

1. Datos del alumno

Villalobos

García

Daniel

56534942

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307295305

2. Datos del asesor

Mendieta

Condado

Edgar Rubén

3. Datos de la tesis

Caracterización del daño al DNA por administración de Metil-metanosulfonato (MMS), durante la regeneración hepática

29 p.

2014

4. Palabras clave

DNA, Metilación, Daño, Cometa, Reparación.



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.

1. Datos del alumno

Villalobos

García

Daniel

56534942

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307295305

2. Datos del tutor

Dr.

Edgar Rubén

Mendieta

Condado

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Jesús Adolfo

García

Sáinz

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Rolando

Hernández

Muñoz

6. Datos del sinodal 4

M en C

Gabino

De la Rosa

Cruz

7. Datos del trabajo escrito

Caracterización del daño al DNA por administración de Metil-metanosulfonato (MMS), durante la regeneración hepática

29 p.

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Caracterización del daño al DNA por administración de Metil-
metanosulfonato (MMS), durante la regeneración hepática**

TESIS

SOMETIDA A LA FACULTAD DE CIENCIAS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

DANIEL VILLALOBOS GARCÍA

TUTOR: DR. EDGAR R. MENDIETA CONDADO

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2014

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una educación gratuita de calidad.

A la UBIMED por la oportunidad brindada.

Al Dr. Edgar Rubén Mendieta Condado por su confianza y apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, al Dr. Rolando Hernández Muñoz, al Dr. Luis Felipe Jiménez García y al M en C Gabino de la Rosa Cruz por sus comentarios y observaciones realizadas para enriquecer este trabajo.

ÍNDICE	pág.
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	3
DNA	3
Hígado	7
Alquilación	8
OBJETIVO GENERAL	12
Objetivos Específicos	12
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Material	12
Métodos	13
Principio del ensayo del cometa	15
Hepatectomía parcial	16
RESULTADOS	18
Largo de Cola	19
Porcentaje del DNA	20
Momento de la Cola	20
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	28
PERSPECTIVAS	28
BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS	pág.
Figura 1	9
Figura 2	10
Figura 3	11
Figura 4	15
Figura 5	21
Figura 6	21
Figura 7	22
Figura 8	22
Figura 9	23
Figura 10	23
Esquema 1	17
Gráfica 1	19
Gráfica 2	20
Gráfica 3	20

Caracterización del daño al DNA por administración de Metil-metanosulfonato (MMS), durante la regeneración hepática

RESUMEN

Antecedentes: El DNA es susceptible a ataques químicos y físicos que pueden comprometer su estructura y su funcionalidad, habiendo miles de agentes que pueden dañarlo. En mamíferos, las células acumulan daño en el DNA con el paso del tiempo, y el hígado tiene mayor capacidad de reparación en una etapa proliferativa. El Metil metanosulfonato (MMS) es un agente alquilante que daña al DNA en una forma azarosa. El objetivo del estudio fue determinar el daño al DNA causado por el MMS en el hígado regenerante.

Metodología: Se utilizó el ensayo del cometa, que visualiza las rupturas en la molécula de DNA. Las células de hígado se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión en un portaobjetos, para inmovilizarlas. Después se lisaron con tritón en la oscuridad y en frío. Se aplicó corriente eléctrica a los portaobjetos en condiciones alcalinas: 25V por 20 minutos, se neutraliza el pH de los geles y se tiñen con bromuro de etidio. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes se analizan con el software *OpenComet*, para medir el daño en DNA, proveyendo datos semicuantitativos.

Se usaron ratas Wistar de 250g, macho, y se indujo daño al DNA por metilación con Metil metanosulfonato (25 mg/kg de peso); un día después se extirpó 30% de hígado y se sacrificaron 24 h post-hepatectomía.

Resultados: Se observó un incremento en el daño al DNA en los grupos administrados con MMS respecto al grupo control sin MMS, e inesperadamente aumentó el daño en las ratas regenerantes con MMS respecto al hígado extraído durante la hepatectomía del mismo grupo en aproximadamente 50%. También se observó un 60% de más daño en el hígado que se extrajo durante la cirugía sin MMS que en el hígado control sin hepatectomía, posiblemente causado por radicales libres generados durante la hepatectomía. Es necesario tener cautela al realizar esta técnica en células proliferantes, ya que al parecer pueden generar resultados cuya interpretación puede ser sobreestimada, dando la apariencia de un daño mayor.

INTRODUCCIÓN

DNA

El DNA es una macromolécula cuya estructura es una doble hélice apareada por puentes de hidrógeno; está compuesta por deoxinucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster [1]. Como toda macromolécula, el DNA es susceptible a ataques químicos

y físicos que pueden comprometer su estructura y su funcionalidad [2]. Hay miles de agentes que pueden dañar el DNA [2], desde moléculas de agua que pueden desaminar las bases nitrogenadas [3], hasta rayos gamma capaces de romper el esqueleto de la molécula; se estima que una célula puede recibir desde 1500 hasta 7000 ataques, ya sean químicos o físicos, por hora. Estos daños abarcan la metilación de bases, la ruptura de las cadenas, la modificación de bases, entrecruzamiento, etc. [2]. Es importante marcar la diferencia entre daño y mutación, que son los dos tipos de errores más comunes que ocurren en el DNA: el daño es un cambio físico, una alteración en la cadena que compromete su estructura; el daño genético puede ser reconocido por enzimas y por eso puede ser reparado correctamente, siempre y cuando haya información genética disponible para usar como templado. En cambio, la mutación es sólo el cambio de una base por otra, que resulta en una alteración de la información genética, pero sin comprometer su estructura física. Una mutación no puede ser reconocida una vez que esta se ha integrado al genoma, y puede causar aberraciones en la estructura, funcionalidad y expresión de las proteínas que transcribe [4].

La frecuencia con la que ocurren los distintos tipos de daño en el ADN es variable:

- Daño oxidativo: 74000/día/célula [5]
- Depurinación: 10000/día/célula [6]
- Depirimidación: 600/día/célula [7]
- Rupturas de una hebra: 50000/día/célula [8]
- Rupturas de cadena doble: 10/día/célula [9]
- O⁶-metilguanina: 3000/día/célula [8]
- Deaminación: 190/día/célula [8]

Es sabido que, en mamíferos, las células acumulan daño en el ADN con el paso del tiempo. Células tales como neuronas [10] o miocardiocitos, son conocidas por tener una tasa de división celular casi nula o inexistente [11]. Este tipo de células que no son capaces de dividirse ni de diferenciarse se les denomina células terminalmente diferenciadas, y son las que acumulan el mayor daño [12,13].

Todas las células eucariontes tienen un sistema de reparación del DNA. Las células que se dividen continuamente (tales como las células madre hematopoiéticas [14]) son capaces de mantener este sistema de reparación constitutivamente, actuando sobre todo el genoma durante toda su vida [15] por lo que el daño en su DNA aumenta muy lentamente o incluso puede ser revertido, como sucede en las células madre embrionarias. Las células que están diferenciadas pero que aún son capaces de división celular, tales como los melanocitos y los fibroblastos, se denominan intermitentemente mitóticas y, por lo general, se dividen más lentamente o sin una programación regular [12]. Estas células inactivan parcialmente el sistema de reparación, siendo activado otra vez al momento de la división [12,13].

Aunque las células madre tengan una mayor capacidad de reparar el DNA que las células terminalmente diferenciadas [16], irónicamente, células como las neuronas o las células musculares son más resistentes al daño genético. Tiene sentido si se considera que una célula en continua división tiene más probabilidad de entrar en apoptosis cuando su DNA se daña. Esto es debido a que las anomalías genómicas durante la replicación son fuertes señalizadores apoptóticos [11].

La reparación del DNA se divide en 2 grupos de acuerdo a su mecanismo de reconocimiento del daño:

- La reparación global del genoma o GGR, abarca la reparación en todo el genoma [15].
- La reparación acoplada a la transcripción o TCR, actúa durante la transcripción de los genes; es decir, solo repara los genes que son transcritos [15].

La GGR repara cualquier daño en todo el genoma, incluyendo genes activamente transcritos, genes no transcritos y el resto del DNA conocido como no codificante. Este sistema sensa la molécula de DNA en todo momento en busca de distorsiones en la cadena. El complejo proteico XPC-Rad23B se encarga de sensar el DNA de manera constitutiva, siendo capaz de reconocer las distorsiones causadas por los nucleótidos dañados. En caso de tratarse de distorsiones no tan acentuadas, el complejo XPC-Rad23B puede tener dificultades en su detección, por lo que se requiere el complejo DDB (compuesto de DDB1 y XPE/DDB2). DDB tiene una alta afinidad por el DNA dañado, por lo que al unirse a este, genera la distorsión necesaria para que XPC-Rad23B lo reconozca [2,15].

Al reconocer una distorsión, este complejo recluta a TFIIH, un complejo de 10 subunidades que se encarga de formar la burbuja de desnaturalización. Dos de sus subunidades, XPD y XPB, son helicasas opuestas encargadas de abrir la doble hélice para formar la burbuja de desnaturalización [2,15].

Al formarse la burbuja, las proteínas RPA estabilizan las hebras y se recluta a XPA, complejo proteico cuya función se desconoce, pero que se cree se encarga de reconocer cuál de las hebras es la dañada [2,15].

La incisión de la hebra dañada se realiza a ambos extremos de la burbuja de desnaturalización. El corte es realizado por las endonucleasas XPG (la cual corta en el extremo 3') y XPF-ERCC1 (la cual corta en el extremo 5'). Una vez removido el fragmento dañado, el hueco es llenado por la polimerasa δ o ϵ con la ayuda de PCNA, para posteriormente ser unido por la ligasa III [2,15].

Por otro lado, TCR tiene una forma de detección del daño distinta al de GGR. Durante la transcripción, la ARN polimerasa II al encontrarse con un daño es detenida, lo cual es una señal de reclutamiento de las proteínas CSB y CSA; las proteínas CS reclutan a TFIIH (a partir de aquí, la reparación del daño prosigue de igual forma que GGR). GGR y TCR difieren sólo en la forma en que el daño es detectado, pero el mecanismo de remoción del daño es el mismo en ambos mecanismos [2,15].

