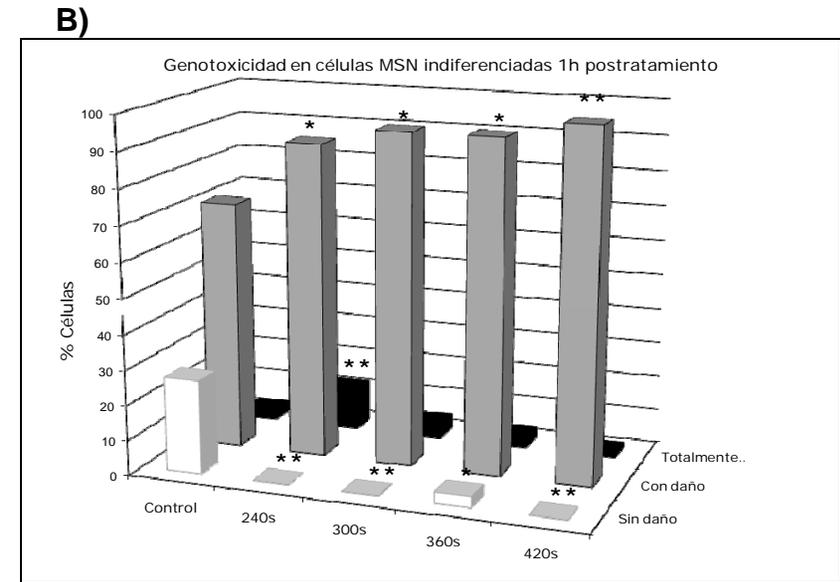
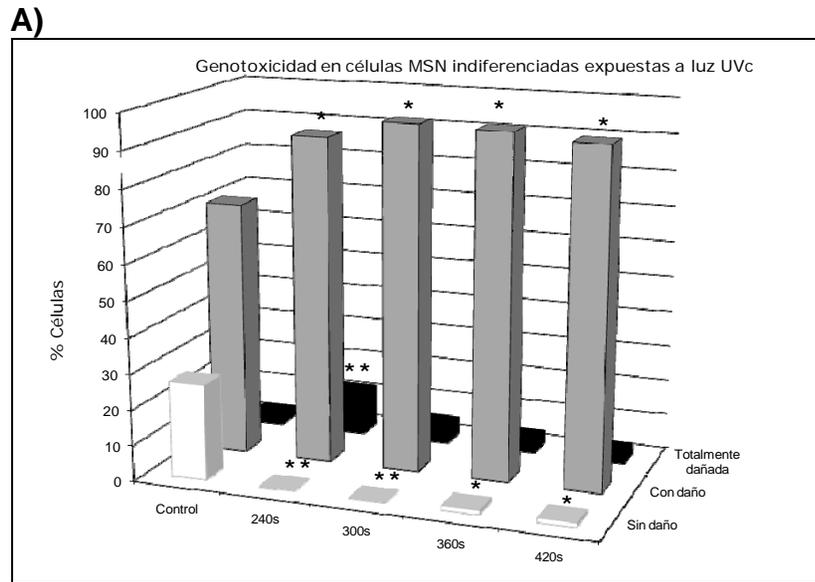
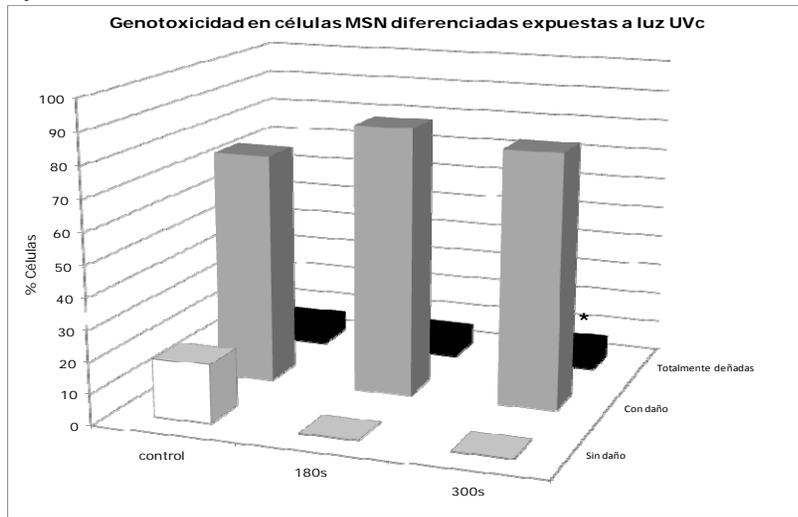
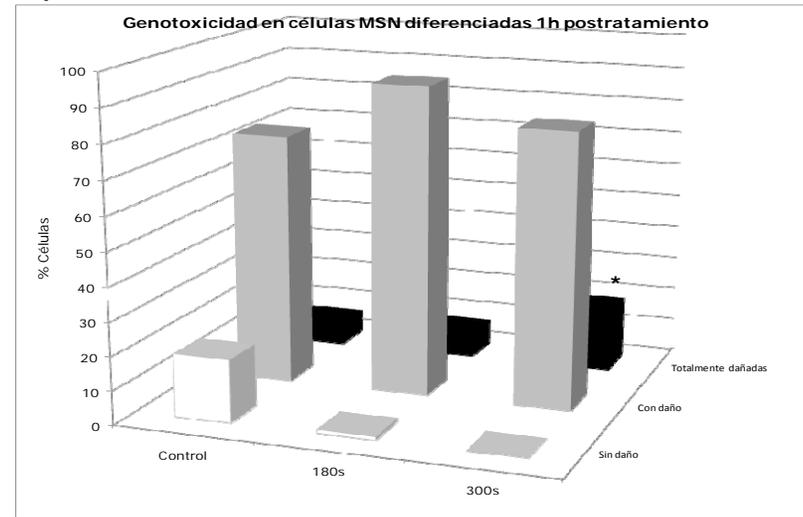


