

COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DE ADN MITOCONDRIAL EN ADULTOS DE DOS SITIOS DE ALTA MARGINACIÓN

Álvarez Cisneros Daniela (1), Alegría Torres Jorge Alejandro (2), Flores Ramírez, Rogelio (3), Díaz Barriga Martínez Fernando (3), Batres Esquivel Lilia Elisa (3), García Torres Lizeth (4)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [dan_y_ac@hotmail.com]

2 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ja.alegriatorres@ugto.mx]

3 [Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí] | [letcay@uaslp.mx]

4 [Laboratorio de Investigación Molecular en Nutrición, LIMON, Universidad del Centro de México UCEM] | [liz_gato88@hotmail.com]

RESUMEN

El ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) es una molécula circular compuesta por 16 569 pares de bases, contiene información para 37 genes, el tipo de herencia genético mitocondrial, su localización y la poliplasmia (alto número de copias en cada célula), proporcionan caracteres genéticos que lo diferencian del ADN nuclear. Cada célula contiene entre 1000 y 10000 copias de ADNmt dependiendo del tejido, cada mitocondria contiene entre 2 y 10 moléculas [1]. El ambiente es un gran influyente en la salud humana, los contaminantes pueden causar daño a nivel molecular aumentando el estrés oxidativo, esto impacta en las células e interviene en mutaciones del ADNmt formando una poliplasmia [2]. Materiales: Termociclador para PCR en tiempo real, oligonucleótidos específicos para un fragmento del genoma mitocondrial y el gen de Betaglobina, placas de 96 pozos y enzima Super Mix de EvaGreen, entre otros. Resultados: Se estandarizó y determinó el número de copias de ADNmt en leucocitos de 51 personas de la Huasteca Potosina, sin correlacionar con un biomarcador de exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (1-OHpireno). Conclusiones: Se determinó el número de copias relativo de ADNmt por qPCR en leucocitos de sangre periférica como biomarcador de daño temprano, sin encontrarse asociación a ningún factor ambiental.

ABSTRACT

Mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA) is a circular molecule composed of 16,569 base pairs, contains information for 37 genes, the type of mitochondrial genetic inheritance, its localization and polyplasmia (high number of copies in each cell) that differentiate it from the Nuclear DNA. Each cell contains between 1000 and 10000 copies of DNA, depending on the tissue, each mitochondria contains between 2 and 10 molecules [1]. The environment is a major influencer in human health, pollutants can cause damage at the molecular level to increase oxidative stress, this impacts on cells and intervenes in DNA mutations by forming a polyplasm [2]. Materials: Thermocycler for real-time PCR, specific oligonucleotides for a fragment of the mitochondrial genome and Betaglobin gene, 96-well plates and enzyme Super Mix of EvaGreen, among others. Results: The number of DNA copies in the leucocytes of 51 people of the Huasteca Potosina was determined, without correlating with a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (1-OH pyrene). Conclusions: The number of DNA-related copies per qPCR came from periferic blood leukocytes as a biomarker of early damage, without association with any environmental factors.

Palabras Clave

Estrés oxidativo; Biomarcador; copias de ADN mitocondrial, Exposición a PAHs

INTRODUCCIÓN

ADN mitocondrial como biomarcador de estrés oxidativo

Los biomarcadores moleculares son indicadores de un proceso biológico o perturbación en etapas tempranas antes de que aparezca una enfermedad o su progresión. Se busca correlacionar estos biomarcadores moleculares con algún biomarcador de exposición, como puede ser la huella química de los metabolitos de algún contaminante ambiental o el propio contaminante en una matriz biológica como orina o sangre [3].

Estrés oxidativo y daño celular

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva a un estado de estrés oxidativo y este estado se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes, causando daño y muerte celular [6].

- *Radicales libres y especies reactivas*

Los radicales libres son moléculas que contienen un electrón no apareado, esta característica los hace sumamente reactivos y capaces de dañar a otras moléculas transformándolas a su vez en moléculas muy reactivas, una reacción en cadena que causa daño oxidativo, desde células hasta tejidos. Las especies reactivas incluyen a las de oxígeno (ROS), se forman como productos del metabolismo de los radicales libres, y aunque no todas son radicales libres, son moléculas oxidantes que se transforman fácilmente en radicales libres lo que les confiere la característica de ser compuestos muy dañinos para las células [4].