Las células terminalmente diferenciadas (incapaces de dividirse ni diferenciarse), inactivan la GGR casi en su totalidad, y sólo mantienen la reparación completamente activa en los genes que son continuamente transcritos, a través de la TCR y la reparación asociada al dominio (DAR); de esta última no se conoce el mecanismo por el que actúa, sin embargo, se piensa que se encarga de reparar la hebra de DNA no transcrita de los genes transcritos [12,15,17]. En células con capacidad proliferativa, la reparación por escisión de nucleótido (NER) mantiene la integridad del genoma a través del GGR. Adicionalmente, la TCR repara la hebra de DNA de genes transcritos con mayor prioridad. En células terminalmente diferenciadas, GGR es atenuado casi en su totalidad y el daño se acumula en el genoma. Sin embargo, los genes activos son continuamente reparados a través de TCR y DAR [15,17,18]. Si estas células intentaran reentrar al ciclo celular, los genes previamente silenciados serían activados,

y ya que permanecieron sin ser reparados por años, contienen muchas lesiones, lo que podría resultar en varios escenarios:

-Resumir el ciclo celular resultaría en transcribir genes previamente inactivados y físicamente muy deteriorados. La RNA polimerasa II encontraría muchas lesiones en estos genes, con distintas consecuencias dependiendo el tipo de daño. Algunos impedirán el paso de la RNA polimerasa II, lo que es una fuerte señal para activar la apoptosis [18]. Otros pueden ser ignorados por la polimerasa, pero podría generar errores en el mRNA. Esta mutagénesis transcripcional produciría proteínas inestables o no funcionales, que afectarían el funcionamiento de la célula [10,19].

-Aunque TCR intentara restaurar la hebra transcrita original en estos genes, tendría que utilizar la hebra no transcrita como templado, la cual también tendrá daño acumulado. El proceso de reparación entonces tenderá a introducir mutaciones [10,15,17,20].

-La presencia de tanto daño podría causar la falla de la replicación [20,10].

-La muerte celular puede ser activada por mecanismos genéticos que monitorean la presencia de daño en el DNA. Aunque tales mecanismos se mantienen inactivos en células terminalmente diferenciadas que acumulan daño genético, es posible que pudieran ser reactivados cuando se reinicia el ciclo celular [21,10].

Hígado

El hígado es un órgano cuyas células son intermitentemente mitóticas: a pesar de ser células diferenciadas, retienen la capacidad de replicarse [12]. Aunque la tasa de replicación de los hepatocitos es muy baja (4% en cualquier momento dado [22]), el órgano tiene una gran capacidad proliferativa en respuesta a un daño [11] siendo capaz (en roedores) de regenerar hasta 90% de masa perdida [23]. Sin embargo, debido a su baja tasa de replicación, la mayoría de las células se encuentran en fase G0, por lo que atenúan su sistema de reparación [12,13]. Se estima que el nivel basal de bases alteradas por estrés oxidativo es de 24000 por célula en ratas jóvenes, y de 66000 por célula en ratas viejas [24].

Anteriormente se ha mostrado que los hepatocitos tienen más capacidad de reparación durante la etapa proliferativa que durante la fase G0. Experimentos realizados con rayos gamma muestran que el hígado en regeneración es más eficiente en la reparación de DNA que el hígado quiescente al ser irradiado [25].

Alquilación

Una de las causas importantes de daño es el causado por agentes alquilantes; los cuales son moléculas que contienen un grupo alquilo y que al reaccionar con otros compuestos, lo transfieren a la molécula. Los sitios de modificación del DNA son los mismos para todos los agentes alquilantes; sin embargo, la frecuencia del daño específico varía dependiendo del tipo de agente alquilante, el tipo de nucleótido y la posición del mismo dentro de la cadena de DNA. Hay 2 tipos de agentes alquilantes que reaccionan con el DNA, las nitrosoureas que alquilan principalmente el oxígeno de las bases nitrogenadas y los metanosulfonatos que alquilan principalmente el nitrógeno de las bases nitrogenadas (ambas son incluso capaces de alquilar el esqueleto fosfatado). Estas alquilaciones modifican el DNA (y el RNA), alterando la estructura y estabilidad de la molécula, lo que puede interferir con la replicación y transcripción, encender los *checkpoints* del ciclo celular o inducir apoptosis. De no ser reparados, algunas de estas alteraciones pueden ser citotóxicos o mutagénicos. En general, la alquilación de oxígeno es más mutagénica que las alquilaciones de nitrógeno, pero ambos tipos de daño son citotóxicos y genotóxicos [26].

Entre los tipos de alquilaciones debidas a agentes alquilantes exógenos se encuentran la O⁶-alquilguanina y la O⁴-alquiltimina, así como la N⁷-alquilguanina, N³-alquiladenina, N¹-alquiladenina, y N³-alquilitosina (Fig. 1). Más aún, la frecuencia con la que ocurre cada tipo de daño depende de si la molécula de DNA está en doble cadena o desnaturalizada. Por ejemplo, los nitrógenos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno son menos vulnerables a los ataques alquilantes que los mismos átomos de una cadena desnaturalizada, la cual aparece durante la replicación, la transcripción o la reparación del DNA (Fig. 1).

Las moléculas alquilantes del tipo S_N1 (metilnitrosourea) alquilan tanto oxígenos como nitrógenos, mientras que los de tipo S_N2 alquilan principalmente nitrógenos, aunque en menor medida también oxígeno (Fig. 1).

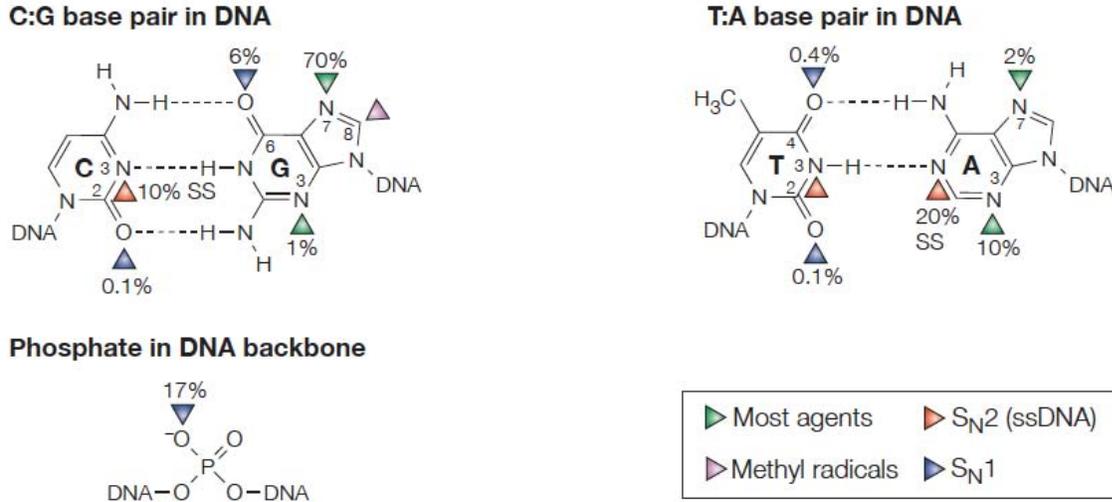


Fig. 1. Sitios de metilación por agentes alquilantes. Las flechas azules indican los oxígenos más frecuentemente metilados por agentes S_N1 . Las flechas naranjas indican los nitrógenos en hebras de una sola cadena más frecuentemente metilados por agentes S_N2 . La flecha rosa indica el sitio metilado por radicales metilo. Las flechas verdes indican los nitrógenos más frecuentemente metilados por agentes tanto S_N1 como S_N2 . Los agentes S_N2 también metilan O^2 -meC, O^2 -meT y los fosfatos, aunque en mucho menor proporción. Los porcentajes indican la relativa abundancia de cada metilación.

Varios mecanismos han evolucionado para reparar el DNA, y algunos de estos se especializan en reparar alquilaciones. Muchos mecanismos de reparación requieren la síntesis de DNA posterior a la remoción del daño, lo que involucra un riesgo de introducir mutaciones, ya sea por un templado dañado o por la misma imperfección de la polimerasa. Sin embargo, existen mecanismos para revertir el daño de forma directa, sin necesidad de remover el nucleótido y sin riesgo de introducir mutaciones.

Mecanismos de reparación tales como MMR (*mismatch repair*), BER (*base excision repair*) y NER (*nucleotide excision repair*) participan en la reparación de bases alquiladas, pero estos 3 mecanismos involucran la síntesis de DNA. La reparación directa (RD) involucra a las proteínas MGMT y ALKBH; enzimas específicas que revierten el daño directamente tanto en ADN como en RNA. De forma específica, BER

y NER reparan 7-metilguanina (7-meG) y 3-metiladenina (3-meA), y DR repara las alquilaciones ubicadas en los átomos que participan en la formación de puentes de hidrógeno [O⁶-metilguanina (O⁶-meG), 1-metiladenina (1-meA) y 3-metilcytosina (3-meC)], no requiere un templado, no resulta en la ruptura de la cadena y no introduce mutaciones [27].

La MGMT puede reparar 2 tipos de daño: O⁶-meG y O⁴-meT. O⁶-meG es muy mutagénico y bloquea a la DNA polimerasa, lo cual lo vuelve citotóxico. Debido a esto, la reparación de O⁶-meG tiene prioridad sobre O⁴-meT. La remoción del metilo sucede en un solo paso por una reacción de metiltransferasa. Al remover el metilo, MGMT lo transfiere a una de sus cisteínas, inactivando a la proteína y restaurando la conformación original del nucleótido (Fig. 2). MGMT, al ser inactivada, ya no es capaz de realizar su función, por lo que es degradada en el proteosoma [27].