Grafico 2. Genotoxicidad por categorías de daño en células MSN indiferenciadas expuestas a luz UVc. A) Exposición a luz UVc. B) 1 hora postratamiento. C) 24 h postratamiento. ANOVA con corrección de Bonferroni; * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs control

A)



B)



C)

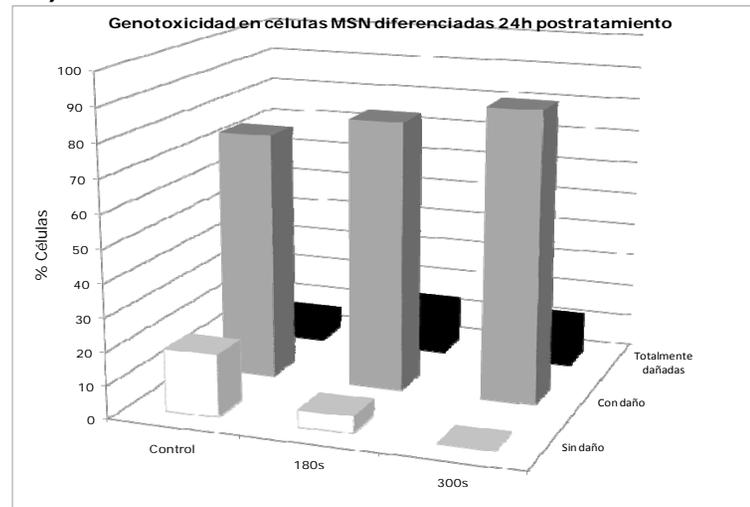


Grafico 3. Genotoxicidad por categorías de daño en células MSN diferenciadas expuestas a luz UVc. A) Exposición a luz UVc. B) 1 hora postratamiento. C) 24 h postratamiento. ANOVA con corrección de Bonferroni * $p < 0.05$ vs control.

