

## Irradiación *ex vivo* de sangre humana para determinar daño genómico utilizando técnicas moleculares

Angel Montes\*, Juan Agapito

Laboratorio de Biología Molecular. Instituto Peruano de Energía Nuclear,  
Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

### Resumen

La dosimetría biológica es la estimación de la dosis absorbida en individuos expuestos a radiación ionizante a partir de muestras de sangre basándose en la cantidad de daño inducido por la radiación en el ADN celular. En este estudio se evaluó un ensayo experimental *ex vivo* a partir de muestras de sangre humana irradiada, con la finalidad de determinar el daño en el ADN. Para ello se irradió a bajas dosis (<100 mGy) tomando en consideración los siguientes parámetros: volumen de sangre (3mL), temperatura (37 °C) tiempo de incubación (0.5, 2, 4, 8 y 24 h) y siendo las dosis: 0, 12.5, 25 y 50 mGy empleando radiación gamma del Cesio-137 de 662 keV a una tasa de dosis de 38.46 mGy/h. Para determinar el daño cualitativo en el ADN genómico se utilizó electroforesis en gel de agarosa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen p53 en una secuencia de 133 pb del exón 7, relacionada a la proteína que actúa en el proceso de reparación celular. Los resultados obtenidos en el análisis cualitativo no evidenciaron degradación del ADN genómico; además, se observó un incremento en la concentración de ADN a la cuarta hora de incubación encontrándose los valores máximos para todas las dosis en las dos muestras analizadas. Se concluye que los efectos de la radiación ionizante a las dosis utilizadas no generan un daño detectable mediante técnicas moleculares como las utilizadas en el presente estudio.

### *Ex vivo* irradiation of human blood to determine DNA damage using molecular techniques

#### Abstract

Biological dosimetry is the assessment of absorbed dose in individuals exposed to ionizing radiation from blood samples based on the radiation induced damage in cellular DNA. The aim of this study was to determine the damage in the DNA through the assessment of an experimental *ex vivo* assay using irradiated samples of human blood cells. For this purpose, blood samples were irradiated at low doses (<100 mGy) considering the following parameters: blood volume (3mL), temperature (37 °C) and incubation time (0.5, 2, 4, 8 and 24 h). Dose values were: 0, 12.5, 25 and 50 mGy using Cesium -137 gamma rays at 662 keV and a dose rate of 38.46 mGy/h. The qualitative damage in the genomic DNA was determined using agarose gel electrophoresis and polymerase chain reaction (PCR) for the p53 gene in a sequence of 133 pb of exon 7, related to the protein that acts in the cell repair process. The results of the qualitative analysis showed no degradation of genomic DNA; also an increase in the DNA concentration was observed up to the fourth hour of incubation, finding maximum values for all doses in the two samples. As a conclusion, the effects of ionizing radiation at doses used in this experiment do not generate a detectable damage, by means of molecular techniques such as those used in the present study.

Keywords: ionizing radiation, electrophoresis, PCR

### 1. Introducción

Los daños causados por la radiación ionizante (RI) como las roturas de doble cadena de ADN activan grandes cantidades de proteínas e inducen genes asociados con el ciclo celular y control del crecimiento [1,2]. Entre las proteínas implicadas durante las primeras etapas de la respuesta celular en la detección de daños en el ADN y el control de la progresión a través del ciclo celular están: H2AX, ATM, CDKN1A y TP53, las cuales

se han propuesto como un grupo superior de candidatos biosimétricos [3,2].

Mantener la estabilidad del genoma es de gran importancia para todos los organismos porque el daño del ADN puede tener implicaciones biológicas graves, como trastornos genéticos y cáncer [4,5]. En los últimos años el uso de las pruebas de imagen para diagnóstico médico, así como la

\* Correspondencia autor: amontes@ipen.gob.pe

exposición terapéutica ha aumentado de manera significativa, convirtiéndose en una preocupación los efectos biológicos de la exposición a la radiación de dosis bajas en pacientes, médicos y personal técnico [6]. Por eso, es necesario contar con bioensayos rápidos y fiables para evaluar el riesgo de las personas expuestas a radiaciones ionizantes [2,3]; sin embargo, la determinación cuantitativa del daño radiológico después de la exposición a dosis bajas (<100 mGy) sigue siendo un reto [6].

En ese sentido encontrar un marcador idóneo en estas situaciones es sumamente importante para monitorear poblaciones expuestas a radiación ionizante, pero hay poca información sobre el uso de marcadores moleculares específicos para tal fin [7,8].

Con la finalidad de determinar el daño en el ADN (roturas de doble cadena), en muestras de sangre humana irradiada a dosis bajas de radiación ionizante (<100 mGy) se plantea una metodología de irradiación de sangre y análisis de ADN a diferentes intervalos de tiempo, manteniendo condiciones de temperatura (37 °C) y volumen de muestra, así como la evaluación de la variación de un biomarcador molecular p53, que es una proteína involucrada en eventos como la autofagia, reparación del daño del ADN, supervivencia celular y senescencia celular [9].