ADN mitocondrial

La mitocondria es un organelo de doble membrana, contenido en el citoplasma de las células eucariontes. Como el núcleo, la mitocondria es una fuente de ADN dentro de la célula. El genoma mitocondrial codifica para 13 polipéptidos de la cadena respiratoria mientras que los 79 polipéptidos restantes son codificados por el núcleo. Estos polipéptidos se combinan para crear los complejos respiratorios necesarios para el transporte de electrones durante la cadena respiratoria y para la generación de ATP. La mitocondria metaboliza oxígeno constantemente, produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS) como subproducto, siendo este organelo la principal fuente de ROS en la mayoría de las células de los mamíferos. El ADN mitocondrial es probablemente el blanco molecular más sensible a la acción de los ROS ya que está situado en la membrana mitocondrial interna, donde se producen los ROS. Por otra parte, el ADNmt es de tamaño pequeño y no está protegido por proteínas histonas, como el caso de ADN nuclear. Otro factor que influye en la susceptibilidad del ADNmt, es su limitada actividad de reparación ante el daño [5].

- *Disfunción mitocondrial*

La disfunción mitocondrial está asociada fuertemente a distintos desórdenes metabólicos. En el músculo esquelético, una disminución de la capacidad respiratoria de la mitocondria disminuye la producción de ATP y un incremento en la producción de ROS, llevando una disminución en la oxidación de ácidos grasos libres, lo cual puede llevar el desarrollo de resistencia a la insulina, obesidad y diabetes [5]. Se puede asociar la variación en el número de copias de ADNmt con la exposición a contaminantes ambientales, ya que el ADNmt presenta una tasa de mutación espontánea 10 veces superior a la del ADN nuclear.

Sitios de alto riesgo para Enfermedades Pulmonares

En 2010, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) llegó a la conclusión, que las emisiones procedentes de la combustión de biomasa y de carbón en interiores domésticos son probables cancerígenos. Aproximadamente el 80 % de los casos de cáncer de pulmón son asociados al tabaco y el 20 % restante a la exposición secundaria a humo, radón, asbestos, algunos metales, compuestos orgánicos (incluyendo hidrocarburos aromáticos policíclicos carcinogénicos (PAH)) [3].

Objetivo del proyecto

Realizar un análisis epidemiológico usando el ADN mitocondrial como biomarcador de genotoxicidad, en un grupo de personas expuestas a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

Hipótesis

La exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos provenientes de humo de leña y de la combustión de materia orgánica, es un factor de riesgo de genotoxicidad mitocondrial, el cual puede ser evaluado mediante qPCR para medir el número de copias relativo de ADN mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de Población Vulnerable

Se incluyeron muestras provenientes de 51 personas de las Las Terceras, S.L.P. una zona con más de 100 ladrilleras. Se seleccionaron, 51 adultos entre 30 y 65 años que siempre hayan vivido en el sitio. Esto, como parte de un proyecto Conacyt en donde se aplicó un cuestionario para conocer las variables sociodemográficas, historial de salud, y la potencial exposición a humo de tabaco y/o de las actividades de la zona [3].

Muestreo y recolección de datos

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas por punción venosa, se recogieron en tubos de EDTA y se conservaron a -80°C . También, se consideró

el peso y la talla para calcular IMC según las tablas para la edad de la OMS en el 2006.

Los adultos con IMC igual o superior a 25 se consideraron con sobrepeso, mientras que los adultos con IMC igual o superior a 30 fueron considerados obesos [7]. Otras variables sociodemográficas también fueron recolectadas por cuestionario.

Purificación de ADN

El ADN se aisló a partir de sangre conservada a -80°C . En resumen, se añadieron 1 ml de sangre con una solución de lisis de pH 7,5. (Sacarosa 0,3 M, Tris - HCl 10 mM, pH 7,5, MgCl_2 , 5 mM, y 1% de Triton X - 100). Los leucocitos se obtuvieron por centrifugación, se lavó con la solución de lisis. La pastilla fue posteriormente suspendida en HCl 10 mM a pH 8 y lisado con detergente a una concentración de 10 mg/ml [8]. Las proteínas se precipitaron con 5M NaCl y el sobrenadante se trató con isopropanol a temperatura ambiente, el ADN se lavó con etanol al 70% y se deja secar a temperatura ambiente, se resuspendió en solución de rehidratación libre de nucleasas, se incubó por una hora en baño María (70°C). Finalmente, las muestras se analizaron con la ayuda de un espectrofotómetro UV a 260 y 280 nm. La relación 260/280 entre 1.4 y 2 se consideró óptima. Las muestras de ADN se normalizaron hasta una concentración final de 7 ng/mL y se congeló hasta su uso. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co.