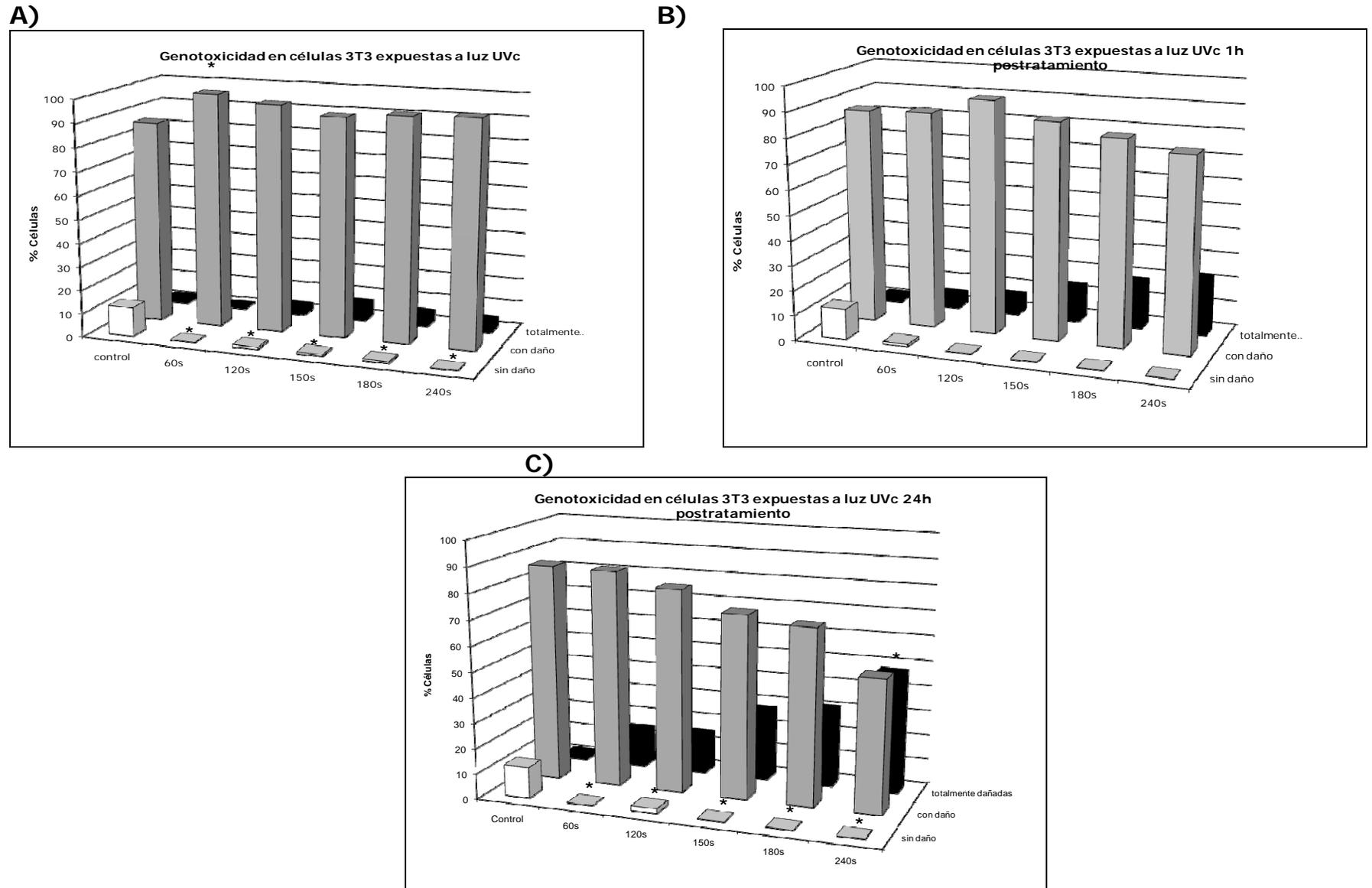
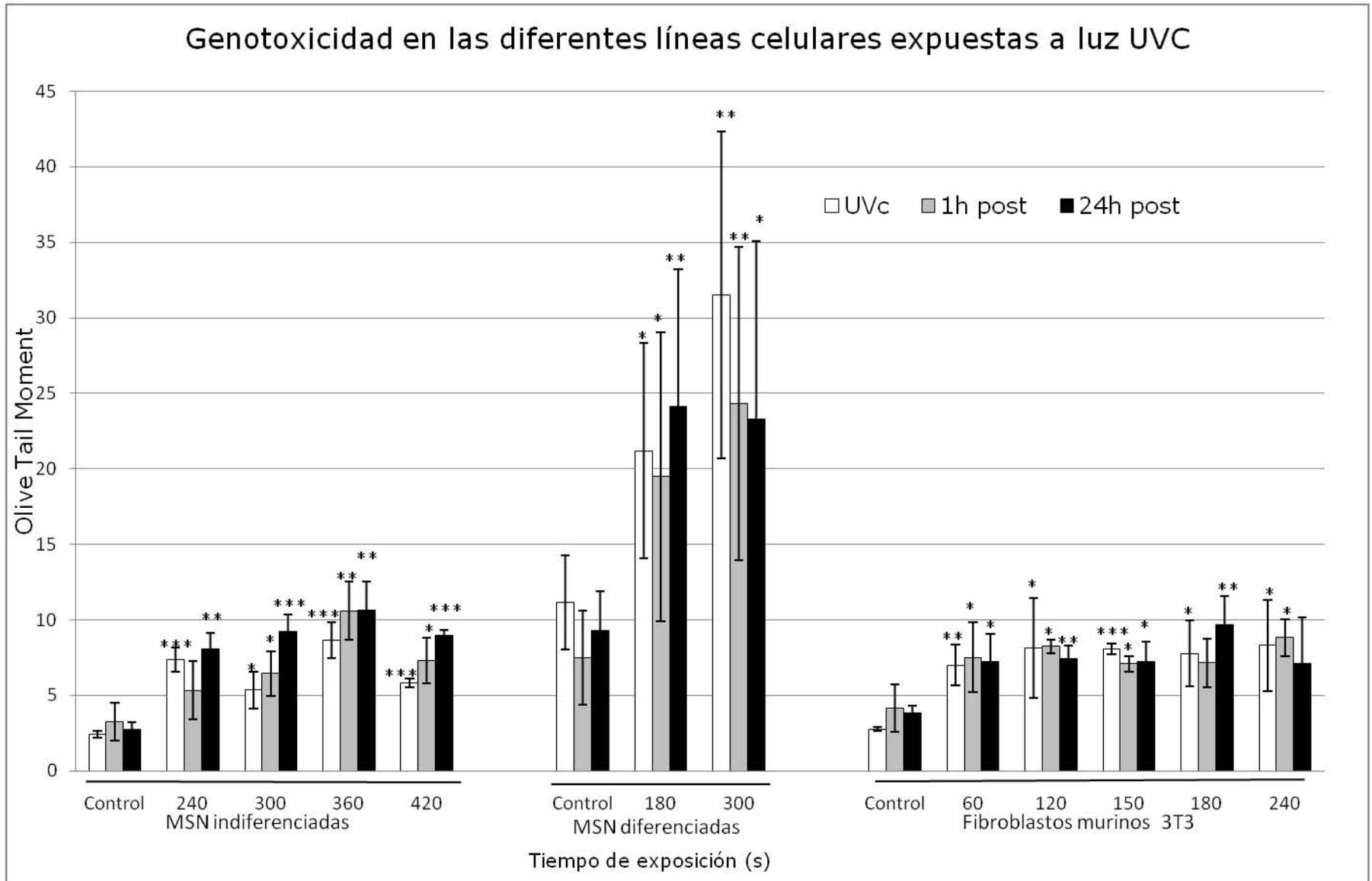