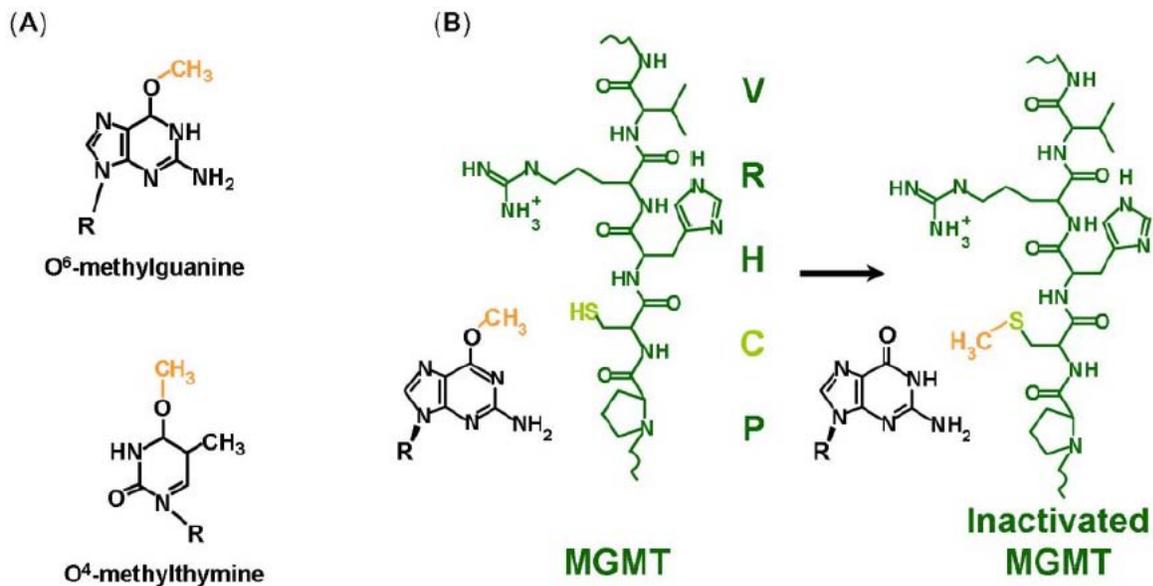


Fig. 2. Catálisis de la desalquilación de bases. A) O⁶-meG y O⁴-meT (sustratos de MGMT). B) El sitio catalítico de MGMT cataliza la reacción de transferencia del grupo metilo del nucleótido dañado al grupo SH de la cisteína 145, inactivando a MGMT en una reacción suicida.

La reparación de las alquilaciones de citosina y adenina en las zonas involucradas en el apareo de bases (ocasionadas por agentes alquilantes del tipo S_N2), es llevada a cabo por la familia de proteínas AlkB. Estas proteínas comprenden dioxigenasas dependientes de Fe(II) y de α -cetoglutarato. Son capaces de remover alquilaciones tanto en DNA como en RNA, incluyendo 1-meA, 3-meC, 1-meG, 3-meT, 1-etA, entre otras. La remoción de alquilaciones es llevada a cabo por las proteínas ALKBH1-3, aunque ALKBH1 sólo está presente en mitocondrias, por lo que en el núcleo son ALKBH2 y ALKBH3 las que reparan el DNA o RNA [27].

La desalquilación realizada por las proteínas AlkB ocurre a través de la transformación de α -cetoglutarato a succinato, liberando CO_2 y formaldehído y dando como producto final la base restaurada (Fig. 3). Los daños mayormente reparados por las proteínas ALKBH son 1-meA y 3-meC, aunque también reparan etilaciones y algunas bases exocicladas. Contrario a MGMT, las proteínas ALKBH si son enzimas verdaderas y pueden catalizar múltiples reacciones, requiriendo sólo ascorbato para reducir el Fe(III) a Fe(II) en el sitio activo y así “reciclar” la actividad de la enzima [27].

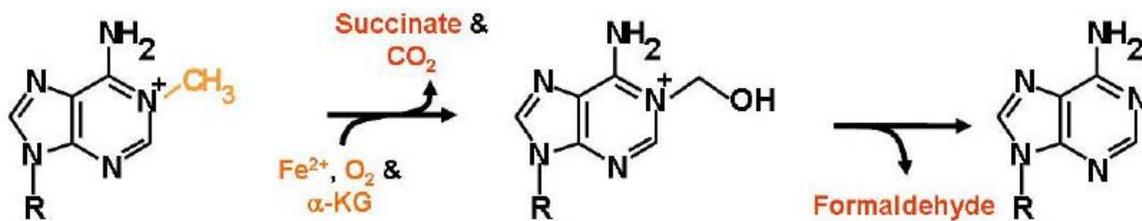


Fig. 3. Catálisis de desalquilación de bases. La enzima ALKBH, con ayuda del O_2 y del α -cetoglutarato, hidroxila el grupo metilo de la base dañada, generando succinato y CO_2 en el proceso. Posteriormente remueve el hidroximetilo, liberando formaldehído.

El metil metanosulfonato o MMS ($C_2H_6O_3S$) es un agente alquilante capaz de reaccionar con el DNA, transfiriendo su grupo metilo a distintas partes del polinucleótido. Esta molécula es del tipo de los metanosulfonatos y actúa por la vía de los S_N2 , por lo que metila el DNA principalmente en los nitrógenos de las bases (un tipo

de daño), aunque también es capaz de alquilar otras zonas de la molécula, lo cual es reparado por la célula [27].

Estas alquilaciones convierten a los nucleótidos en sitios alcalinos lábiles, los cuales son zonas vulnerables a los altos pHs, ya que los iones OH^- atacan estos sitios lábiles, causando que la cadena de DNA se rompa. Los sitios alcalinos lábiles incluyen a los nucleótidos modificados por la alquilación y a los sitios abásicos (sin base nitrogenada) intermediarios del BER. Esta propiedad que tienen los sitios alcalinos lábiles de reaccionar a un alto pH, los vuelve ideales para estudiar la fragmentación del DNA, lo que permite medir el daño que tiene la molécula de manera semicuantitativa usando la técnica del cometa.

OBJETIVO GENERAL:

Determinar el daño al DNA causado por el MMS a un hígado regenerante.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar si la administración del MMS produce daño al DNA
- 2) Determinar si la regeneración puede revertir el daño generado por el MMS
- 3) Estandarizar la técnica del cometa para medir el daño al DNA

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

- Buffer de homogenización: NaCl, 75 mM; EDTA-2Na, 24mM; pH 7.5
- Homogenizador manual o automático
- Cámara de electroforesis
- Comet slides*
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMA) (0.5%) en PBS
- Agarosa en PBS 2%
- Solución de lisis: NaCl, 2.5M; EDTA, 100mM; Trizma base, 10mM.

Añadir ingredientes hasta 70% del volumen final y mezclar, añadir NaOH para disolver la mezcla y ajustar pH a 10, guardar a temperatura ambiente.

Solución final: añadir Tritón X-100 1% y refrigerar al menos 30min antes de usarse (la refrigeración es muy importante).

-Solución alcalina: NaOH; 300mM, EDTA; 1mM, pH13

-Buffer de neutralización: Tris-HCl; 0.4M, pH 7.5

-Bromuro de etidio.

-Microscopio de fluorescencia

Metodología

Inmovilización: una muestra de hígado fue cortada y puesta en buffer de homogenización frío y posteriormente se picó con tijeras en trozos pequeños y se homogenizó con un homogenizador tipo Potter. Del homogenado se tomaron 20µl y se suspendió en 180µl de agarosa de bajo punto de fusión derretida a una concentración de 0.5% (p/v) previamente calentada a 37°C. De esta mezcla se toman 50µl y se coloca sobre el pozo del *comet slide*. Las muestras se colocan dentro del refrigerador por 5 minutos para solidificar la agarosa [28].

Al polimerizarse, la agarosa forma una matriz de carbohidratos que encapsula a los núcleos y a las pocas células remanentes y las ancla en su lugar. La agarosa es una matriz permeable, por lo que las soluciones pueden penetrar el gel e interactuar con los núcleos sin que estos se muevan de su sitio [28,29].

Dado que los núcleos embebidos deben permanecer íntegros, no puede emplearse agarosa normal, ya que la alta temperatura que necesita para mantenerse líquida comprometería a los organelos durante la fase de inmovilización [28].

Lisis: después de polimerizar, las muestras son sumergidas en solución de lisis durante mínimo 60 minutos (pueden permanecer hasta 2 meses) a una temperatura de 4°C y sin exponerlas a la luz, para evitar que ésta dañe al DNA. La solución de lisis usada tiene una alta concentración de NaCl y un detergente (Tritón X-100). La alta concentración de sal desnaturaliza las proteínas, el detergente disuelve las membranas

celulares, incluyendo el núcleo, lo que destruye la integridad membranal. Todas las proteínas, RNA, membranas y contenidos citoplásmicos y nucleares se dispersan en la matriz de agarosa. El EDTA contenido en el buffer de lisis funciona como quelante para eliminar los cofactores metálicos, inactivando una gran cantidad de enzimas en el proceso. Sólo el DNA permanece y por la acción del NaCl se relaja la composición de la cromatina. A esta estructura se le llama nucleoide, un término que se le da a una estructura en la que el DNA está concentrado [28,29].

Fragmentación del DNA: después de la lisis, se remueve el exceso al escurrir el portaobjetos. Posteriormente se colocan en solución alcalina a temperatura ambiente y en oscuridad. El alto pH de la solución (>13) provoca el ataque nucleofílico de los sitios alcalino-lábiles del DNA, causando rupturas en éstos, lo que fragmenta el DNA. Las muestras permanecen en esta solución por 20 minutos [28,29].

Electroforesis: los portaobjetos son colocados en una cámara de electroforesis usando la misma solución alcalina como solución de corrida. Se aplica un voltaje de 25V por un tiempo de 20 minutos a 4°C (para evitar que la matriz de agarosa pierda integridad) en ausencia de luz. Al finalizar, se adicionan unas gotas de buffer de neutralización sobre los geles, para así neutralizar el alto pH de la solución alcalina. Posteriormente, las muestras son puestas en una solución de etanol al 70% por 5 minutos para deshidratarlas, lo que las conservará por tiempo indefinido. Para analizar los portaobjetos se les tiñe con bromuro de etidio o SYBR Green y se observan en un microscopio de fluorescencia, de preferencia a una longitud de onda de 520nm (para bromuro de etidio) [28,29]. Las fotos tomadas se analizaron con el software *OpenComet* (v1.3) en conjunto con el programa *ImageJ* (v1.48), el cual mide los parámetros necesarios para visualizar el daño que ha sufrido la célula, proveyendo datos semicuantitativos [30].

