



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR AGENTES MUTAGÉNICOS
MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: THOMAS ALBERTO LEORO GARZÓN

PAMELA VIRGINIA PADILLA QUIZHPI

TUTOR: ANDREA DENISSE BENÍTEZ QUINTANA

Quito-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Nosotros, Thomas Alberto Leoro Garzón con documento de identificación N° 1716999188 y Pamela Virginia Padilla Quizhpi con documento de identificación N° 1727522631; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 8 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Thomas Alberto Leoro Garzón
1716999188



Pamela Virginia Padilla Quizhpi
1727522631

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Thomas Alberto Leoro Garzón con documento de identificación No. 1716999188 y Pamela Virginia Padilla Quizhpi con documento de identificación No. 1727522631 expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de la genotoxicidad inducida por agentes mutagénicos mediante el ensayo cometa” el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 8 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Thomas Alberto Leoro Garzón
1716999188



Pamela Virginia Padilla Quizhpi
1727522631

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Andrea Denisse Benítez Quintana con documento de identificación N° 1709194938 docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD INDUCIDA POR AGENTES MUTAGÉNICOS MEDIANTE EL ENSAYO COMETA realizado por Thomas Alberto Leoro Garzón con documento de identificación N° 1716999188 y por Pamela Virginia Padilla Quizhpi con documento de identificación N° 1727522631 obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 8 de Agosto del año 2023

Atentamente,



Lic. Andrea Denisse Benítez Quintana M.Sc.

1709194938

Dedicatoria

Este trabajo de titulación está dedicado a mi padre, el Dr. Galo Leoro, quien no solo apoyó y guió el proceso, sino que también proporcionó el material para llevar a cabo el trabajo experimental, su apoyo incondicional ha sido vital para mí durante toda mi formación universitaria.

Esta tesis dedico a Dios, mis padres, hermanos, amigos, familia por ser apoyo en mi vida universitaria y por forjar en mi valores y anhelo de superación personal día a día. A todas las personas que aman o desean ingresar en el mundo de la investigación para buscar mejorar la calidad de vida en la sociedad. No existen límites, al contrario, somos fuente de soluciones ante nuevos desafíos en la vida diaria y profesional siendo pilares de innovación e investigación para construir un mundo más humano

Agradecimiento

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand mores, so that we may fear less”

Marie Curie

Quiero agradecer a mi madre, Vivian Garzón, por su inquebrantable apoyo y amor como madre, que ha sido el motor de mi tenacidad. En los momentos más difíciles, su presencia y palabras de sabiduría me han permitido seguir adelante; mi hermana Paula Leoro por contribuir académicamente a mi carrera y desarrollo personal. Su ayuda y consejos han sido muy útiles a lo largo del camino.

Agradezco a Abigail Proaño, por su apoyo y presencia absoluta a lo largo de mi desarrollo académico y personal. Su apoyo incondicional me ha ayudado a levantarme y continuar. A mi grupo de trabajo: Pame, Karen, Greisy y Asly por su apoyo, presencia y resiliencia. Nuestro trabajo en equipo ha sido esencial para superar obstáculos y finalmente, a mí mismo, por haber perdurado.

“Los que conocemos es una gota, lo que no conocemos es un océano”.

Isaac Newton

Mi gratitud, primero al Dios de la vida, pilar y fuente del bien: a mis padres Jaime y Alexandra mis motores, quienes estuvieron en todo momento caminando conmigo a lo largo de la carrera universitaria, siendo mi compañía de desvelos, caídas, alegrías, modelos de superación, ejemplo de esfuerzo y dedicación; a mis hermanos Santiago y Jessica por ser mi motivación; mis amigos Thomas, Karen, Asly, Greisy con quienes he caminado en este trayecto lleno de aprendizajes y emociones cerrando un capítulo extraordinario; a Christopher por su presencia, apoyo incondicional e impulso en este caminar; a los docentes de la carrera por su testimonio de formación y entrega, por mostrarnos el mundo desde otra perspectiva enseñándonos a amar la investigación; a nuestra tutora Denisse Benítez por ser guía, aconsejarnos y confiar en nuestras capacidades para la investigación y desarrollo del presente trabajo. Sin duda el impulso investigativo y especial reconocimiento merece el Dr. Galo Leoro, quien motivó a la realización de la investigación y por quien no habría sido posible esta investigación sin el apoyo y acompañamiento incondicional en el mismo.

Resumen

Los agentes mutagénicos son los principales causantes de daños al ADN, precursores de mutaciones ocasionando errores en las funciones de la célula, por esta razón se busca estandarizar el protocolo modificado de ensayo cometa. Adicionalmente, se utilizan las enzimas de reparación FPG y ENDO III para identificar el tipo de daño oxidativo en la célula al ser inducidas por agentes como: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), luz ultravioleta (UV) y bromato de potasio ($KBrO_3$).