Grafico 4. Genotoxicidad por categorías de daño en fibroblastos 3T3 expuestas a luz UVc. A) Exposición a luz UVc. B) 1 hora postratamiento. C) 24 h postratamiento. ANOVA con corrección de Bonferroni * $p < 0.05$ vs control.



Grafica 5. Genotoxicidad determinada mediante la electrofresis unicelular alcalina en células MSN indiferenciadas, MSN diferenciadas y fibroblastos 3T3, expuestas a luz UVC por diferentes periodos de tiempo. t Student *p< 0.05 vs control, **p< 0.001 vs control, *p< 0.0001 vs control.**

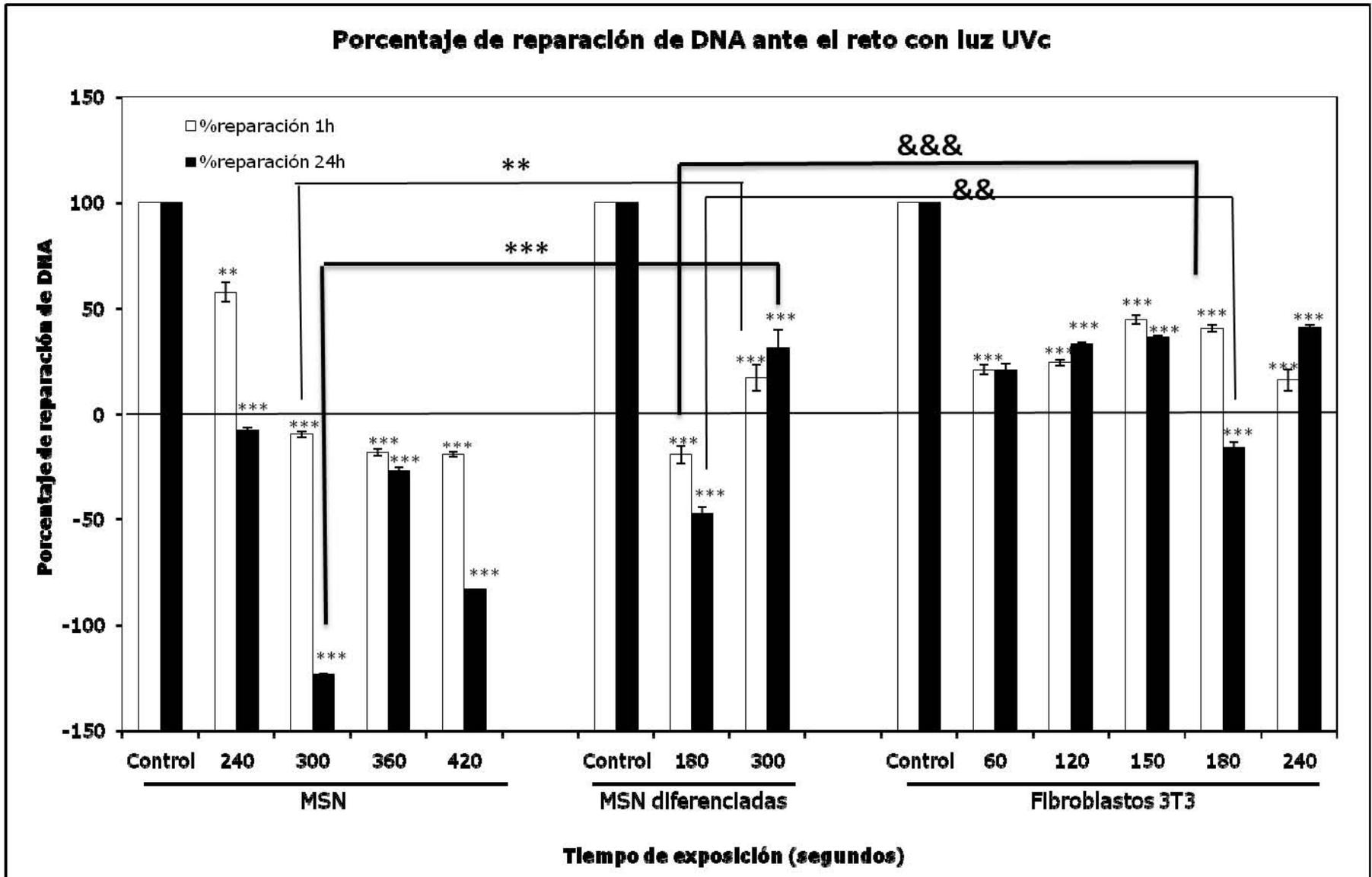


Grafico 6. Porcentaje de reparación en células MSN indiferenciadas, MSN diferenciadas y fibroblastos 3T3 expuestos a luz UVc; 1hora y 24 horas postratamiento. ANOVA con corrección de Bonferroni **p<0.001 vs control y ***p<0.0001 vs control. **p<0.001 diferenciadas vs indiferenciadas y ***p<0.0001diferenciadas vs indiferenciadas.&& p<0.001 diferenciadas vs 3T3 y &&& p<0.0001diferenciadas vs 3T3.

IX. DISCUSIÓN

IX. DISCUSIÓN

Los efectos biológicos de la exposición a luz UVc, se caracterizan por la generación de distorsiones tridimensionales del DNA, tales como los (6-4) fotoproductos y los anillos de ciclobutano. Estas lesiones no causaron efectos citotóxicos al término de la exposición a luz UVc e incluso 1 hora postratamiento; sin embargo, 24 horas postratamiento ya se manifestaron. Este resultado se esperaba de cierta manera puesto que el método empleado para determinar la citotoxicidad se basa en cuantificar lesiones a nivel de la estructura celular (integridad de la membrana), lo cual es un proceso que poco tiene que ver con la generación inmediata de las lesiones en el DNA. Sin embargo a 24 horas postratamiento, cuando ya fueron retados los mecanismos de reparación del DNA, ya pueden manifestarse como efectos citotóxicos si es que no fue posible remover las lesiones del DNA y por ende entablar un proceso de muerte que si es detectado por el método.

