

Determinación de la Metilación global del ADN, Un posible efecto por exposición a tóxicos en ladrilleros de Guanajuato

Measurement of global DNA methylation, a possible effect associated with the exposure to pollutants in brickmakers from Guanajuato.

Rodríguez Camarillo G. ¹; Cortés Arias M.F. ¹; Chavez Peña M.A. ² Alegría Torres J.A. ⁴

¹Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, ²Maestría en Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato, ³Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato.

g.rodriguezcamarillo@ugto.mx¹ mf.cortesarias@ugto.mx² ma.chavezpena@ugto.mx³ ja.alegriatorres@ugto.mx⁴

Resumen

La exposición a tóxicos por parte de contaminantes provenientes del área de trabajo de ladrilleras tienen como resultado enfermedades o daños a la salud derivadas de la precariedad del ambiente en el que se labora. La metilación del ADN es un fenómeno epigenético natural que consiste en la adición de grupos metilo a las citosinas del ADN que anteceden a una guanina, y que son denominadas islas CpG. Sin embargo, este proceso puede alterarse por contaminantes que se generan en ambientes de trabajo como ocurre en el proceso de fabricación de ladrillos, y que incluye: metales pesados e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Las modificaciones epigenéticas asociadas a la exposición a estos contaminantes podrían contribuir al desarrollo de enfermedades atribuidas a estos tóxicos como son: daño pulmonar y enfermedades renales.

Palabras clave: Metilación de DNA; Ladrilleras; Hidrocarburos aromáticos policíclicos; Metales pesados; México.

Introducción

La metilación del ADN es un fenómeno que se ha observado en diversas especies de organismos el cual se produce cuando se forma un enlace de tipo covalente de un grupo metilo en el carbono 5 del anillo de citosina dando como resultado lo que es la 5-metilcitosina (5-mC).

Esta metilación es un proceso de tipo epigenético el cual participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras. Primero puede verse afectado directamente al impedir la unión de factores de transcripción, o de manera indirecta propiciando una estructura más cerrada de la cromatina. [1]

La epigenética la entendemos como las modificaciones de la expresión de los genes por procesos en los cuales no se ven involucrados cambios en el código genético. Estos cambios pueden verse en un patrón heredable y reversible, los cuales se ven propiciados por la exposición a factores ambientales que favorecen la aparición de estas modificaciones genéticas.

Muchos de los factores que propician la metilación del ADN suelen verse presentadas en trabajos precarios. Según la organización internacional del trabajo, un empleo precario es aquel en el que no se cuenta con una seguridad en el empleo [2] [3]. Esta puede entenderse como un trabajo informal en donde no se cuente con derechos laborales o circunstancias seguras para laborar donde se puede poner en riesgo su integridad física.

En México se cuentan con muchos de este tipo de empleos, sin embargo, el enfoque dado en este artículo se dirige específicamente a uno. La fabricación de ladrillos es un empleo común en México donde se enfoca

a la elaboración de los mismos desde 0. La producción de contaminantes varía de ladrillera a ladrillera, ya que la emisión de estos depende de los parámetros en los que se fabriquen los ladrillos. Por lo que se sabe, la calidad de los materiales con los que se trabaja está relacionado con el tipo de contaminantes generados al momento de su producción. [4]

De estos contaminantes se deriva parte del estado de salud con el que cuentan los trabajadores de ladrilleras. Estos trabajadores tienen como principales vías de exposición la respiratoria, dérmica e inclusive hasta oral. Por lo que se ha demostrado ciertos efectos crónicos y agudos en la salud de los trabajadores de ladrilleras expuestos a los contaminantes producidos en su área de trabajo.