Principio del ensayo del cometa

El principio de esta técnica es que el DNA que no está dañado (o poco dañado) mantiene una estructura altamente organizada asociada con las proteínas de la matriz nuclear. Cuando el DNA se daña, esta asociación es afectada. Las hebras de DNA no asociadas pierden su estructura compacta y se relajan, difundiéndose de la cavidad hacia la agarosa. Cuando se aplica voltaje, el DNA migra hacia la carga positiva del ánodo. Las hebras de DNA poco dañadas son muy grandes y no dejan la cavidad, mientras que los fragmentos más pequeños son libres de moverse a través de la matriz de agarosa. Por lo tanto, la cantidad de DNA que deja la cavidad y la distancia que

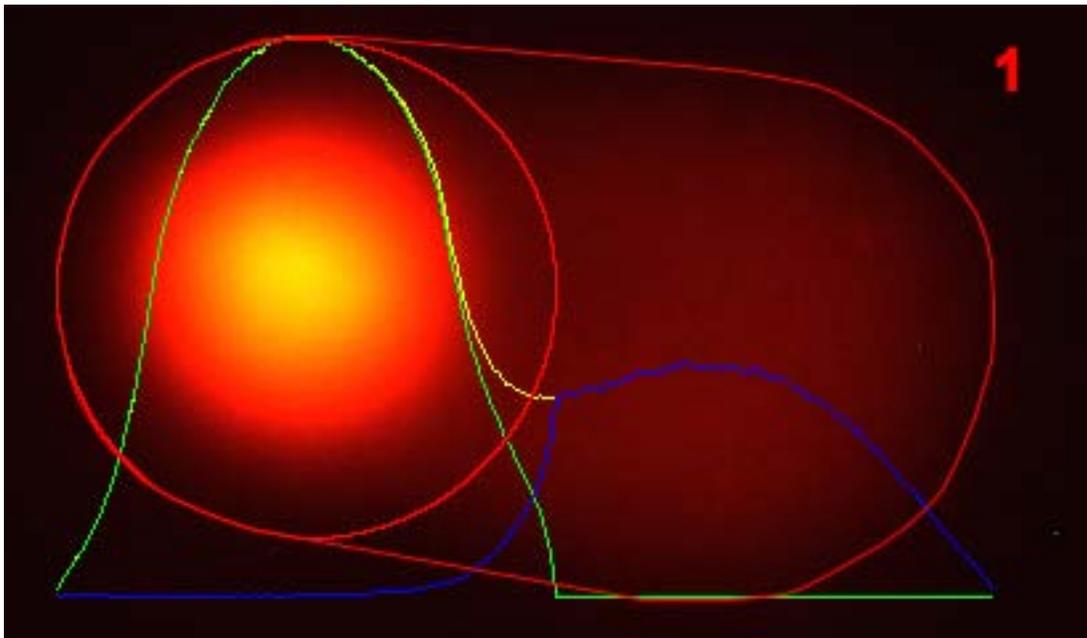


Fig. 4. La imagen fue analizada por el programa OpenComet de una célula pulmonar de rata. El área roja engloba el cometa. La gráfica verde indica la brillantez de los píxeles de la cabeza, la gráfica azul indica la brillantez de los píxeles de la cola y la gráfica amarilla indica la brillantez de los píxeles de todo el cometa (esta gráfica se sobrelapa con la verde y la azul). En un cometa sin daño, no aparece la porción azul de la cola, sólo la porción verde de la cabeza. Esta brillantez es directamente proporcional a la cantidad de DNA presente, lo que permite obtener datos semicuantitativos.

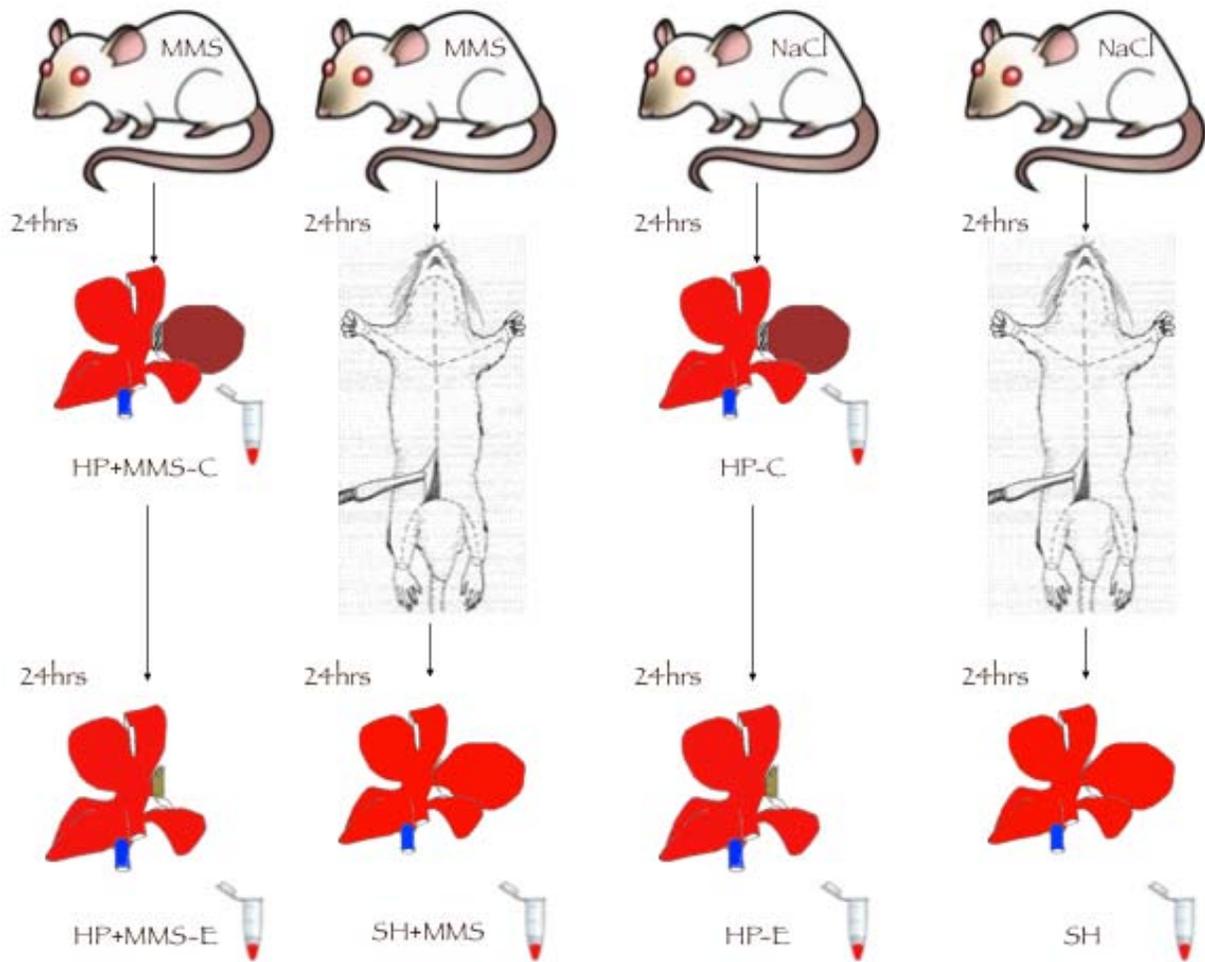
migra depende del tamaño del fragmento del DNA, del voltaje usado, del tiempo de la

electroforesis y de la concentración de agarosa. Así, midiendo la migración del DNA se puede determinar la cantidad de DNA dañado en la célula (Fig. 4).

Hepatectomía parcial

Se empleó el modelo de hepatectomía parcial en rata. Las ratas fueron anestesiadas con una combinación de ketamina-xilazina en una dosis de 8mg ketamina/5mg xilazina (para 250g de peso) llevado a un volumen de 1ml con solución salina vía inyección intraperitoneal. Se realizó la ligadura hemostática del 30% del hígado usando hilo de seda (lóbulo izquierdo) para su posterior resección, al término se suturó por planos con hilo de seda de grosor 4-0.

Para el proyecto se usaron 16 ratas adultas, de entre 240 y 260g, macho, de la cepa Wistar separadas en 4 grupos. Para el primer grupo se usó MMS para inducir daño al ADN por metilación, a una dosis de 25 mg/kg de peso, administrada vía intraperitoneal. Las ratas fueron hepatectomizadas 24 h después del tratamiento y sacrificadas 24 h posteriores a la hepatectomía. El hígado extraído funciona como el grupo control (grupo HP+MMS-C), mientras que el hígado regenerante es el grupo experimental (grupo HP+MMS-E). Para el segundo grupo se administró MMS en la misma proporción y 24 h después se realizó la cirugía falsa. 24 h después de la cirugía falsa se sacrificó al grupo (grupo SH+MMS). Para el tercer grupo se administró 1ml de solución salina. Las ratas fueron hepatectomizadas 24 h después de la administración y se sacrificaron 24 h posteriores a la hepatectomía. El hígado removido funciona como el grupo control (grupo HP-C), mientras que el hígado regenerante es el grupo experimental (grupo HP-E). Para el cuarto grupo se administró solución salina y 24 h después se realizó la cirugía falsa. 24 h después de la cirugía falsa se sacrificó al grupo (grupo SH) (Esquema 1). Todos los hígados se procesaron hasta la fase de lisis y se almacenaron a 4°C hasta el término de todos los grupos.



Esquema. 1. Grupos experimentales. **HP+MMS-C** = Animales hepatectomizados 24 horas después de la administración de MMS. **HP+MMS-E** = Hígado 24 horas después de hepatectomía y 48 horas después de administración de MMS. **SH+MMS** = Hígado 48 horas después de administración de MMS y 24 horas después de cirugía *sham*. **HP-C** = Animales hepatectomizados 24 horas después de administración de vehículo. **HP-E** = Hígado 24 horas después de hepatectomía y 48 horas después de administración de vehículo. **SH** = Hígado 48 horas después de administración de vehículo y 24 horas después de cirugía *sham*.

Resultados

Originalmente eran 4 ratas por grupo (16 ratas totales), pero una de las ratas del grupo HP+MMS murió durante la noche por el estrés de las condiciones experimentales.