La reparación del DNA a través de la NER repara los (6-4) fotoproductos y los anillos de ciclobutano que son producto de la radiación UV. Si bien se asume que todos los tipos celulares cuentan con varios mecanismos de reparación del DNA, la reparación de las neuronas es un área de gran incertidumbre hoy en día. Es por ello y con base en la propuesta de que las neuronas al diferenciarse pierden la reparación global del genoma (subvía de NER) y sólo mantienen la reparación acoplada a la transcripción (subvía de NER), que en el presente proyecto se evaluó la eficiencia de la reparación en el modelo de diferenciación

neuronal MSN. Para ello, evaluamos la cinética reparativa, mediante la electroforesis unicelular alcalina, ante el reto con luz UVc en el modelo indiferenciado y diferenciado y la comparamos con células 3T3 las cuales tienen atenuada la subvía de GGR (gráficos 5 y 6). Nuestros resultados mostraron que el neuroblastoma humano MSN no refleja diferencias en la eficiencia de los mecanismos de reparación del DNA en función de su estado de diferenciación; puesto que las neuronas indiferenciadas en las cuales esperábamos una mayor eficiencia en la reparación únicamente repararon el 50% de las lesiones en la dosis de exposición más baja. Mientras que la capacidad de remoción de los rompimientos en el DNA ocasionados por la luz UVc, fueron parcialmente removidos en las neuronas diferenciadas (mayor dosis) y las células 3T3, que sabemos tienen atenuada la reparación global del genoma. Es decir, la capacidad parcial de reparación de las células murinas se esperaba y refleja que la poca eficiencia de la respuesta depende de la sub vía de reparación acoplada a la transcripción (TCR). Esta perspectiva está de acuerdo a varios grupos (Vreeswijk MP, et al., 2009; Hanawalt P, 2001; Nospikel T, 2008) quienes reportan que en células murinas los anillos de ciclobutano son removidos selectivamente por TCR de la hebra transcrita de genes activos. Así mismo, proponen que en células humanas, los anillos de ciclobutano son removidos por TCR y reparación global del genoma (GGR), siendo removidos más rápido de la hebra transcrita de genes activos. Mientras que los 6-4PP son reparados por GGR aún más rápido que los anillos de ciclobutano de ambas hebras, la transcrita y la no transcrita. De ahí que las puntualidades en funcionamiento sólo podrán dilucidarse si se cuantifican las

lesiones por separado y la eficiencia diferencial entre la hebra transcrita y no transcrita.