Cuantificación del número de copias relativo del ADN mitocondrial

De acuerdo a información proporcionada, como parte del estudio previamente mencionado y aprobado por el CONACYT. Se midieron alteraciones genómicas mediante el número de copias de ADN mitocondrial (marcador de desequilibrio del genoma mitocondrial) en leucocitos de sangre periférica. De igual manera se cuantifica 1-OH pireno (1-hidroxipireno, metabolito del benzo (a) pireno compuesto representativo de los PAH's) en muestras de orina

por HPLC, esto último realizado por el grupo de trabajo de la UASLP [3].

El número de copias relativo de ADNmt se cuantificó por qPCR relacionando el producto de amplificación de un fragmento del genoma mitocondrial con respecto un fragmento del gen nuclear de copia única de Betaglobina, (Mt/S). Para evaluar el número de copias de ADN mitocondrial se realizó una curva estándar construida con diluciones de un ADN de referencia compuesto de 20 muestras aleatorias del mismo estudio (50 ng/ μ L de cada muestra de ADN). El rango de concentración para las curvas fue de 11 a 0.34375 ng/ μ L. Las relaciones Mt/S fueron calculadas para cada muestra por qPCR expresado como Cq al valor derivado de la curva estándar. La composición de cada PCR fué de 7 μ L SuperMix SoFast EvaGreen® (Bio-Rad®) y 3 μ L de ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para el fragmento mitocondrial fueron: (F) 5'-CACCCAAGAACAGGG TTTGT-3' y (R) 5'-TGGCCATGGGTATGTTGTTA-3', para el gen Beta- globina fueron: (F) 5'-GCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC-3' (R) 5'-CACCAACTTCATCCACGTTCCACC-3'. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador CFX96 Touch Sistema de detección de PCR en tiempo real (Bio-Rad). Las condiciones de amplificación para el fragmento mitocondrial y para el de beta-globina fueron: 1 ciclo a 95°C durante 3 min; 35 ciclos a 98°C durante 15 s; y 3 subsiguientes ciclos a 58°C durante 60 s, 95°C durante 15 s, 60°C durante 15 s, y 45°C durante 15 s. Los datos fueron analizados en el software de detección CFX96 (Bio-Rad®). Todos los ensayos de PCR se realizaron por triplicado [7]. Los fragmentos amplificados fueron corroborados posteriormente por electroforesis en gel de agarosa.

Análisis Estadístico

Se calcularon las medias, desviaciones estándar y porcentajes para las variables. La media geométrica de 1-OH pireno y ADNmt fueron comparadas por grupos de edad, sexo e IMC usando el método de prueba no paramétrica, U Mann-Whitney, para correlacionar ambos

biomarcadores, el análisis se hizo con los coeficientes de correlación de Spearman (r). Todos los análisis se realizaron con un paquete de software estadístico SPSS Versión 22.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 51 personas adultas fueron incluidos en este estudio de de las Terceras, San Luis Potosí, 37 mujeres y 14 hombres. Se muestra la curva de amplificación de qPCR. Los resultados fueron los esperados de un ensayo característico y óptimo; Eficiencia (E); 94.8% (90-105%). Curva lineal estándar (R^2); 0.995 (>0.980) y pendiente; -3.453.

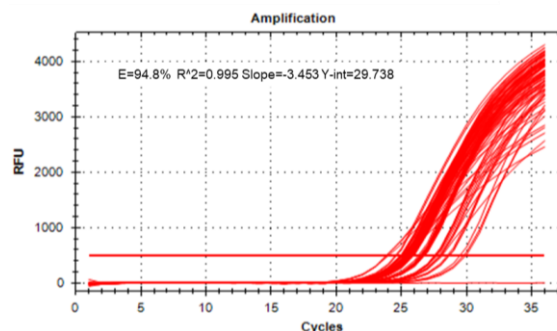


Imagen 1. Curva de amplificación de qPCR (Coeficiente de fluorescencia vs. Ciclos de reacción)

Se observó un alto porcentaje de personas con sobrepeso (62.7%), así como de personas con obesidad (5.8%) (Tabla 1). Posteriormente, se hizo la correlación entre biomarcadores para conocer si el nivel de 1-OH pireno modifica el número de copias de ADN mitocondrial. Después del análisis de correlación entre variables independientes, no se encontró entre el 1-OH pireno (medido en μ mol/mol de Creatinina) y ADNmt (Coeficiente de correlación de Spearman; 0,170, $p < 0,05$).