El trabajo consiste en el aislamiento de linfocitos a partir de sangre periférica con el uso de un gradiente de densidad, Ficoll. Se realiza una lisis celular que permite la liberación del ADN, seguido de un proceso de alcalinización y una electroforesis de células individuales permitiendo la migración por carga del material genético. Posteriormente, se realiza una tinción con el colorante fluorescente de ADN, DAPI y se visualiza en un microscopio de fluorescencia con el filtro correspondiente, se identifica por medio de una lámpara de mercurio a una longitud de onda 590 nm la formación de una cola o cometa, con el propósito de evaluar el grado de daño existente en el ADN. Se emplean controles negativos, positivos y con tratamiento enzimático. Los valores registrados indican el porcentaje de daño existente en las células. Se analiza las imágenes en un software de calificación automático de los cometas.

En el presente trabajo de investigación se evaluó el daño en el ADN causado por los diversos agentes mutagénicos mediante el uso de ensayo cometa en células mononucleares de sangre periférica humana. Dicha técnica es un método de alta sensibilidad y especificidad para el análisis de xenobióticos. Mediante el análisis de ensayo cometa con enzima FPG, los resultados demuestran que la inducción de daño al ADN a mutagénicos estudiados es principalmente de carácter oxidativo. Siendo el agente más dañino el bromato de potasio ($KBrO_3$), seguido de la luz ultravioleta (UV) y el menor daño, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

Palabras claves:

Linfocitos, Bromato de potasio, Luz Ultravioleta, Peróxido de hidrógeno, Ensayo Cometa.

Abstract

Mutagenic agents are the main causes of DNA damage, precursors of mutations causing errors in cell functions, for this reason the modified comet test protocol is sought to be standardized. Additionally, the repair enzymes FPG and ENDO III are used to identify the type of oxidative damage in the cell when induced by agents such as: hydrogen peroxide (H₂O₂), ultraviolet light (UV) and potassium bromate (KBrO₃).

The work consists of the isolation of lymphocytes from peripheral blood with the use of a density gradient, Ficoll. A cell lysis is carried out that allows the release of the DNA, followed by an alkalization process and an electrophoresis of individual cells allowing the migration by charge of the genetic material. Subsequently, staining with the fluorescent DNA dye, DAPI, is performed and visualized in a fluorescence microscope with the corresponding filter, the formation of a tail or comet is identified by means of a mercury lamp at a wavelength of 590 nm, with the purpose of evaluating the degree of existing damage to the DNA. Negative, positive and enzyme-treated controls are used. The recorded values indicate the percentage of damage existing in the cells. The images are analyzed in automatic comet scoring software.

In the present research work, the DNA damage caused by the various mutagenic agents was evaluated using the comet assay in human peripheral blood mononuclear cells. Said technique is a method of high sensitivity and specificity for the analysis of xenobiotics. Through the comet assay analysis with ENDO III and FPG enzyme, the results show that the induction of DNA damage to the mutagenic studied is mainly oxidative. The most harmful agent being potassium bromate (KBrO₃), followed by ultraviolet light (UV) and the least damage, hydrogen peroxide (H₂O₂).

Key words:

Lymphocytes, mutagens, genotoxicity, DNA repair enzyme, Comet assay

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	5
2.1	Daños en el ADN	5
2.2	Mecanismos de reparación del ADN.....	8
2.3	Inducción de mutagénesis mediante mutágenos en las células	11
2.4	Métodos de evaluación de la genotoxicidad.....	12
2.4.1	Prueba de cariotipos	12
2.4.2	Prueba hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	13
2.4.3	Ensayo cometa	15
2.5	Enzimas de reparación.....	17
2.5.1	FPG	17
2.5.2	ENDO III.....	18
2.6	Controles Positivos.....	20
2.6.1	Luz ultravioleta UV	20
2.6.2	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	21
2.6.3	Bromato de potasio (KBrO ₃).....	22
3	Materiales y métodos.....	24
3.1	Obtención de muestras por venopunción:	24
3.2	Separación y aislamiento de células mononucleares por gradiente de Ficoll	25
3.3	Evaluación de la extracción de células mononucleares.....	26
3.3.1	Recuento de células mediante cámara de Neubauer	26
3.4	Ensayo cometa.....	28
3.4.1	Preparación de portaobjetos con micro geles de agarosa.....	28
3.4.2	Preparación de la muestra	29
3.4.3	Inducción de células a agentes mutagénicos	30
3.4.4	Lisis de linfocitos	31
3.4.5	Tratamiento enzimático.....	31
3.4.6	Tratamiento alcalino	32
3.4.7	Electroforesis SCGE	32
3.4.8	Neutralización y fijación.....	33
3.4.9	Tinción de ADN.....	33
3.4.10	Lectura del ensayo cometa.....	33
3.4.11	Análisis de daño	34
4	Resultados y discusión.....	38