Si bien este modelo de diferenciación no refleja las diferencias entre la capacidad de reparación, en parte puede deberse a que las lesiones causadas por la luz UV también pueden repararse mediante el mecanismo de escisión de bases, el cual no ha mostrado tener una funcionalidad diferencial dependiente del grado de diferenciación de la célula. Por otro lado, también hay que considerar que la capacidad reparativa está evaluada de forma indirecta y si además consideramos que a las 24 horas post tratamiento hay un porcentaje alto de células muertas, es difícil evidenciar el fenómeno. Para ello es necesario aislar las células vivas y evaluar en ellas la capacidad de reparación del ADN, al igual que determinar el número de células que están en apoptosis. Si bien se ha propuesto que el daño inducido por la luz UV finalmente desencadena apoptosis en un periodo de hasta 8 horas postratamiento, también podría explorarse la capacidad reparativa a través del tiempo, ya que muy probablemente al tener una mezcla de células vivas y muertas y evaluando la capacidad reparativa temprana (1 hora) y tardía (24 horas) al postratamiento estamos enmascarando el fenómeno de interés (reparación). Así mismo, es relevante mencionar que estrictamente no se está evaluando la funcionalidad de la reparación por escisión de nucleótidos, y se asume que es la única participante dado el estímulo de la luz UV.

Finalmente hay que considerar el hecho de que desconocemos si las células MSN tanto indiferenciadas como diferenciadas tienen un número de genes activos que sea lo suficientemente diferente como para reflejar diferencias en la

capacidad de reparación que se puedan acunar a la reparación acoplada a la transcripción.

X. CONCLUSIONES

- Las células de neuroblastoma humano MSN diferenciadas tienen más efectos citotóxicos que las indiferenciadas mientras que los fibroblastos murinos 3T3, fueron los más radiosensibles.
- Las células de neuroblastoma humano MSN indiferenciadas no reparan el daño inducido por la luz UVc.
- Las células de neuroblastoma humano MSN diferenciadas reparan parcialmente el daño inducido por la luz UVc en la dosis de mayor exposición.
- Los fibroblastos murinos 3T3 tienen capacidad de reparación del DNA limitada, aunque de mayor eficiencia que el neuroblastoma MSN.
- El estado de diferenciación en las células MSN le confiere capacidades reparativas diferentes para remover daños que ocasionan distorsión de la cadena de DNA como el daño inducido por luz UVc.
- El modelo de diferenciación neuronal, MSN no refleja la propuesta planteada por lo que se rechaza la hipótesis planteada: "Las células de neuroblastoma humano en estado indiferenciadas repararan con mayor eficiencia los daños generados por la luz U.V. que las células diferenciadas".

ANEXO 1.

SOLUCIONES REQUERIDAS

Agarosa Regular 0.5%

Agarosa regular 125 mg/25ml dH₂O

Agarosa de bajo punto de fusión 0.5%

Agarosa de bajo punto de fusión 125 mg/25ml dH₂O

Solución Stock de Lisis pH 10

NaCl 146.1 g

EDTA₂Na 37.2g

Tris 1.2g

Se disuelven en 890 ml de H₂O, se ajusta el pH a 10 y se afora a 1000mL

Solución NaOH 10N

NaOH 400 g

Disolver los 400g de NaOH en 1000 mL de agua destilada.

Solución EDTA 200 mM pH 7.5

EDTA disódico 74.4g

Disolver los 74.4 de EDTA disódico en 1000 mL de agua desionizada.

Solución amortiguadora Tris pH 7.5

Tris base 48.5g

Llevar a 100 ml después de ajustar el pH a 7.5 con HCl concentrado

Solución de tinción Bromuro de etidio

Stock 10X 10 mg en 50 ml

Para usarla tomar 1 ml del stock 10X y agregar 9ml dH₂O

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS I

CAPA #1

Antes de comenzar cualquier experimento se debe preparar al menos, el número exacto de laminillas que se pretende utilizar. Para ello se requiere de agarosa regular 0.5% (0.5g/100ml H₂O), laminillas nuevas o pre-lavadas con solución jabonosa, micropipeta 200 µl y sus respectivas puntas.

Modo de preparación:

- Licuar el agarosa en el microondas por algunos segundos, hasta que esté completamente transparente.
- Colocar sobre la laminilla 150 µl de esta agarosa y extenderla con la ayuda del dedo (limpio).
- Colocar la laminilla en una charola resistente al calor e incubarla en una estufa a más de 60°C.

Una vez deshidratadas las laminillas, se marca con un lápiz en el extremo inferior derecho del esmeril, la cara que tiene la capa de agarosa para guardarlas en una caja, protegidas del polvo.

*Nota: Las laminillas pueden ser utilizadas inmediatamente después o guardarse protegidas del polvo y humedad.

PREPARACIÓN DE SOLUCION DE LISIS

Esta solución debe prepararse antes de comenzar a procesar las muestras biológicas, para que al término de la preparación de las laminillas, ésta se encuentre fría.

Para ello se mezcla:

- 40 ml de solución stock de lisis pH 10
- 4 ml de DMSO
- 400 µl de Triton X-100

Se mezclan los reactivos y se apreciará una reacción exérgica la cual se verterá en un vaso Köppling opaco, o se mantendrá protegido de la luz en refrigeración hasta el término de la preparación de laminillas. Hay que considerar que a cada vaso le caben 10 – 12 laminillas, para preparar las necesarias dependiendo de el # de laminillas que se vaya a preparar.