Algunos de los contaminantes más comunes a los que son expuestos los trabajadores son el material particulado, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, NO₂, SO₂, CO, metales, dioxinas e insecticidas así como muchos otros. [4]

Metodología

Extracción de ADN

Como parte de un proyecto PRONAI-CONAHCYT (318979), de donde se contaba con muestras de sangre y orina de 32 individuos incluyendo trabajadores y familiares de éstos, de ladrilleras ubicadas en el estado de Guanajuato en la zona de la Yerbabuena, de la Ciudad de Guanajuato, se llevó a cabo una extracción de ADN de muestras de sangre preservadas en congelación (-20°C), siguiendo con el siguiente protocolo [5]:

Inicialmente, en un tubo cónico de 1.5 ml, se adicionaron 100 µl de sangre completa con 200 µl de buffer de lisis pH 7.5 (Tris-HCl 2X, sacarosa 4X, MgCl₂ 4X, Tritón X-100), se mezcló en vórtex por 5 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se desechó en una solución de cloro mientras que al precipitado se le agregó 200 µl de buffer de lisis y se mezcló utilizando el vórtex para luego centrifugarlo a 14,000 rpm durante 5 minutos, se volvió a desechar el sobrenadante. La pastilla se lavó tres veces más con 200 µl de buffer de lisis, se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

El precipitado se resuspendió en 15 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8 con vórtex, enseguida se añadieron 15 µl de detergente doméstico a 20 mg/ml y se mezcló con vórtex; a continuación, se adicionaron 10 µl de NaCl 5 M y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos. Simultáneamente, se preparó un microtubo por cada muestra con 100 µl de etanol absoluto enfriado previamente a -20°C.

El sobrenadante se transfirió al tubo con etanol y se incubó a -20°C durante 24 horas, cumplido este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos; posteriormente, la pastilla se lavó 2 veces con 100 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 minutos entre cada lavado, terminado este tiempo se desechó el etanol y se secó por al menos 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN se resuspendió en 30-50 µl de agua grado Biología Molecular.

Una vez resuspendidas las muestras, cuantificó el ADN y se determinó la calidad de las mismas, midiendo la absorbancia a 260 nm y 280 nm, esperando una relación 260/280 superior a 1.6. La concentración de ADN en la muestra se calculó de acuerdo con la correspondencia donde 50 ng/ µl de ADN de doble cadena da una lectura en absorbancia de 1 a 260nm y todas las muestras fueron llevadas a una concentración final de 25 ng/µL y almacenadas a -20°C hasta su utilización.

Ensayo de Elisa para determinar la metilación global del ADN

La detección de los niveles de metilación global del DNA de leucocitos se realizó con el kit "MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric)" de la casa comercial EpigenTek siguiendo el protocolo establecido en la ficha técnica, y como brevemente se describe a continuación. Se montaron por duplicado los controles y las muestras en la placa de ELISA de acuerdo con lo siguiente:

Muestras: 100 µl de BS (Solución de unión) y 100 ng del DNA de la muestra (4 µl).

Control negativo: 100 µl de BS (Solución de unión) y 2 µl de NC (Control negativo)

Control positivo: 100 µl de BS y 2 µl de PC (Control positivo) a diferentes concentraciones (0.1% hasta 5%) para la curva de calibración. Los PC se prepararon de acuerdo con la siguiente tabla, mezclando bien para

asegurar la exactitud de la concentración.

Concentración PC		PC (5.0%) 5-mC		PC diluido (0.5%) 5-mC		NC
0.1% PC/pozo	=	0.0 µl	+	1.0 µl	+	9.0 µl
0.2% PC/pozo	=	0.0 µl	+	1.0 µl	+	4.0 µl
0.5% PC/pozo	=	0.0 µl	+	3.0 µl	+	3.0 µl
1.0% PC/pozo	=	1.0 µl	+	0.0 µl	+	9.0 µl
2.0% PC/pozo	=	1.0 µl	+	0.0 µl	+	4.0 µl
5.0% PC/pozo	=	3.0 µl	+	0.0 µl	+	3.0 µl

Posteriormente, se mezcló la solución de reacción agitando gentilmente la placa durante algunos minutos para asegurar una suficiente homogenización, se cubrió la placa con el protector y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Durante los últimos 10 minutos de incubación, se preparó la Solución compleja de detección 5-mC (Buffer de lavado, anticuerpo 5-mC 1000X, indicador de señal 1000X y solución potenciadora 1000X). Finalizado el tiempo de incubación se removió la BS y se añadió 150 µl de WB (Buffer de lavado) diluido, este lavado se llevó a cabo 3 veces. Luego se añadieron 50 µl de la Solución compleja de detección 5-mC a cada pozo, se volvió a cubrir la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 50 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró la Solución compleja de detección y se lavó 5 veces cada pozo con 150 µl de WB diluido en cada lavado.