## 2. Experimental

El ensayo consistió en exponer sangre humana a dosis bajas de RI. Se extrajo sangre venosa por venopunción de la parte superior del antebrazo de dos personas saludables del sexo masculino, entre 30-40 años de edad, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: que no sean fumadores y sin antecedentes de radioterapia, además se informó anticipadamente a cada donante sobre el objetivo del ensayo el cuál fue registrado mediante un formato de consentimiento informado. Para la toma de muestras se utilizó el sistema al vacío en tubos Vacutainer con EDTA (K2), los mismos que fueron utilizados para la irradiación.

### 2.1 Irradiación de muestras

Con la finalidad de simular la irradiación de seres humanos a dosis bajas y la probable

aparición de efectos estocásticos se aplicó radiación a muestras de sangre con las siguientes dosis: 12.5 mGy, 25 mGy y 50 mGy [6]. La irradiación se llevó a cabo en el Laboratorio Secundario de Calibraciones Dosimétricas del Instituto Peruano de Energía Nuclear, utilizando una fuente de radiación gamma Cesio-137 de 662 keV a una tasa de 38.46 mGy/h. Por cada dosis se irradiaron 3 mL de sangre y se tuvo en cuenta una muestra control que no fue expuesto a radiaciones ionizantes. Las muestras permanecieron en hielo hasta su posterior traslado al laboratorio de irradiación. Una vez irradiadas las muestras fueron incubadas inmediatamente a 37 °C en una estufa hasta su posterior evaluación.

### 2.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de todas las muestras de sangre se llevó a cabo a partir de un volumen de 200 µl utilizando el kit *QIAamp DNA Blood* (QIAGEN®), siguiendo las instrucciones del fabricante; posteriormente, el ADN fue almacenado a 20 °C. La extracción del ADN se llevó a cabo a intervalos de tiempo con el objetivo de evaluar el daño en el ADN y su correspondiente proceso de reparación. Los tiempos y las dosis evaluadas se observan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Extracción de ADN de sangre irradiada a intervalos de tiempo.

Dosis (mGy)	Extracción de ADN a intervalos de tiempo (horas)				
0					
12.5	0.5	2	4	8	24
25					
50					

### 2.3 Cuantificación de ADN

El ADN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el equipo de medición Nanodrop100 a una absorbancia de 230/260.

### 2.4 Electroforesis de ADN genómico

La calidad del ADN fue evaluado mediante geles de electroforesis en Agarosa 1 % con un marcador de peso molecular 100 pb *GeneRuler 100 pb* (Fermentas®) en buffer TBE1X a 60 Voltios, 400 mA por 1h en una cámara de electroforesis BIORAD®; posteriormente, fueron teñidos con bromuro

de Etidio (0,01 mg/mL) y visualizados en un foto documentador BIORAD®.

### 2.5 Amplificación mediante PCR del gen p53

Para evaluar el daño generado en el ADN por efecto de las radiaciones, se utilizó el biomarcador p53 para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una secuencia de 133 pb ubicada en el exón 7 [10].

Se utilizaron oligonucleótidos según la referencia [10,11] en un volumen final de reacción de 30µl con Buffer PCR 1X (*Applied Biosystems*), 1.5mM MgCl (*Applied Biosystems*), 2.5mM dNTP (*Promega*), 0.6 mM de cada oligonucleótido p53 (13992-14013) Forward 5'-TCTCCTAGGTTGGCTCTGACTG-3' y p53 (14105-14125) Reverse 5'-GCAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3'; 0.3U de Go Taq® *DNA Polimerase* (*Promega*). El protocolo de amplificación consistió en: desnaturalización inicial de 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de Denaturación a 94 °C por 60 segundos, Hibridación de los oligonucleótidos a 62 °C por 60 segundos y 72 °C por 60 segundos y una extensión final de 72 °C por 7 minutos, además se utilizó como control negativo agua libre de nucleasas *Biology Molecular Water Sigma*® manteniéndose constante los demás componentes de la reacción.

### 2.6 Electroforesis de los fragmentos amplificados

Los productos amplificados por PCR fueron visualizados en geles de agarosa a una concentración del 2 % con un marcador de peso molecular 100 pb *GeneRuler 100 pb* (*Fermentas*®) en buffer TBE1X a 60 Voltios, 400 mA por 1 hora en una cámara de electroforesis BIORAD; posteriormente, fueron teñidos en bromuro de Etidio (0,01 mg/mL) y visualizados en un foto documentador BIORAD.