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS II

CAPA #2

Esta capa se prepara ya que se tiene la muestra biológica a emplear**.

Una vez que se tiene la muestra (ya sea el botón de células o la suspensión celular) se le agrega por cada laminilla 75 µl de agarosa LMP 0.5%, se resuspende con una micropipeta, evitando hacer burbujas y se extiende sobre la laminilla que tiene la 1ª capa de agarosa, posteriormente se coloca un cubreobjetos (nuevo o pre-lavado con agua jabonosa) y se guarda en el refrigerador o cuarto frío por unos minutos (2-5 minutos), hasta que solidifique la capa.

** Obtención de muestras.

- Las muestras de cultivos celulares (tratamientos in vitro). Se colectan las células después de generar una suspensión celular tomando una alícuota que contenga aprox. 10,000 células por laminilla.
- Control interno de corrida. Independientemente del tipo de experimento que se esté corriendo, siempre se debe preparar un control de linfocitos aislados con un daño previamente inducido, los cuales se encuentran alícuotados y guardados en el REVCO (-70 °C), se pueden preparar 2 laminillas por cada uno de éstos tubos.

CAPA #3

Una vez sólida la 2^a capa de agarosa, con cuidado se desliza el cubreobjetos hacia uno de los lados, sin regresarla sobre si misma. Se toman otros 75 µl de LMP 0.5% y se colocan sobre la laminillas que contiene las 2 capas previas y se extiende la agarosa con el mismo cubreobjetos. Nuevamente las laminillas se refrigeran hasta que la capa solidifica.

LISIS

Al terminar de preparar las laminillas, se les quita el cubreobjetos, desplazándolo hacia uno de los lados y se colocan por pares de laminillas colocados espalda con espalda de tal manera que los geles queden expuestos en el vaso Köppling que previamente se preparó y se encuentra en el refrigerador.

La incubación en esta solución debe ser por lo menos 1 hora a 4 °C.

DESENRROLLAMIENTO Y ELECTROFORESIS

Primero se prepara el buffer de corrida, para ello se requiere de algunas soluciones preparadas previamente. Se mezcla las soluciones de la siguiente manera: Por cada litro (suficiente para 15 laminillas)

30 ml de NAOH 10 N

5 ml de EDTA

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

Para las cámaras de electroforesis horizontal grandes se requiere 1.5 litros, la capacidad es de 24 laminillas.

45 ml de NaOH 10 N

7.5 ml de EDTA

Aforar a 1500 ml con agua destilada.

Para realizar el corrimiento se requiere montar la cámara de electroforesis horizontal sobre una cama de hielo, sobre la cual se nivela.

Posteriormente se colocan las laminillas con el esmeril hacia el lado derecho, recordando que la posición superior derecha corresponde al control interno de corrida. Una vez colocadas todas las laminillas se vierte el buffer hasta cubrir las laminillas. En este momento se inicia el conteo del tiempo de desenrollamiento, el cual será de 10 minutos para cultivos celulares.

Al término de éste periodo, se inicia el corrimiento de la electroforesis, para ello se conectan los electrodos a la fuente de poder, se checa la posición del voltaje constante lo mas cercano a 25 V, se enciende la fuente de poder y se checa la corriente (mA), la requerida es de 300 mA, si es menor, se agrega buffer y si es mayor se disminuye el volumen del buffer para ajustar la corriente a 300 mA. Cuando se ajustan estos parámetros se inicia el conteo de 120 minutos para muestras de cultivos celulares.

NEUTRALIZACIÓN

Al término de la electroforesis se apaga la fuente de poder y las laminillas son transferidas a una charola, con la cara del gel hacia arriba. Posteriormente se les agrega muy cuidadosamente, con la ayuda de una pipeta, el buffer Tris pH 7.5 y se incuban 1 o 2 veces por 5 minutos.

DESHIDRATACIÓN

Se escurre la mayor cantidad de buffer de neutralización y con una piseta se agrega muy cuidadosamente alcohol absoluto y se incuban unos minutos,

posteriormente se escurre el exceso y se ponen las laminillas en posición vertical recargadas sobre alguna pared hasta que sequen completamente. Posteriormente se guardan en una caja protegidas del polvo, hasta su evaluación.

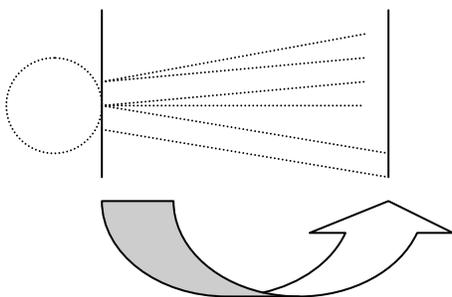
TINCION

Usando guantes, se agregan 20 μ l de solución de bromuro de etidio sobre la laminilla y se coloca un cubreobjetos.