Después, se agregaron 100 µl de DS (Solución reveladora) a cada pozo por columnas, para revelar simultáneamente los replicados; se agitó suavemente la placa contra una superficie plana por algunos segundos y se incubó a temperatura ambiente por algunos minutos hasta observar un color azul oscuro en los pozos correspondientes al control positivo 5%. Enseguida, se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de SS (Solución de paro) a cada pozo, de la misma manera que el DS se adicionó por columnas. Finalmente, se mezcló la solución agitando suavemente la placa contra una superficie plana y se incubó unos minutos para hasta observar el cambio de color a amarillo, la absorbancia se leyó 450 nm en un periodo menor a 15 minutos.

Cálculos del porcentaje de metilación

Para poder calcular el porcentaje de ADN metilado se debe de elaborar una curva estándar con 5 puntos base, los cuales en este caso fueron 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2. A partir de esta curva estándar, se obtuvieron los valores de OD (absorbancia) en función de los controles positivos para cada punto porcentual. Al tener marcados dichos puntos se determina la pendiente a partir de la curva estándar empleando la regresión lineal.

Al contar con los valores mencionados, se puede calcular el porcentaje de ADN metilado en el ADN total de la muestra usando la fórmula marcada a continuación:

$$5mC\% = \frac{\text{Muestra OD} - \text{Control Negativo OD}}{(\text{Pendiente}) \times (S)} \times 100\%$$

En donde S es la cantidad de ADN que contiene la muestra en nanogramos. A partir de dicha fórmula es posible conocer el porcentaje de citosinas metiladas del ADN en la muestra.

Resultados

Se realizó la extracción de ADN de todas las muestras analizadas, llevando a una concentración fija de 25 ng/µL (Figura1).



Figura 1 Preparación de alícuota con 50 ng de DNA.

Se realizó una curva de calibración para el ensayo ELISA utilizando 5 puntos correspondientes a los estándares de 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2% de Citosinas metiladas (Figura 2 y 3), a partir de la cual se calculó el porcentaje de 5mC para cada muestra.

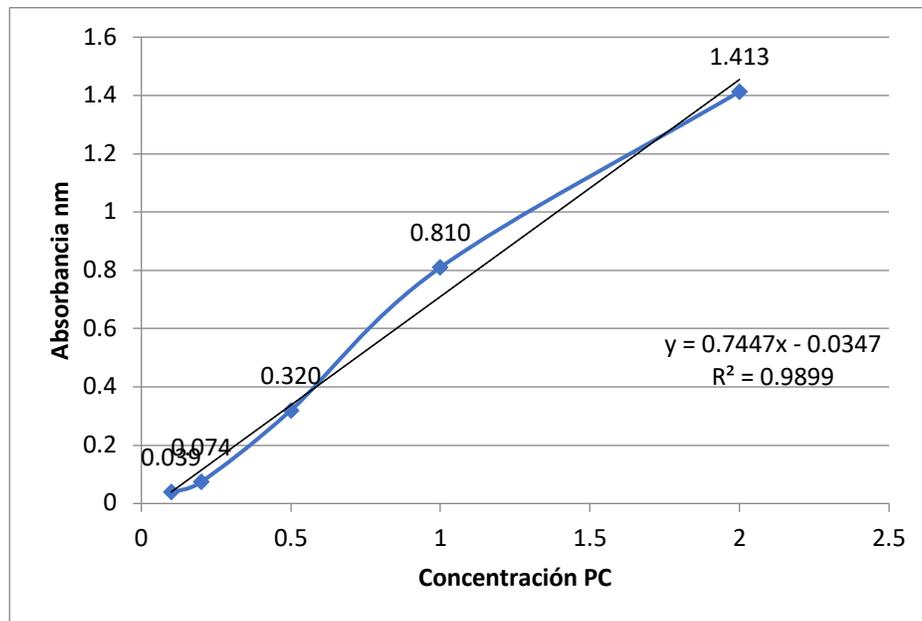


Figura 2: Curva de calibración.