## 3. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en la evaluación de sangre, cuantificados por espectrofotometría, mostraron un incremento en la concentración de ADN a las cuatro horas de incubación (Figura 1 y 2). Así mismo, se encontró

valores máximos para todas las dosis de irradiación en ambas muestras analizadas (Tabla 2).

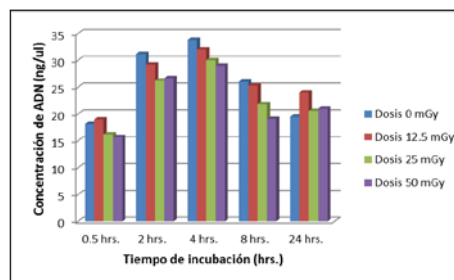


Figura 1. Cuantificación del ADN de sangre irradiada, muestra 1.

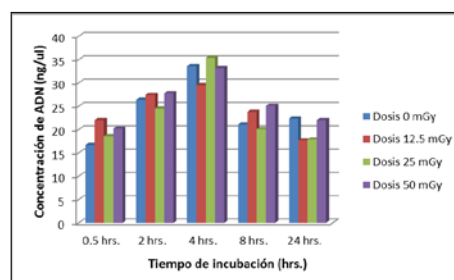


Figura 2. Cuantificación del ADN de sangre irradiada, muestra 2.

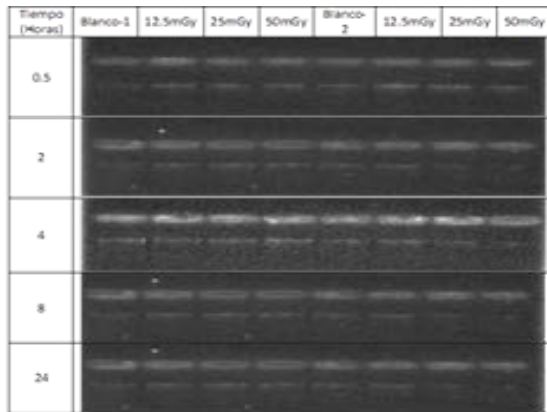
Tabla 2. Extracción de ADN de sangre irradiada a las 4 horas de incubación.

Dosis	Concentración de ADN (ng/ul)	
	Muestra 1	Muestra 2
0 mGy	33.8	33.6
12.5 mGy	32	29.5
25 mGy	30	35.4
50 mGy	29	33.2

Los resultados obtenidos pueden tener una relación con los procesos de reparación celular en función del tiempo de incubación a 37 °C, es decir que la cinética del ciclo celular incrementó la concentración del ADN ocasionando que la proliferación celular aumente a las 4 horas de incubación [12].

Además, se pudo observar que la calidad del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa mostró un patrón de corrida constante en todas las dosis y tiempos de evaluación (Figura 3). Sin embargo, el daño ocasionado a dosis bajas de irradiación no pudo ser evidenciado de forma cualitativa mediante electroforesis debido a la generación endógena de Especies Reactivas de oxígeno que probablemente ocasionen daños pero de forma posterior en función al

tiempo y susceptibilidad genética de cada individuo [13,14].



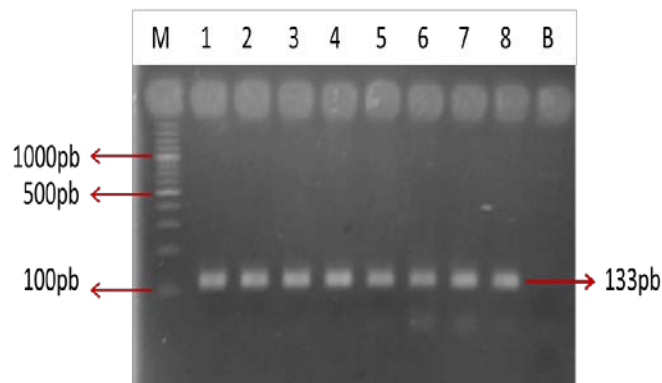
**Figura 3.** Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1 %, a partir de las muestras irradiadas.

Para comprobar la integridad del ADN y verificar si las dosis de radiación utilizadas en el ensayo ocasionaron mutaciones que impidan la amplificación del gen p53 se utilizó una PCR para una secuencia de 133 pb [9] que codifica para el exón 7. Considerando que el gen p53 está relacionado con la reparación celular y que mutaciones del exón 5 al 9 en este gen favorecen la aparición de cáncer en un 98 % de los casos [10], se seleccionó una región codificante del

exón 7 [9].

Como resultado se pudo observar la amplificación por PCR para la secuencia del gen p53, lo que demuestra que no hubo daño significativo o que no fue evidente debido a las dosis bajas evaluadas en el estudio, como señalan otros autores [13] (Figura 4).