4.1	Separación y aislamiento de células mononucleares por micro técnica de gradiente de Ficoll 38	
4.2	Recuento de células mediante cámara de Neubauer	40
4.3	Preparación de slides	42
4.4	Preparación de linfocitos	43
4.5	Control positivo y negativo de células mononucleares	43
4.5.1	Controles negativos de linfocitos	43
4.5.2	Controles positivos de linfocitos con Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	45
4.5.3	Controles de linfocitos con Luz Ultravioleta (UV).....	48
4.5.4	Controles de linfocitos con bromato de potasio (KBrO ₃).....	53
5	Conclusiones y recomendaciones	56
6	Bibliografía.....	59
7	Anexos	73

Índice de figuras

Figura 1 Factores que influyen en el equilibrio entre AXO y ERO para correcto funcionamiento celular.....	6
Figura 2 Proceso de mutación en el ADN por especies ERO.....	7
Figura 3 Mecanismos de reparación de una cadena de ADN.....	9
Figura 4 Mecanismos de reparación de dos cadenas de ADN.....	10
Figura 5 Acción de mutágenos ocasionando cambios en la cadena de ADN.....	11
Figura 6 Daños estructurales en cromosomas producidos por genotóxicos.....	13
Figura 7 Procedimiento de técnica de hibridación in situ por fluorescencia (FISH).....	14
Figura 8 Daño en linfocitos humanos.....	16
Figura 9 Proceso de reparación de la enzima FPG.....	18
Figura 10 Proceso de reparación de la enzima ENDO III.....	19
Figura 11 Daño en el ADN por contacto con luz UV.....	21
Figura 12 Daño celular por acción de Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	22
Figura 13 Visualización y conteo de células en cámara de Neubauer.....	27
Figura 14 Observación de las partes del cometa y su daño en el ADN.....	34
Figura 15 Clasificación visual de cometas por su daño en el ADN.....	35
Figura 16 Visualización de las partes del cometa por medio del software Comet Assay IV.....	37
Figura 17 Obtención de linfocitos por gradiente de Ficoll.....	38
Figura 18 Recuento de linfocitos.....	40
Figura 19 Preparación de Slides NMA.....	42
Figura 20 Control negativo de linfocitos mediante ensayo cometa a 20X.....	43
Figura 21 Células expuestas a buffer enzimático a 20X y 40X.....	44
Figura 22 Control positivo de linfocitos en H ₂ O ₂ sin enzimas de reparación a 40X.....	45
Figura 23 Control positivo de linfocitos en H ₂ O ₂ con ENDO III a 40X.....	46
Figura 24 Control positivo de linfocitos en H ₂ O ₂ con FPG a 40X.....	47
Figura 25 Control positivo de linfocitos en Luz UV sin enzimas de reparación a 20X y 40X.....	48
Figura 26 Control positivo de linfocitos en Luz UV con ENDO III a 40X.....	50
Figura 27 Control positivo de linfocitos en Luz UV con FPG a 40X.....	52
Figura 28 Control positivo de linfocitos en KBrO ₃ sin enzimas a 40X.....	53
Figura 29 Control positivo de linfocitos en KBrO ₃ con ENDO III a 40X.....	54
Figura 30 Control positivo de linfocitos en KBrO ₃ con FPG a 40X.....	55

Índice de tablas

Tabla 1 Metodología para extracción de linfocitos.....	26
Tabla 2 Conteo de células mediante cámara de Neubauer (células x 10 ⁶)	41

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Cálculo de densidad celular	27
Ecuación 2 Cálculo de momento de cola (MCO)	34

Índice de anexos

Anexo 1 Diferencia significativa de las medidas de daño por buffer enzimático	73
Anexo 2 Evaluación de la diferencia significativa de acción de buffer enzimático por prueba t-student	73
Anexo 3 Diferencias significativas de las medidas de daño en H ₂ O ₂	73
Anexo 4 Evaluación de la diferencia significativa de H ₂ O ₂ ante las enzimas de reparación por prueba t-student.....	74
Anexo 5 Acción de enzimas ENDO III y FPG ante Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	74
Anexo 6 Diferencias significativas de las medidas de daño en Luz UV	74
Anexo 7 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min por prueba t-student	75
Anexo 8 Diferencias significativas de las medidas de daño por acción de la enzima ENDO III.....	75
Anexo 9 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min ante ENDO III por prueba t-student.....	75
Anexo 10 Porcentaje de ADN y longitud de cola ante exposición a 6 min de Luz UV.	76
Anexo 11 Porcentaje de ADN y longitud de cola ante exposición a 13 min de Luz UV.	76
Anexo 12 Diferencias en las medias de daño por acción de la enzima FPG tras tratamiento de luz UV en diferentes tiempos.....	77
Anexo 13 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min ante FPG por prueba t-student.....	77
Anexo 14 Diferencias significativas de las medidas de daño en KBrO ₃	77
Anexo 15 Evaluación de la diferencia significativa de KBrO ₃ ante las enzimas de reparación por prueba t-student.....	78
Anexo 16 Acción de enzimas ENDO III y FPG ante Bromato de potasio (KBrO ₃)	78