Tabla 1. Parámetros del ensayo del cometa obtenidos de imágenes en células de hígado de rata, analizadas por el programa OpenComet. Los valores se muestran con su S.D.

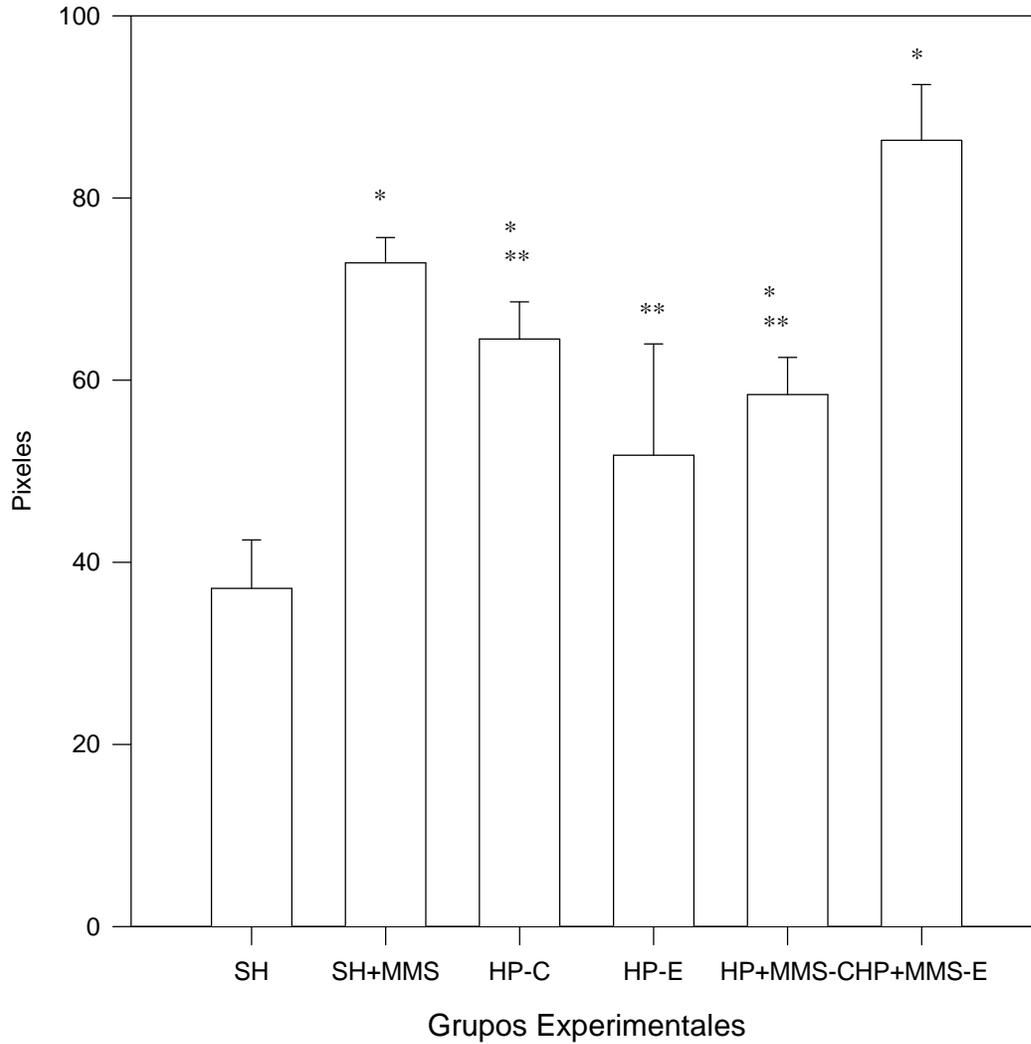
Condición	Longitud de la cola	Porcentaje de ADN en la cola	Momento de la cola
HP+MMS-C	56 ± 4.085	43.21 ± 1.511	26.85 ± 2.386
HP+MMS-E	86.33 ± 6.11	76.87 ± 11.14	68.2 ± 12.33
SH+MMS	72.87 ± 2.78	63.75 ± 5.21	48.69 ± 6.21
HP-C	64.5 ± 4.09	73.77 ± 2.46	51.47 ± 3.44
HP-E	51.75 ± 12.2	65.34 ± 15.84	46 ± 11.7
SH	37.11 ± 5.31	48.22 ± 14	27.2 ± 8.96

Es importante notar que la longitud de la cola y el porcentaje de DNA en la cola del cometa no se pueden comparar directamente, ya que el porcentaje es una proporción y tiene un límite (100%), pero la longitud de la cola no lo tiene. Sin embargo, se puede observar que en los grupos con MMS, la longitud de la cola supera al porcentaje de ADN en cola, mientras que en los grupos sin MMS sucede lo contrario (Gráfica 1).

En el grupo HP+MMS, el DNA dañado aumentó después de la hepatectomía y tal como se observa en la figura 8 (grupo HP+MMS-E), los cometas tienen una cabeza pequeña y una cola muy difusa, característico de daño extremo. Mientras que en la figura 7 (grupo HP+MMS-C), tienen una apariencia de un cometa clásico. Por otro lado, en el grupo HP el daño disminuyó después de la hepatectomía (figuras 9 y 10). Sin embargo, extrañamente, los cometas generalmente muestran DNA más dañado, presentando una cola más difusa y una cabeza más chica que los del grupo control. Esto se observa en las fotos 9 y 10. Pero al mismo tiempo, en el grupo HP-E hay una cantidad mayor de células sanas, en las que los cometas no tienen cola (sin daño). Por último, el grupo SH +MMS presenta una cola más larga que el grupo SH (figuras 5 y 6); sin embargo el

porcentaje de DNA en cola es el igual. Estas diferencias se pueden observar de la tabla 1 y en la gráfica 1.

Largo de Cola

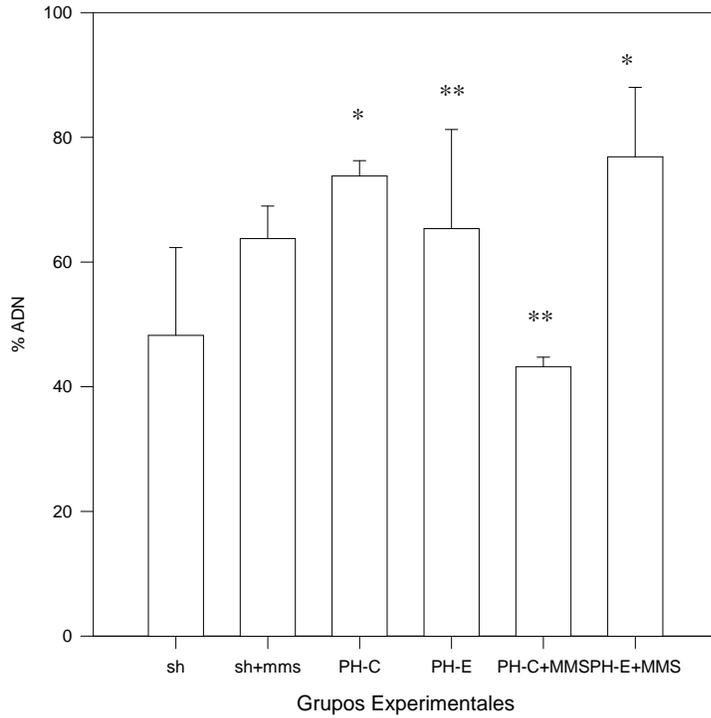


Gráfica 1. Parámetros del ensayo del cometa de cada grupo experimental. La longitud de la cola se mide en número de píxeles.

* $p < .05$ respecto a grupo SH.

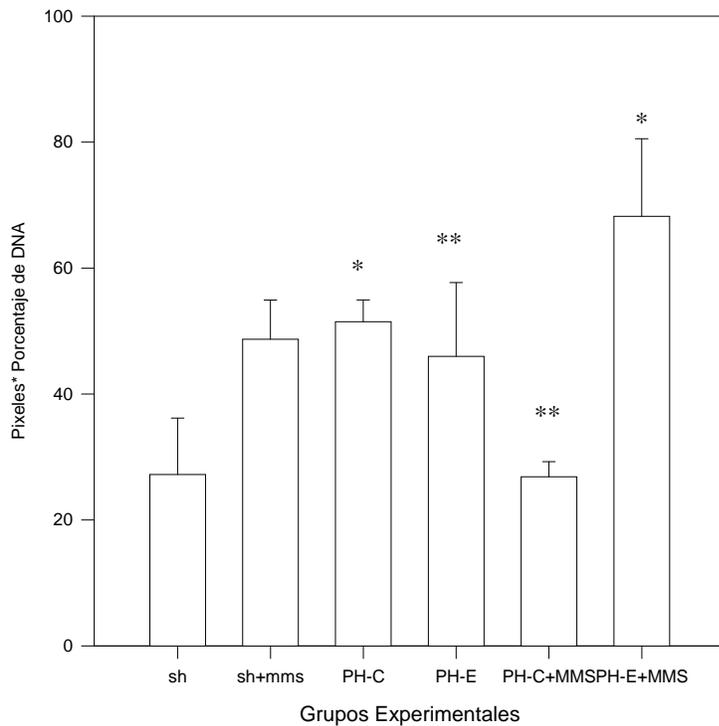
** $p < .05$ respecto a grupo HP+MMS-E

Porcentaje del ADN



Gráfica 2. Parámetros del ensayo del cometa de cada grupo experimental. Se observa el porcentaje de DNA en la cola.
 * $p < .05$ respecto al grupo HP +MMS-C
 ** $p < .05$ respecto al grupo HP +MMS-E

Momento de la cola



Gráfica 3. Parámetros del ensayo del cometa de cada grupo experimental. Se observa el momento de la cola.
 * $p < .05$ respecto al grupo SH
 ** $p < .05$ respecto al grupo HP +MMS-E