La significancia (p) resultó de 0.233, (Tabla 2), en donde, se utilizó el logaritmo del valor de Mt/S para normalizar los resultados y después obtener el coeficiente de correlación buscado ($p < 0.05$). Los valores al ser mayores, indican que las correlaciones no son significativas y no se acepta la hipótesis.

Tabla 1: Características del grupo de estudio de Las Terceras

VARIABLES	Media ± De	N (%)	Vref
1. No. participantes		51 (100)	
2. Edad	55.03±11.76		
3. Sexo			
Femenino		37 (72.5)	
Masculino		14 (27.4)	
4. IMC [8]	26.01±0.48		
Peso Normal		15 (29.4)	18.5-24.99
Sobrepeso		32 (62.7)	≥25
Obesidad		3 (5.8)	≥30
5. 1-OH pireno (µmol/mol Creatinina)	1.28±0.80	1 (1.96)**	4 [9]
6. Copias de ADNmit	1.09±0.40		

DE, desviación estándar; IMC, índice de masa corporal; VRef, valor de referencia; número de personas por encima VRef (**)

Tabla 2. Coeficientes de correlaciones de Spearman

Correlaciones			
	Mt/S	Log Mt/S	1-OH pireno (µmol/mol Creatinina)
Mt/S	1.00	1.00	0.170*
Log Mt/S	1.00	1.00	0.170*
1-OH pireno (ng/g Creatinina)	0.170*	0.170*	0.170*

Mt/S; relación del producto de amplificación de qPCR entre los fragmentos del genoma mitocondrial y Beta-globina; P mayor a 0.05*

CONCLUSIONES

Se determinó el número de copias relativo de ADNmt de forma exitosa cumpliendo con los controles de calidad (E, R² y pendiente) pero no se encontró correlación entre este biomarcador y el 1-OH pireno en orina.

AGRADECIMIENTOS

A los investigadores Dr. Jorge Alegría y la, a la Mtra. Lizeth García de la Universidad del Centro de México (S.L.P), al CONACYT, por el financiamiento del proyecto, y a las compañeras Sara Landeros y Gabina Mendoza Universidad de Guanajuato.

REFERENCIAS

- [1] Solano A, Playán A, López-Pérez MJ, Montoya J. Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. Salud Publica Mex 2001; 43:151-161. Artículo completo se encuentra: <http://www.insp.mx/salud/index.html>
- [2] Byun, H. Baccarelli, A. Environmental exposure and mitochondrial epigenetics: study design and analytical challenges. (2013). Laboratory of Environmental Epigenetics, Harvard School of Public Health, Boston, MA 02115, USA
- [3] Carrizales, Y. Flores, R. Barriga, M. Ilizaliturri, H. Medellín, G. Van Brussel, E. Quesada, S. Alegría, T. Batres, E. Cubillas, T. Zuki, O. Calderón, L. (2014). Huellas químicas de daño pulmonar en poblaciones vulnerables expuestas a hidrocarburos aromáticos policíclicos. (pp. 1-40).
- [4] Dorado, M. Rugerio, V. Rivas, A. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. Revista Fac. Med. UNAM. 46 (6), 229-230.
- [5] Sierra, A. & Alegría, J. (2014). Diagnóstico de Síndrome Metabólico y uso de marcadores moleculares de efecto temprano en el personal administrativo y académico de la Universidad del Centro de México (UCEM). San Luis Potosí, México. 31-36.
- [6] WHO-IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2010: Geneva
- [7] Alegría, T. Velázquez, V. López, G. Chagoya, M. Rocha, A. Costilla, S. García, T. (2016) Association of Leukocyte Telomere Length and Mitochondrial DNA Copy Number in Children from Salamanca, Mexico. Genetic testing and molecular biomarkers. 20(11), 654-657
- [8] Diario Oficial de la Federación (2013). NORMA Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación.
- [9] AIOH Exposure Standards Committee. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and occupational health issues. Position Paper. (5-7). Obtenido del sitio web: <https://www.aioh.org.au/documents/item/100>