1 Introducción

La genotoxicología es considerada una disciplina de la rama de las ciencias naturales que combina la genética con la toxicología, en la cual evalúa y estudia los diversos agentes que pueden llegar a dañar el material genético en diferentes etapas del ciclo celular (Arcaute et al., 2021). Por lo tanto, el término genotóxico se refiere a sustancias que interaccionan directa o indirectamente con el ADN ocasionando alteraciones tanto estructurales como funcionales a las células, provocando de esta manera un aumento en la probabilidad de desarrollar alteraciones del ADN que conduzcan a mutaciones (Yin et al., 2022).

El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST) de España, define a un agente mutagénico como, “un compuesto que conduce a un aumento de cambios en las estructuras del material genético de una célula, y dichos agentes pueden ser de diferentes orígenes ya sean físicos, químicos o biológicos” (Arcaute et al., 2021; INSST, 2022). Los mutágenos pueden ingresar en el cuerpo por medio de inhalación, penetración, ingesta e incluso contacto, causando alteraciones en el control de la actividad celular conduciendo a un inadecuado manejo de las células (Chabicovsky et al., 2019). Los daños al ADN pueden ser considerados génicos, genómicos o incluso cromosómicos llegando a ser hereditarias (FREMAP, 2009; Quintero et al., 2009).

Por otro lado, para que un mutágeno logre ocasionar un daño en el ser humano y su material genético, se debe analizar diversos factores como son la concentración, vía de ingreso, metabolismo del organismo, tipo de célula afectada, entre otras (Arcaute et al., 2021; Gollapudi et al., 2020). Además, las acciones que se presentan en el cuerpo humano varían dependiendo del tiempo de exposición y a largo plazo, estas podrían causar lesiones en el hígado, sistema nervioso central al igual que alteraciones en células individuales. Por otro lado, a corto plazo los mutágenos pueden presentar sintomatología tales como mareos, irritación en vías respiratorias, irritación de los ojos, alergias en la piel (Quintero et al., 2009).

Durante muchas décadas, el ser humano ha estado altamente expuesto a sustancias que son nocivas para la salud, siendo muchos de estos elementos químicos, compuestos orgánicos, productos que se

encuentran de forma habitual en zonas industriales o agrícolas. Un ejemplo claro es la aplicación de pesticidas en la agricultura debido a que, en las zonas rurales, trabajadores de dichas zonas emplean productos que están en altas concentraciones y a largo plazo llegan a ser nocivos para la salud (OIT, 2014).

Los trabajadores de las zonas rurales e industriales del Ecuador tienen un alto nivel de desconocimiento de sustancias o agentes mutagénicos que pueden causar un daño en la salud y que están presentes en las actividades diarias, siendo esta la principal causa de daño al material genético en el ambiente laboral (Rodríguez et al., 2014).

Por otro lado, el daño al material genético no solamente se da por causas exógenas sino también en el día a día y de forma endógena producto del metabolismo celular, es decir, surgen daños oxidativos en el ADN diariamente por subproductos generados a partir del metabolismo normal. Adicionalmente, existe la presencia de agentes mutagénicos comunes como el humo, luz UV, smog, pesticidas entre otros compuestos oxidantes, los cuales son causales de daños en el ADN tras su exposición (Stobbe et al., 2019; Venegas, 2009) .

Con el paso del tiempo, se han establecido técnicas moleculares que son gran aporte en el estudio, detección y tratamiento de enfermedades de origen genético como son terapia génica que permite el tratamiento a enfermedades hereditarias como la distrofia muscular, Western Blot que permite cuantificar proteínas y diagnosticar enfermedades como el cáncer o detección de proteínas tumorales, entre otras, siendo estas técnicas una herramienta que proporciona información altamente útil para establecer protocolos de prevención y detección de los daños que se pueden presentar en el individuo (Rodríguez et al., 2014).

En lo que se refiere específicamente a la genotoxicidad, se han desarrollado ensayos con el fin de detectar sustancias que inducen daño al material genético. Entre los cuales se estandariza el método conocido como ensayo de electroforesis alcalina embebidas en microgel o también comúnmente llamado ensayo cometa, el mismo que es considerado uno de los métodos más confiables, sensibles y rápidos para el estudio y evaluación de daño del ADN en células individuales ya sea a las cadenas

simples o dobles, de esta manera determinando la presencia de rupturas y alteraciones en el material genético que pueden eventualmente llegar a tener efecto nocivo en la salud (Rodríguez et al., 2014).