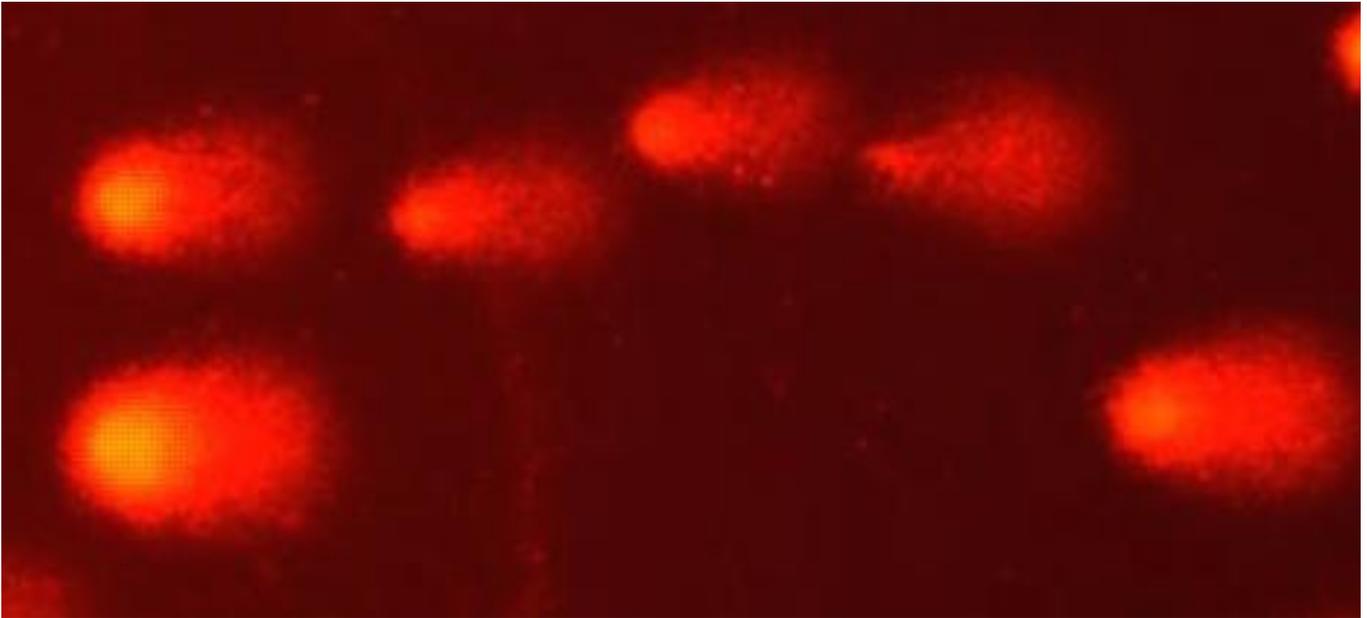


Fig. 5. Imagen de cometas representativo del grupo *SH*. Los cometas tienen una cabeza grande y/o una cola corta, indicadores de poco daño.

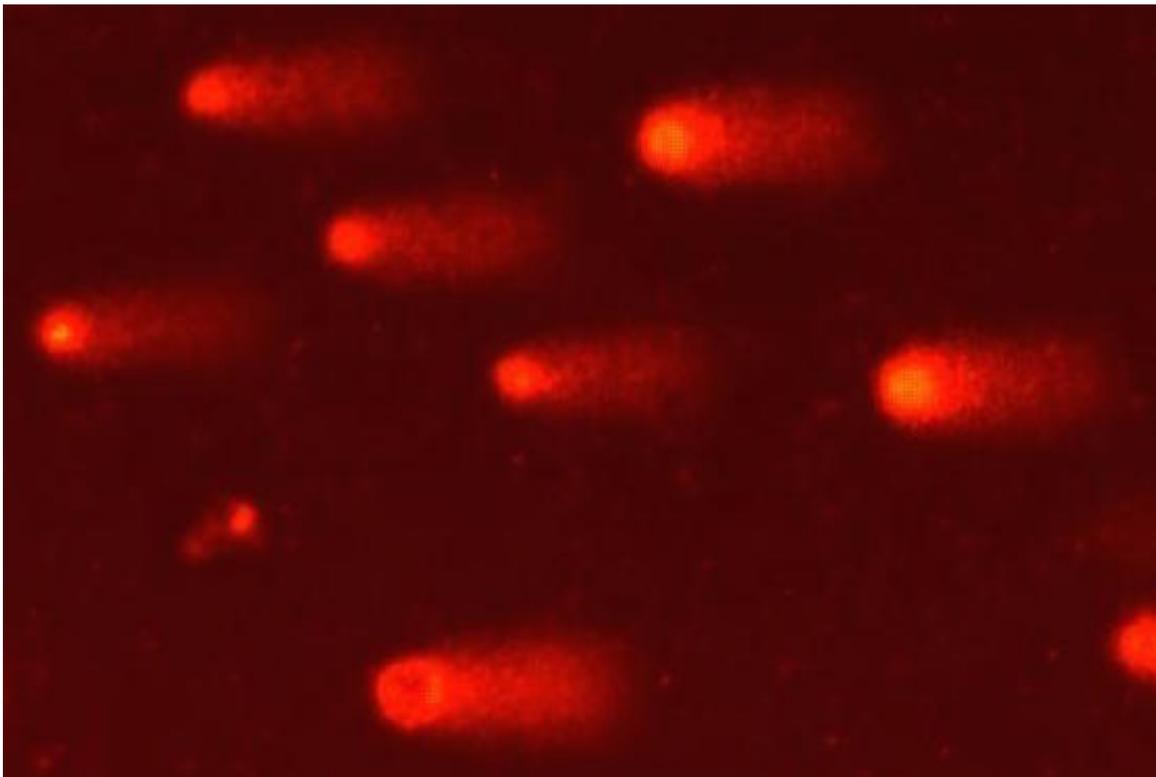


Fig. 6. Imagen de cometas representativo del grupo *SH+MMS*. Respecto al grupo *SH*, el grupo *SH+MMS* presenta colas largas y la típica forma de un cometa.

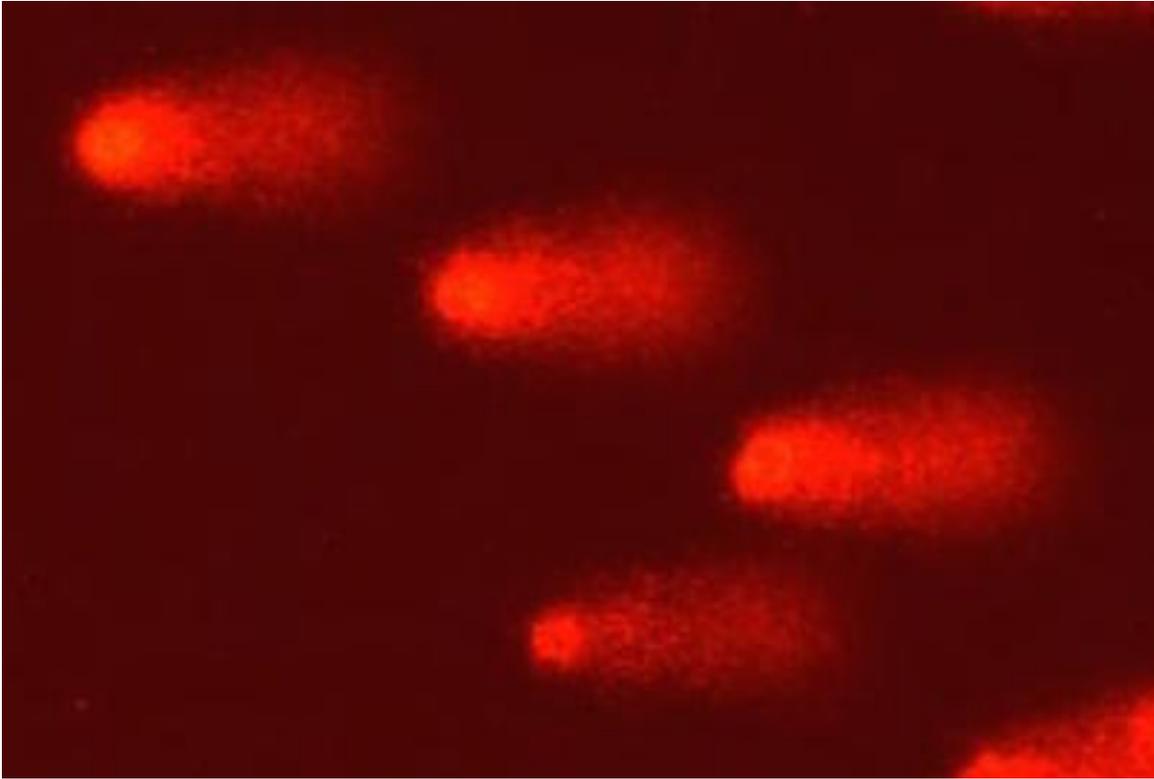


Fig. 7. Imagen de cometas del grupo HP+MMS-C. Tienen una forma muy similar al grupo MMS, ambos tienen un daño similar.

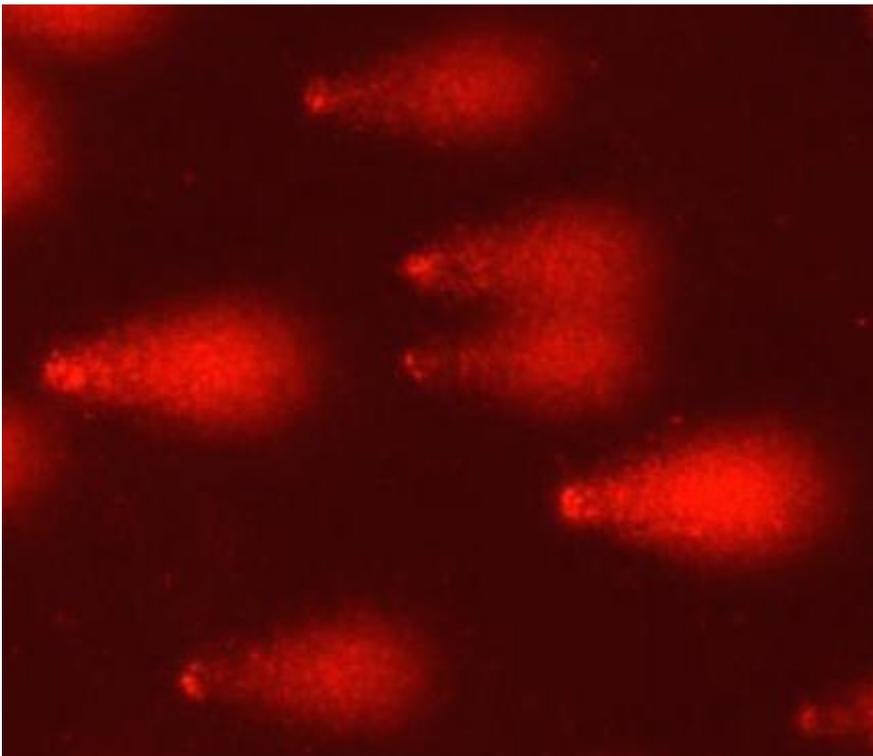


Fig. 8. Imagen de cometas del grupo HP+MMS-E. Una cabeza muy pequeña y una cola larga y difusa indican mucho daño.