ANÁLISIS

Se enciende la lámpara de fluorescencia del microscopio, se escoge el objetivo de 20X, se coloca la laminilla sobre la platina se abre el filtro de fluorescencia que detecta bromuro (emite en verde) y se enfoca la laminilla, localizando con la ayuda de los tornillos macro, y micro métricos el campo de las células. Posteriormente se identifica la reglilla graduada y se mide la longitud de la cola de los cometas, anotando el número de rayas que la abarcan.

Se evalúan de 25-50 cometas por laminilla. Por otro lado, con la ayuda de un contador se determina la proporción de un total de 100 células, la cantidad de células con imagen de cometa, aunque sea muy cerrado con respecto a la de células con daño total o nubes.



Longitud Cola del Cometa



Nube o Célula con daño total

XI. BIBLIOGRAFÍA

Alapetite C, Benoit A, Moustacchi E, Sarasin A. The comet assay as a repair test for prenatal diagnosis of xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy. *J Invest Dermatol* 1997; 108:154-159.

Andrejz R, Trzeciak JB, Mk Evans. A modified alkaline comet assay for measuring DNA repair capacity in Human populations *Radiat Res* 2008; 169:110-121.

Araki M. Centrosome protein centrin 2/Caltractin 1 is part of the Xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision Repair. *J Biol Cell* 2001; 276:18665-18672.

Biedler J, Helson L, Spengler B. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human Neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973; 33:2643-2652.

Castel V, Cañete A, Noguera R, Navarro S, Oltra S. Neuroblastoma. *Clin Transl Oncol* 2005; 7:3; 133-145.

Castleberry RP. Neuroblastoma. *Euro J Cancer* 1997; 33:9; 1430-1438.

Hammond C. Cellular and Molecular Neurophysiology. 3rd Edition Elsevier, China 2008, 4-6. ISBN: 978-0-12-374127-1. pp 1-4.

Hanawalt PC. Revisiting the rodent repairadox. *Environ Mol Mutagen* 2001; 38:89-96.

Hanawalt PC. Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 2002; 21:8949-8956.

Hoeijmakers J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411:366-374.

Kleijer W, van der Sterre M, Garritsen V, Raams A, Jaspers N. Prenatal diagnosis of Xeroderma Pigmentosum and Trichothiodystrophy in 76 pregnancies at risk. *Prenat Diagn* 2007;27:1133-1137.

Nospikel T y Hanawalt P. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA repair* 2002; 22:59-75.

Nospikel T y Hanawalt P. Terminally differentiated human neurons repair transcribed genes but display attenuated global DNA repair and modulation of repair gene expression. *Mol Cell Biol* 2000; 20:1562-1570.

Nospikel T. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience* 2007; 145:1213-1221.

Nospikel T. Nucleotide excision repair and neurological diseases. *DNA Repair* 2008; 7:1155-1167.

Nospikel T. Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci.* 2009a; 66:994-1009.

Nospikel T. So DNA repair really is that important?. *Cell Mol Life Sci.* 2009b; 66:965-967.

Payne A y Chu G. Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage. *Mutat Res* 1994; 310:89-102.

Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D, Hall W, La Mantia AS, Mc Namara J, White L. Neuroscience. 4th Edition Sinauer Associate. Inc. Sunderland, Massachusetts USA 2008, pp 5,7.

Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP, Smith RG. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. J Natl Cancer Inst 1986; 76:375-387.

Rojas E, Lopez MC, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 722:225254.

Simpson P, Bacha J, Palfreyman E, Woollacott A, McKernan R, Kerby J. Retinoic Acid-Evoked Differentiation of Neuroblastoma Cells Predominates over Growth Factor Stimulation: An Automated Image Capture and Quantitation Approach to Neuritogenesis. Anal Biochem 2001; 15:163-169.

Sugasawa K. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDB-ubiquitin ligase complex, and DNA repair. J Mol Hist 2006; 37:189-202.

Tornaletti S y Pfeirfe G. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. Bioessay 1996; 18:221-228.

Trzeciak AR, Barnes J, Evans MK. A Modified Alkaline Comet Assay for Measuring DNA Repair Capacity in Human Populations. Radiat Res 2008; 169:110-121.

Vreeswijk MP, Meijers CM, Giphart-Gassler M, Vrieling H, van Zeeland AA, Mullenders LH, Loenen WA. Site-specific analysis of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in nucleotide excision repair-proficient and -deficient hamster cells: Lack of correlation with mutational spectra. Mutata Res 2009; 26:7-14.

Yang Y, Geldmacher DS, Herrup K. DNA replication precedes neuronal cell death in Alzheimer's disease. J Neurosci 2001; 21:2661-2668.

ATCC. The Global Bioresource Center.

www.atcc.org

Consulta: Mates 25 de febrero y Miércoles 7 de octubre de 2009