El ensayo cometa, es un método propuesto en la década de 1980, el cual permite estudiar el nivel de desperfecto en el ADN con el fin de detectar daños ocasionados por sustancias tóxicas en células individuales. Al ser detectado el daño al ADN de forma no específica mediante el ensayo cometa, se abrirán diversas interrogantes que permitan eventualmente mediante investigación complementaria, deducir con mayor precisión los efectos que pueden tener los genotóxicos sobre el material genético y los mecanismos que conducen a los efectos nocivos (Espinosa et al., 2014).

Al ser un amplio campo de investigación en los cuales se han analizado varios estudios considerando diversos agentes casuales de genotoxicidad como ejemplos está el trabajo de Kirkland et al., (2022) en su estudio “Una revisión de peso de la evidencia de la genotoxicidad del dióxido de titanio (TiO₂)” en la cual evalúa la genotoxicidad del compuesto, identificando de esta manera su potencial mutagenicidad y carcinogenicidad por medio de ensayos cometa demostrando daños asociados al estrés oxidativo, apoptosis, necrosis, entre otros. Por otro lado, en Ecuador existe apenas un estudio realizado por Paz y Miño et al., (2007) denominado “Evaluación del daño en el ADN en una población ecuatoriana expuesta a glifosato” el cual emplea células mononucleares sanguíneas para evaluar la genotoxicidad mediante el ensayo cometa por acción del glifosato.

Sin embargo, se emplean otras técnicas moleculares como es el ensayo de micronúcleos, siendo menos certeras para el estudio respectivo de genotoxicidad en personas que han sido expuestas a agentes mutagénicos, evaluando la capacidad de un agente para provocar un daño cromosómico, también, la técnica del ensayo de aberraciones cromosómicas que analiza las alteraciones de las estructuras cromosómicas reforzándose en la técnica FISH (Barbosa et al., 2017; P. García, 2015).

Actualmente, existe en nuestro medio interés por estudiar los efectos de agentes nocivos sobre la salud de los ecuatorianos, por esta, razón, mediante el desarrollo del protocolo de este ensayo, se espera implementar una técnica sensible para evaluar agentes mutagénicos y oxidantes que provoquen daño al ADN. Adicionalmente, es de importancia la identificación del tipo de daño mediante el uso

de enzimas de reparación con la finalidad de inferir con respecto al mecanismo de acción que condujo a dichos daños (M. R. Camacho, 2018).

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo tiene el objetivo de estandarizar el protocolo general de ensayo cometa, así como su respectiva modificación mediante el uso de enzimas de reparación, específicamente, FPG y ENDO III. Se realizará la comparación de controles positivos y controles negativos con enzimas y sin enzimas al inducir daño celular tras la exposición a agentes nocivos. Los resultados nos permitirán evaluar si el ensayo cometa es un método eficiente para evaluar la genotoxicidad ante la exposición a agentes potencialmente mutagénicos y adicionalmente, permitirá mediante el uso de enzimas de reparación, vislumbrar con respecto al mecanismo inductor de los daños presentes en el ADN.

2 Fundamentación teórica

2.1 Daños en el ADN

El daño a nivel de ADN se puede dar por factores ambientales (exógenos) y metabólicos (endógenos). No obstante, el ADN posee varios mecanismos de reparación, sin embargo, las lesiones que no se reparen de forma correcta podrían dar lugar a una función limitada de la célula y/o podrían conducir a la estimulación de mecanismos de destrucción celular tales como son: la apoptosis, autofagia, necrosis o en casos extremos la activación de oncogenes con el eventual desarrollo de cáncer (Sohn et al., 2023).

Entre los factores endógenos, encontramos la formación de especies reactivas de oxígeno, también denominadas ERO, que cumplen una función vital en la producción de energía celular, donde se emplean diversos elementos que permiten desarrollar dicha actividad, uno de los cuales es el oxígeno (O_2). Este elemento deberá encontrarse en concentraciones adecuadas, ya que un exceso puede generar reacciones de oxidación, alquilación, hidrólisis, error en el emparejamiento de las bases entre otras a la molécula de ADN (Sohn et al., 2023).