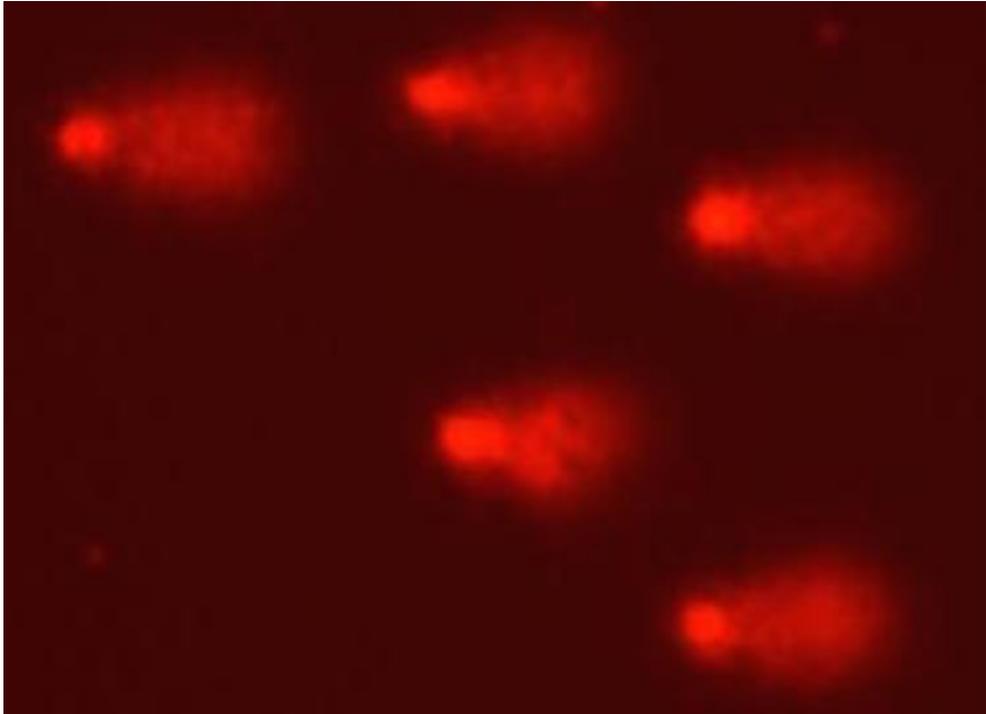


Fig. 9. Imagen de cometas del grupo HP-C. A pesar de no haber sido inyectado con MMS, este grupo está más dañado que el grupo SH. Se observa una cola más difusa y una cabeza más pequeña.

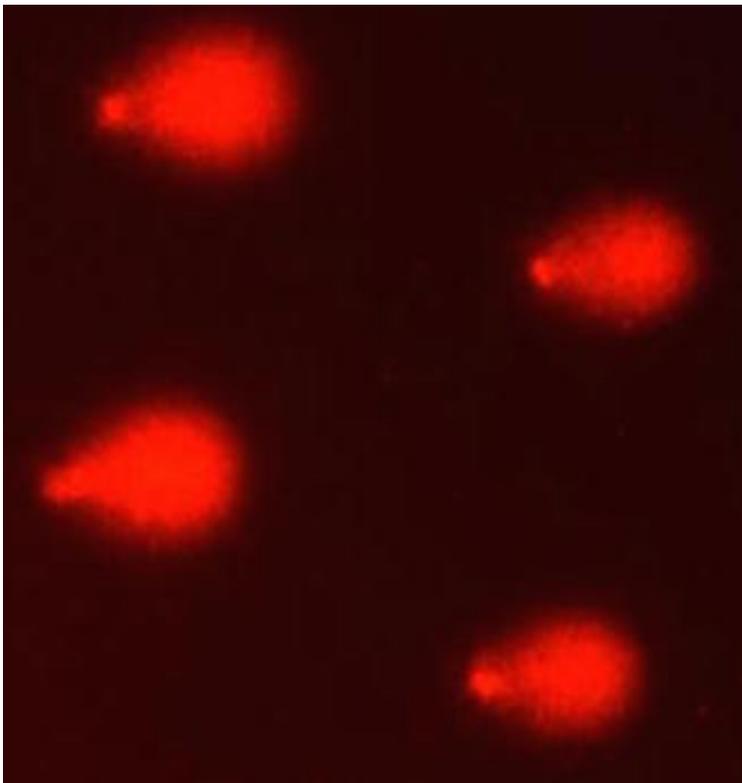


Fig. 10. Imagen de cometas del grupo HP-E. A pesar de que los cometas muestran DNA más dañado que el control (una cola muy difusa), el grupo en general está menos dañado debido a la abundancia de cometas sin cola (no mostrados en la imagen).

Discusión

Es bien sabido que el MMS es un agente alquilante que daña el DNA, al igual que muchos otros químicos, por lo que hay más de una opción para elegir para este experimento [31].

El MMS fue elegido debido a su uso común para esta técnica, su bajo precio y disponibilidad, a su relativa seguridad (es menos mutagénico que las nitrosoureas [31]) y a que al ser un agente alquilante del grupo de los metanosulfonatos, daña más sitios del nucleótido que las nitrosoureas [32], lo que genera más sitios alcalinos lábiles y facilita observar mejor el daño.

Originalmente, estaba planeado que la hepatectomía se realizaría al 70% y la dosis de MMS sería de 50mg/kg, pero se observó que una hepatectomía de tal magnitud en conjunto con el MMS causaba una muy alta tasa de mortalidad. Por esto, se optó por una hepatectomía al 30% (extrayendo el lóbulo izquierdo) y una dosis de 25mg/kg de MMS.

Con los resultados obtenidos, lo primero a notar es la diferencia en el daño entre las ratas *SH* y las ratas *HP-C*. Ya que ambos son hígados sin tratamiento, es de esperar que tuvieran un daño muy similar; sin embargo, el grupo *HP-C* muestra un daño al menos 60% mayor al del grupo *SH*. Se sabe que el bloqueo del flujo sanguíneo a un órgano (isquemia) genera radicales libres en este, debido a la falta de oxígeno [33,34]. Es posible que estos radicales libres sean los responsables del aumento en el daño en el DNA. La propia ligación del hígado durante la hepatectomía podría causar este aumento tan drástico del daño. Aunque un aumento tan elevado muy posiblemente tenga otra causa que no es evidente.

Es conocido que en presencia de daño, la maquinaria replicativa es capaz de elongar la cadena de DNA sobre este daño, en un proceso llamado *translesion synthesis* (TLS) [35]. Involucra el intercambio de la polimerasa δ (homólogo de la polimerasa III en bacterias) de alta fidelidad por una polimerasa de baja fidelidad (tal como la polimerasa ζ), la cual introduce nucleótidos al azar sobre la hebra dañada, que muchas veces es imposible de leer [36]. Este es un mecanismo que le permite a la célula replicar su DNA en presencia de daño, lo que le permite sobrevivir, pero con el costo de una alta

probabilidad de introducir mutaciones [2, 35, 36]. Aunque hay mucha información del mecanismo por el cual funciona TLS, no se conoce qué determina que este mecanismo sea preferido y no el mecanismo de reparación convencional.

En el hígado quiescente, las células han estado un largo periodo de tiempo en fase G₀, por lo que es de esperar que en todo ese tiempo hayan acumulado daño genético [13], congruente con lo que se observa en los grupos *SH* y *HP-C*.

Bajo el principio por el que funciona el TLS, se puede inferir que durante la replicación del DNA, el daño al mismo debe disminuir. Esto es debido a que, por un lado, la hebra de DNA recién sintetizada estará libre de daño (aunque posiblemente mutada), lo que disminuiría el daño, y por otro lado, las células que no logren replicar su DNA morirán ya sea por apoptosis o por necrosis, disminuyendo la cantidad de células con DNA dañado.

Debido a que la replicación, por si sola, podría eliminar o reducir el daño genético, es de esperar que en el hígado regenerante, el daño genético de sus células se reduzca debido a la replicación del material genético. Esto se observa en el grupo *HP*, donde el daño se reduce en aproximadamente un 20% para la longitud de la cola, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en el porcentaje de ADN en la cola ni en el momento de la cola. Como se hizo notar antes, los cometas del grupo regenerante parecen estar más dañados que los del grupo control, pero al mismo tiempo en el grupo regenerante hay una gran cantidad de cometas sin cola o con una cola muy corta. Es posible que estos cometas sin cola sean hepatocitos que acaban de dividirse, lo que eliminó en gran medida el daño. En cuanto a los cometas de este mismo grupo con una cola más difusa, es posible que sean hepatocitos en plena división celular, lo que significa que su DNA no estaba asociado a nucleosomas ni a ninguna estructura nuclear [21] y por el principio ya explicado del cometa, significaría que este DNA “desnudo” es más libre de difundir hacia el gel [37], por lo que es más fácil de migrar a través del gel de agarosa, lo que podría dar un resultado sesgado de daño aparente.