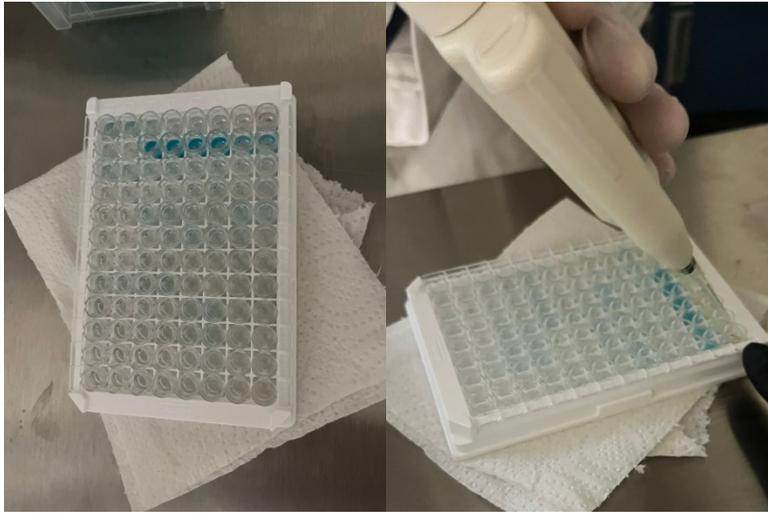


Figura 3: Procedimiento para la realización de ELISA.

Se calculó el porcentaje de metilación para cada muestra (tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de 5-metil citosinas de cada muestra calculados a partir del ensayo de ELISA.

CLAVE DE LA MUESTRA	PORCENTAJE DE 5-mc
1	0.125
2	0.140
3	0.200
6	0.327
7	0.535
8	0.157
9	0.171
10	0.096
11	0.242
12	0.178
14	0.149
15	0.244
16	0.012
17	0.097
18	0.202
19	0.092
20	0.023
21	0.083
22	0.044
23	0.054
24	0.056

25	0.090
26	0.054
27	0.186
28	0.160
29	0.044
30	0.202
31	0.038
32	0.092
33	0.028
34	0.156
35	0.081

Conclusiones

Se extrajo el ADN de 32 muestras de sangre provenientes de ladrilleros y familias de ellos, de la zona de la Yerbabuena, Guanajuato. A partir de estas muestras se determinó el porcentaje de 5 metil-citosina utilizando un kit de ELISA. El promedio de porcentaje de metilación fue de 0.136. De acuerdo con la literatura este valor medido en leucocitos de sangre periférica tendría que rondar el 1%. Sin embargo, por el rango de edades de los participantes del estudio, así como el tiempo de almacenamiento de las muestras y su preservación, podría explicarse el resultado obtenido. El análisis posterior de correlación entre estos resultados con los marcadores tempranos de daño renal y pulmonar, podría brindar información sobre la participación de mecanismos epigenéticos en la etiología de enfermedades a nivel renal y de pulmón por exposición a contaminantes en el contexto ocupacional de los ladrilleros.

Bibliografía/Referencias

- [1] Mesa-Cornejo, V. M., Barros-Núñez, P., & Medina-Lozano, C. (2006, febrero). Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. Scielo. Recuperado 10 de julio de 2024
- [2] Empleo precario | OIT/Cinterfor. (s. f.). <https://www.oitcinterfor.org/taxonomy/term/3373>
- [3] Organización Mundial de la Salud. (2021). OMS/OIT: Casi 2 Millones de Personas Mueren Cada Año Por Causas Relacionadas Con El Trabajo.
- [4] Berumen-Rodríguez, Alejandra Abigail, Pérez-Vázquez, Francisco Javier, Díaz-Barriga, Fernando, Márquez-Mireles, Leonardo Ernesto, & Flores-Ramírez, Rogelio. (2021). Revisión del impacto del sector ladrillero sobre el ambiente y la salud humana en México. *Salud Pública de México*, 63(1), 100-108. Epub 15 de agosto de 2022.
- [5] Garcia-Sepulveda, C. A., Carrillo-Acuña, E., Guerra-Palomares, S. E., & Barriga-Moreno, M. (2009). Maxiprep genomic DNA extractions for molecular epidemiology studies and biorepositories. *Molecular Biology Reports*, 37(4), 1883-1890. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9624-1>