Frente a estos resultados es importante tener en cuenta que a determinadas dosis de radiaciones ionizantes es posible que se alteren regiones funcionalmente importantes en los procesos de transcripción, las cuales pueden ser regiones promotoras de genes implicados en procesos de reparación celular dado que cambios en la expresión de estos genes pueden afectar a la capacidad de las células para reparar el daño del ADN [15, 16].



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación de la secuencia de 133 pb del gen p53 a partir de ADN de sangre irradiada. Carril del 1 al 8 productos de amplificación a las siguientes dosis de irradiación: 1= Control 1, 2=12.5 mGy, 3=25 mGy, 4=50 mGy, 5=Control 2, 6=12.5 mGy, 7=25 mGy y 8=50 mGy; B = blanco de PCR y M = marcador de Peso Molecular de 100 pb.

#### 4. Conclusiones

Mediante técnicas moleculares como la electroforesis de ADN en geles de agarosa y PCR para la secuencia de 133 pb del exón 7 del gen p53, no se detectó daño radiológico en las muestras irradiadas.

La técnica de PCR permitió amplificar la secuencia de 133 pb del gen p53 de humanos

con una elevada sensibilidad y especificidad.

#### 5. Agradecimientos

Al Laboratorio Secundario de Calibraciones Dosimétricas del Instituto Peruano de Energía Nuclear. Así mismo, a la Bach. Mirella Pérez por la búsqueda bibliográfica para el diseño de los primers del gen p53.

## 6. Bibliografía

- [1]. Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res.* 2000; 153: 245-257.
- [2]. Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova O.  $\gamma$ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res.* 2009; 43(8): 1171-1178.
- [3]. Marchetti F, Coleman M, Jones IM, Wyrobek A. Candidate protein biodosimeters of human exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2006; 82: 605-639.
- [4]. McKinnon P, Caldecott K. DNA strand break repair and human genetic disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2007; 8: 35-55.
- [5]. Pinto DMS, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. In: Nasheuer Heinz Peter, editor. *Genome Stability and Human Diseases.* Netherlands: Springer; 2010. p. 55-78. DOI 10.1007/978-90-481-3471-7\_4, C Springer Science Business Media B.V. 2010.
- [6]. Lee W, Nguyen P, Hu S, Liang G, Ong S, Han L, Sanchez-Freire V, Lee A, Vasanawala M, Segall G, Wu J. Variable activation of the DNA damage response pathways in patients undergoing single-photon emission computed tomography myocardial perfusion imaging. 2015 *Circ. Cardiovasc Imaging.* doi: 10.1161/CIRCIMAGING.114.002851.
- [7]. International Atomic Energy Agency (IAEA). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical Report Series No. 405. Vienna, 2001.
- [8]. Castro-Volio I. Indicadores citogenéticos para la identificación de exposición a radiación ionizante en humanos. *Acta Médica Costarricense.* 2013; 55(3): 110-117.
- [9]. Bensaad K, Vousden K. p53: new roles in metabolism. *Trends in Cell Biology.* 2007; 17(6): 286-291.
- [10]. Roa JC, Roa I, Melo A, Araya J, Villaseca M, Flores M, Schneider B. Mutación del gen p53 en el cáncer de colon y recto p53 Gene mutation in colorectal carcinoma. *Rev. Méd. Chile.* 128(9): 996-1004.
- [11]. Buetow KH, Sheffield VC, Zhu M, Zhou T, Shen FM, Hino O, *et al.* Low frequency of p53 mutations observed in a diverse collection of primaryhepatocellular carcinomas. *Genetics.* 1992; 89: 9622-9626.
- [12]. Santacruz-Gómez K, Manzano C, Meléndez R, Pedroza-Montero M, Castaneda B. Estudio de los fenómenos de destrucción celular en leucocitos de sangre humana irradiada con gamma. *Alasbimn Journal.* 2012.
- [13]. Nasonova E, Shmakova N, Komova O, Mel'nikova L, Fadeeva T, Krasavin E, Ritter S. Cytogenetic effects of low-dose radiation with different LET in human peripheral blood lymphocytes. *Radiat Environ Biophys.* 2006; 45: 307-312.
- [14]. Byrne R, Klingele A, Cabot E, Schackwitz W, Martin JA, Martin J, Wang Z, Wood E, Pennacchio C, Pennacchio L, Perna N, Battista J, Cox M. Evolution of extreme resistance to ionizing radiation via genetic adaptation of DNA repair. *eLife Journal.* 2014.
- [15]. Sudpraserta W, Navasumrita P, Ruchirawata M. Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 2006; 209: 503-511.
- [16]. Fan W, Zhou K, Zhao Y, Wu W, Chen H, Jin L, Chen G, Shi J, Wei Q, Zhang T, Du G, Mao Y, Lu D, Zhou L. Possible association between genetic variants in the H2AFX promoter region and risk of adult glioma in a Chinese Han population. *Journal Neurooncol.* 2011; 105: 211-218.