Por otro lado, en el grupo *HP+MMS* se observa un incremento en el daño en al menos 50% en el hígado regenerante en todos los parámetros. Este incremento en el daño en

los grupos con MMS puede deberse a la entrada al ciclo celular en el hígado regenerante. La división celular implica desenrollar el DNA de los nucleosomas [21]. El DNA, al desnaturalizarse (una sola cadena) durante la replicación y transcripción, expone sitios en las bases nitrogenadas que anteriormente estaban protegidos, lo que explicaría el aumento en el daño [27]. Para validar esta hipótesis, es necesario conocer cuánto tiempo permanece el MMS en el organismo antes de estar en una concentración tan baja que se vuelva inocuo. De acuerdo a NTP (*National Toxicology Program*), la vida media del MMS en un ambiente húmedo, es de 4.56 horas a 25°C. Pareciera ser que la vida media del MMS es muy corta para que siga causando genotoxicidad 24 horas después de su administración. Otra explicación que podría ser más plausible es que el daño causado por el MMS cause que la hebra de DNA se rompa durante la replicación, o que la misma síntesis del DNA se vea interrumpida por un daño que la maquinaria sea incapaz de reparar, lo que causaría que se formen interrupciones en la hebra de DNA (sitios abásicos) recién sintetizada, generando fragmentos de DNA incompletos [10]. Cualquiera que sea la explicación, esto se traduce como daño que puede medirse.

Ya que la diferencia de daño entre los grupos HP+MMS-E y SH+MMS es significativa en la longitud y momento de la cola, se puede deducir que la hepatectomía parcial causa un incremento adicional en el daño al DNA.

Los parámetros más importantes para interpretar los cometas son la longitud de la cola (en este caso es en pixeles) y el porcentaje de DNA en la cola [38]. La velocidad a la que un fragmento de DNA migra a través de un gel de agarosa es determinada por el tamaño del fragmento [38]. Es por esto que la longitud de la cola nos da información del tamaño de los fragmentos de DNA, por lo que entre más larga sea la cola, hay un mayor grado de fragmentación del DNA y lo que significa que hay un mayor daño. Por otro lado, el porcentaje de DNA en la cola da a conocer la cantidad de DNA que está fragmentado, por lo que una mayor cantidad de DNA dañado se desplazaría a la cola, disminuyendo el porcentaje de DNA en la cabeza.

Aunque estos dos parámetros son útiles para determinar el daño en el DNA, no es fácil saber cuál de los dos es más relevante. Una cola larga indica un alto grado de fragmentación, pero no ofrece información sobre la cantidad de DNA que está

fragmentado. Un alto porcentaje de DNA en la cola indica una gran cantidad de DNA fragmentado, pero no ofrece información sobre el grado de fragmentación. Para resolver esto, se utiliza un tercer parámetro denominado momento de la cola, la cual combina ambos parámetros, siendo el producto de la longitud de la cola y del porcentaje de DNA en la cola [38].

Los resultados indican que en el daño genético basal (grupo SH), hay un grado de fragmentación relativamente bajo, pero la cantidad de DNA fragmentado es alta. En los grupos donde se administró MMS se observa que el grado de fragmentación aumenta significativamente.

Es posible que esto se deba a que la metilación del DNA debida al MMS ocurre en zonas específicas del genoma que se encuentran vulnerables (tales como sitios de transcripción constitutiva), lo que podría causar una fragmentación localizada. El principio de la técnica del cometa es que el DNA fragmentado migrará en la agarosa, mientras que el DNA íntegro formará la cabeza. Sin embargo, hay cientos de tipos de daño que puede experimentar el DNA, y el cometa sólo puede detectar las rupturas de cadena. Es por esto que la metilación por sí sola no puede ser detectada por el cometa [29,38]. El propósito del uso de solución alcalina, es que los iones OH^- atacan los sitios alquilados en el DNA (y los sitios alcalinos-lábiles en general) por una reacción de tipo $\text{S}_{\text{N}}2$, lo que causa la ruptura de la cadena [39].

Dado que el MMS metila todo el DNA, es de esperar que aumente el grado de fragmentación de la cadena, lo que explicaría las observaciones.

Otra cosa a notar es que en los grupos sin MMS, el porcentaje de DNA en la cola está por encima de la longitud de ésta. Pero cuando se administra MMS a la rata, la longitud de la cola del cometa aumenta por encima del porcentaje de DNA. Esto indica que el grado de fragmentación aumenta de manera importante aunque la cantidad de DNA fragmentado aumente en una proporción menor.

Ya que el daño en el DNA aumenta en las células quiescentes con el paso del tiempo, es de esperar que en un organismo viejo haya más daño que en un organismo joven. En efecto, la misma técnica fue usada en ratas de distinta edad y se observaron datos

distintos. El daño en pulmón de ratas de viejas (6 meses) es aproximadamente 50% mayor que el daño de ratas recién nacidas (datos no mostrados).

Conclusión

El ensayo del cometa se ha usado antes para medir la magnitud del daño al DNA causado por genotóxicos, ya que es una técnica rápida, barata y fácil de realizar, y está comprobada su confiabilidad. En este estudio, se midió el daño en DNA en el hígado de rata causado por metil metanosulfonato durante la regeneración hepática, con el propósito de averiguar si el daño incrementaría, disminuiría o permanecería sin cambios. Se observó un gran incremento del daño al DNA al combinarse el metil metanosulfonato con la hepatectomía parcial. Fue un resultado contrario a lo esperado, puesto que se promovió la proliferación celular que debía tener menos daño por ser células recién sintetizadas, tal como sucedió en el grupo HP. Esto parece indicar que la célula proliferante es capaz de sobrellevar el daño genético cuando éste bajo, pero en presencia de mucho daño, la célula no es capaz de realizar una reparación, siendo incluso más perjudicial para la célula el tratar de proliferar. Por otro lado, parece ser que no es recomendable realizar esta técnica en células que se encuentren dividiéndose, ya que las mismas condiciones de la división celular pueden generar resultados sesgados, debido a las modificaciones generadas en el núcleo celular así como en la composición de la cromatina, dando la apariencia de un daño mayor donde no lo hay.

Perspectivas

La reparación de DNA en los seres vivos es un mecanismo muy importante, y hay mucha evidencia de que su atenuación en mamíferos podría ser la causa del envejecimiento. Sería interesante estudiar si la reparación es también atenuada o si es constitutiva en vertebrados no mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1 Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Nature 171: 737, 1953.

- 2 Andersen P L. DNA damage tolerance in mammalian cells. Department of Microbiology and Immunology, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 2009.
- 3 Pray L. DNA replication and causes of mutation. *Nature Education* 1(1): 214, 2008.
- 4 Best BP. Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. *Rejuv Res* 12(3): 199-208, 2009.
- 5 Helbock HJ, et al. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 95(1): 288-293, 1998.
- 6 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362(6422): 709-715, 1993.
- 7 Lindahl T. DNA repair enzymes acting on spontaneous lesions in DNA. In: *DNA Repair Processes*, Nichols WW and Murphy DG (eds.). Symposia Specialists, Miami, p225-240, 1977.
- 8 Tice RR, Setlow RB. DNA repair and replication in aging organisms and cells. In: *Handbook of the Biology of Aging*, Finch EE and Schneider EL (eds.). Van Nostrand Reinhold, pp 173-224, 1985.
- 9 Haber JE. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* 24(7): 271-275, 1999.
- 10 Nospikel T, Hanawalt P C. When parsimony backfires- neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease. *BioEssays* 25: 168-173, 2003.
- 11 Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441, 2006 doi: 10.1038/nature04958
- 12 Nospikel T, Hanawalt PC. DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair* 1: 59-75, 2002.
- 13 Bernstein C, Bernstein H. *Aging, Sex, and DNA Repair*. Academic Press; 1991.
- 14 Rossi DJ, et. al. Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle* 6(19): 2371-2376, 2007.
- 15 Nospikel T. Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 66: 994-1009, 2009.

- 16 Giachino C, et al. Maintenance of genomic stability in mouse embryonic stem cells: relevance in aging and disease. *Int J Mol Sci* 14: 2617-2636, 2013.
- 17 Nospikel TP, et al. Transcription domain-associated repair in human cells. *Mol Cell Biol* 26(23): 8722, 2006.
- 18 Nospikel T. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience* 145: 1213-1221, 2007.
- 19 Liu J, Zhou W, Doetsch PW. RNA polymerase bypass at sites of dihydrouracil: implications for transcriptional mutagenesis. *Mol Cell Biol* 15: 6729-6735, 1995.
- 20 Watson JD, et. al. *Molecular Biology of the Gene*. 6th ed. Benjamin/ Cummings. 2008.
- 21 Alberts B, et.al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed., Garland Pubs. 2007.
- 22 Post J, et. al. The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat. *J Cell Biol* 18: 1-12, 1963.
- 23 Gaub J,, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology* 4(5): 902-904, 2008.
- 24 Helbock HJ, et al. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 95: 288-293, 1998.
- 25 St Clair WH, et al. Influence of proliferation on DNA repair rates in liver. *Exp Cell Res* 197: 323-325, 1991.
- 26 Drabløs F, et al. Alkylation damage in DNA and RNA—repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3: 1389-1407, 2004.
- 27 Stephanie LN, O'Connor TR. Direct repair in mammalian cells, new research directions in DNA repair. C Chen (Ed.), ISBN: 978-953-51-1114-6, InTech, DOI: 10.5772/54449. Available from: <http://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/direct-repair-in-mammalian-cells>, 2013.
- 28 Hartmann A, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18(1): 45-51, 2003.
- 29 Emilio Rojas, comunicación personal.
- 30 Gyori BM, et al. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol* 2: 457-465, 2014.

- 31 Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA Repair and mutagenesis. Washington DC: ASM Press; 1995.
- 32 Sedgwick B. Repairing DNA-methylation damage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2): 148-157, 2004.
- 33 Ferrari R, et al. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* 53: 215S-22S, 1991.
- 34 Rodrigo J, et al. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 39 (2005) 26 – 50
- 35 Jansen JG, et al. Send in the clamps: Control of DNA translesion synthesis in eukaryotes. *Molecular Cell* 28: 522-529, 2007.
- 36 Lehmann AR, et al. Translesion synthesis: Y-family polymerases and the polymerase switch. *DNA Repair* 6: 891-899, 2007.
- 37 Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Mol Biotechnol* 26: 249-261, 2004.
- 38 Collins AR, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23(3): 143-151, 2008.
- 39 Tice RR, et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221, 2000.