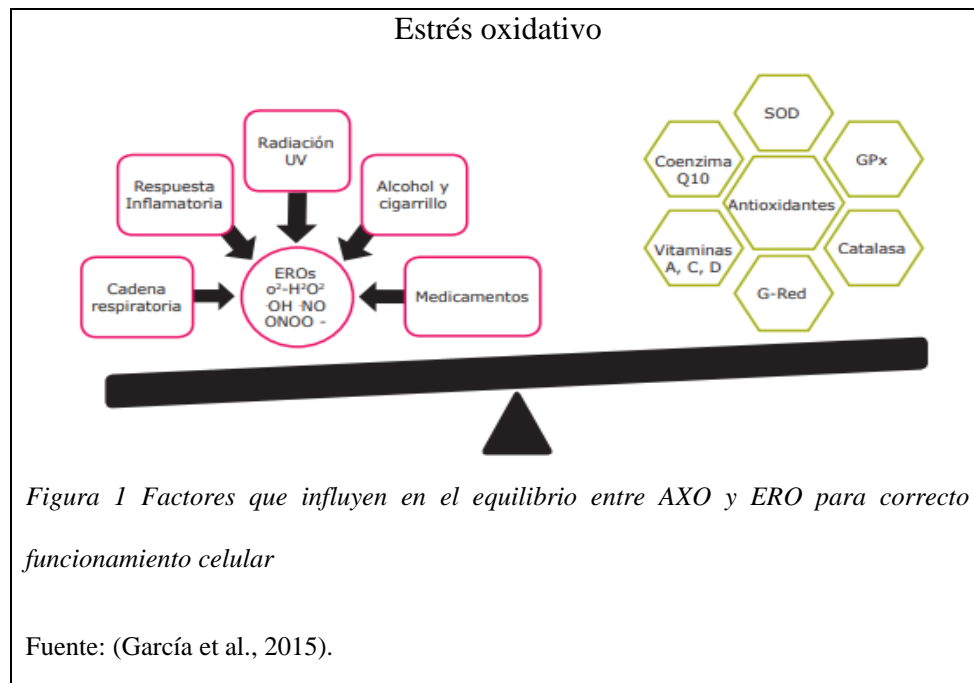
También, existen fuentes exógenas causales de daño al ADN, entre ellas están radiaciones ionizantes, hidrólisis, toxinas, químicos mutagénicos y virus. Tiene algunos roles, dentro de las cuales se puede mencionar: homeostasis, señalamientos celulares entre otras, es decir, cumplen funciones importantes para el funcionamiento celular, pero, así como ayuda en la célula, un exceso puede ser perjudicial y oxidativo para el ADN (J. M. Ortiz & Medina, 2020; Sohn et al., 2023).

Para contrarrestar el efecto de los ERO, las células eliminan estos productos tóxicos por medio de los sistemas de antioxidantes entre las cuales destacan el SOD (superóxido dismutasa) y el AOX (oxidasa alternativa) con la finalidad de restaurar el equilibrio oxidativo y de esta manera asegurar la sobrevivencia de las células (Sánchez & Méndez, 2013).

El AOX está conformado por enzimas que comprende un conjunto de electrones y nutrientes, los mismos que mitigan los efectos causados por productos tóxicos del oxígeno en grandes cantidades en

especies reactivas del oxígeno ERO; en otras palabras, se necesita un equilibrio entre AXO y ERO para un adecuado funcionamiento como se ve en la Figura 1 (Sánchez & Méndez, 2013).

Sin embargo, por la presencia de agentes endógenos como el ácido pristánico (PA) que está presente en los peroxisomas puede inducir la formación de ERO y consigo presentar un desequilibrio en las células produciendo una oxidación de la cadena de ADN originando lesiones en el material genético como bases oxidadas o rupturas de cadenas (Giros et al., 2016; Sánchez & Méndez, 2013).



Por otro lado, AOX son la primera línea de defensa celular ante el daño oxidativo, en el cual elimina el O₂ y H₂O₂. Si no existe acción y permanece el daño, entra en actividad los antioxidantes siendo la segunda barrera de defensa ante el daño (Sánchez & Méndez, 2013).

Según Valbuena et al., (2020) el daño que causa en el ADN no solo se da a nivel estructural, también se presencia en el bloqueo de procesos de replicación y transcripción pudiendo llevar a una apoptosis o un desarrollo de patologías como son las genéticas tales como cáncer, trisomías, distrofia muscular, también, enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson, entre otras.

El ADN debido a sus bases nitrogenadas es el blanco perfecto para la inducción de daño debido a la actividad de ERO la cual sería responsable por la generación de mutaciones tal como está esquematizado en la figura 2 (J. M. Ortiz & Medina, 2020).

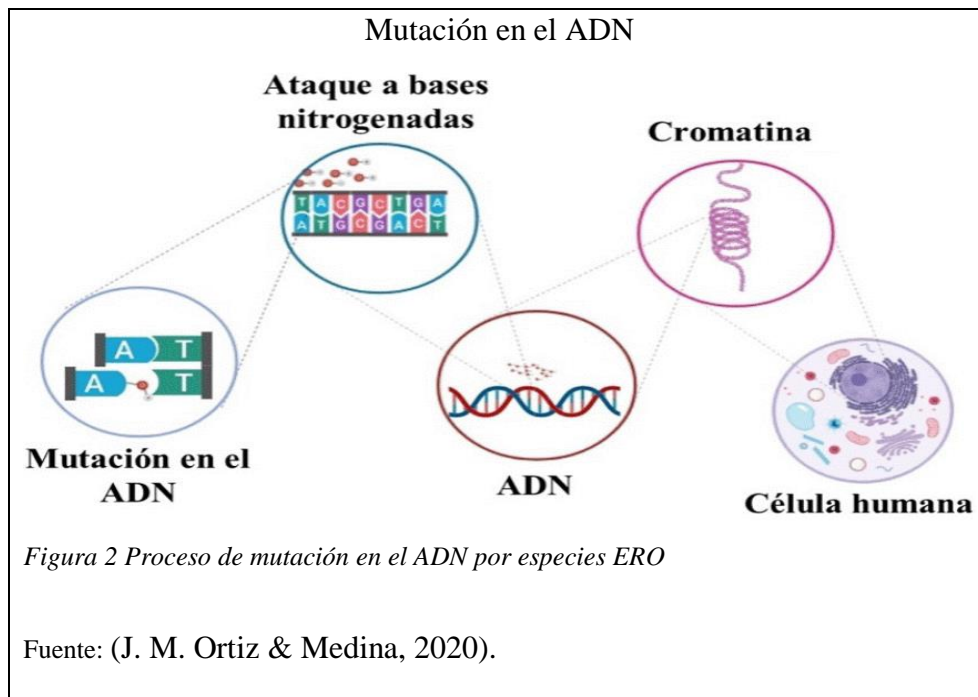


Figura 2 Proceso de mutación en el ADN por especies ERO

Fuente: (J. M. Ortiz & Medina, 2020).

El mecanismo propuesto para la producción de daño mediante ERO se basa en la oxidación de bases nitrogenadas de la cadena de ADN siendo la más común la guanina ya que tiene un potencial de reducción más bajo comparado con las otras bases nitrogenadas. La oxidación de la guanina da origen a la formación de 8-oxoguanina (8-oxoG) que atañe a la replicación y posteriormente causa la ruptura del ADN ocasionando deleciones o inserciones en el mismo. Eventualmente, se da la formación de aductos donde las ERO se unen a los esqueletos de azúcar-fosfato generando una mutación a la molécula de ADN, como se observa en la Figura 2 (Cadet & Douki, 2018; Dizdaroglu, 2015; Rodriguez et al., 2015).

Al haber elucidado el principal mecanismo mediante el cual actúa el estrés oxidativo se ha logrado desarrollar métodos y técnicas mediante las cuales se permite la detección e interpretación de los daños presentes en la molécula de ADN.

2.2 Mecanismos de reparación del ADN

El ADN en muchas ocasiones tiene la capacidad de repararse a sí mismo sin ningún problema, pero al ser el material genético importante para dar una correcta actividad celular debe ser reparado de forma fidedigna e inmediata. Son varios los mecanismos de reparación del ADN, pero el que predomina en determinada circunstancia dependerá de varios factores tales como el tipo de la célula afectada y/o la gravedad del daño inducido a la molécula (Lagunas, 2018).

Según Lagunas, (2018) al tener un daño en el ADN este puede verse afectada ya sea solo en una cadena o en las dos. El presentar daño en una sola cadena tiene la ventaja de que la otra cadena puede actuar como molde en el proceso de reparación. Entre los mecanismos de reparación de una sola cadena están los siguientes:

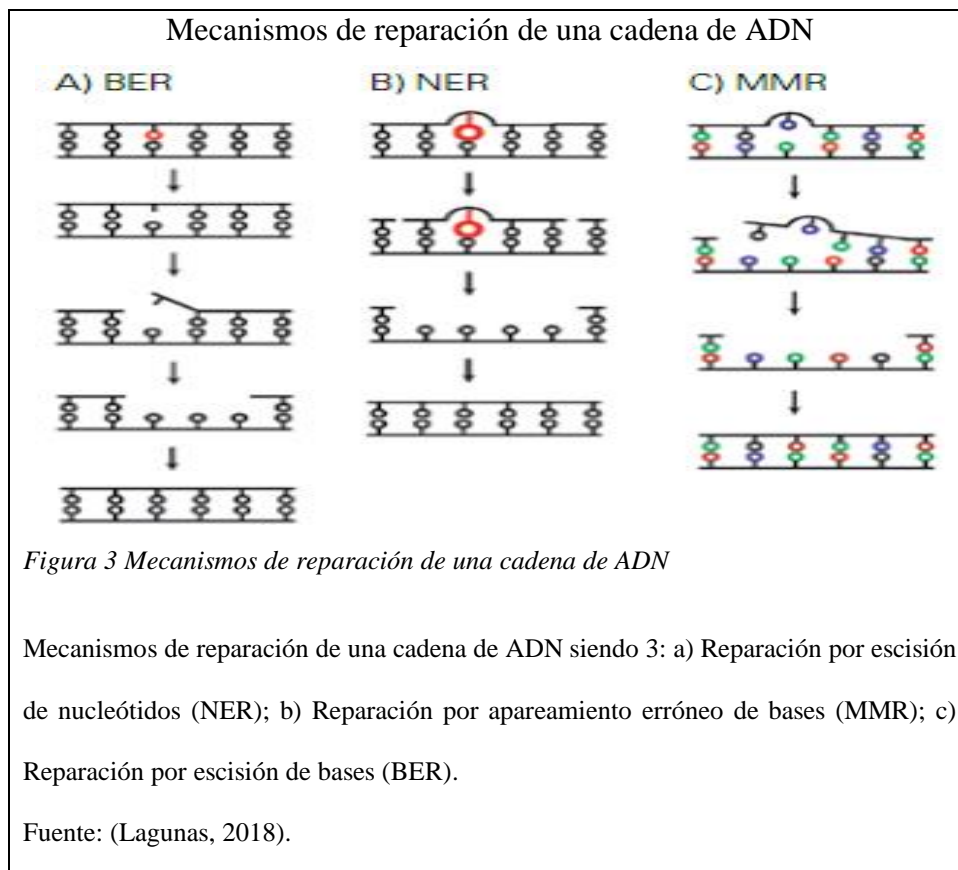
- **Reparación por escisión de nucleótidos (NER):** Se aplica cuando existe un daño en la molécula de ADN causado por radiación solar, agentes mutagénicos, quimioterapias (Tarfut & Marin, 2014). Sin embargo, la acción se lleva a cabo primero mediante el reconocimiento del daño, posteriormente endonucleasas retiran nucleótidos cercanos al daño y la cadena es reconstruida.

Este proceso es mediado por el complejo de polipéptidos (UvrABC) que reconoce el daño en el cual los azúcares son las moléculas delimitantes de tal forma que la ADN polimerasa logre reparar el vacío integrando nucleótidos faltantes con su posterior unión por medio de la ADN ligasa tal como se presenta en la Figura 3 (Lagunas, 2018).

- **Reparación por apareamiento erróneo de bases (MMR):** se encarga de remover las bases erróneas o las que no tiene complemento también denominadas mismatch con el fin de tener una estabilidad genómica y disminuir las mutaciones en el transcurso del proceso de replicación; en esta reparación actúan algunas proteínas que permiten reconocer el daño, posteriormente dicho daño se retira con ayuda de la helicasa, endonucleasas y exonucleasa que se dedica al corte del daño, mientras que la cadena se vuelve a unir por medio de la ADN

polimerasa y la ADN ligasa como lo presenta la Figura 3 (Lagunas, 2018; Tarfut & Marin, 2014).

- **Reparación por escisión de bases (BER):** Tiene la finalidad de subsanar daños oxidativos, en el cual se encarga de erradicar nucleótidos dañados que pueden generar mutaciones. En dicha reparación actúan las ADN glicosilasas que reconocen y cortan la región afectada. A continuación, la endonucleasa realiza un corte en los azúcares para eliminar el daño y la exonucleasa entra en acción dejando el espacio en la cadena para que el ADN polimerasa coloque el nucleótido correcto y selle con la ADN ligasa como lo presenta la Figura 3 (Lagunas, 2018; Tarfut & Marin, 2014).



Por otro lado, al verse afectada las dos cadenas de material genético se tiene que considerar que puede existir una pérdida de información debido al daño que se presentó en el ADN completo (Lagunas, 2018). Sin embargo, también existen mecanismos de reparación de ADN de las dos cadenas como lo presenta la Figura 4. A continuación, se detalla los siguientes mecanismos:

- **Reparación por recombinación homóloga (HR):** Dicho mecanismo repara daños causados por agentes físicos, químicos y por radicales libres (Tarfut & Marin, 2014). En este mecanismo se emplea el cromosoma hermano como molde para arreglar el daño, en el cual se usa un complejo enzimático que se une al ADN y corta los extremos de una cadena, mientras que la otra permanece larga y por medio de una enzima denominada recombinasa se une al cromosoma y repara el daño. Sin embargo, este mecanismo solo se realiza cuando los cromosomas están en metafase (Lagunas, 2018).
- **Reparación por extremos no homólogos (NHEJ):** Es considerado el mecanismo más simple y en el cual se coloca los extremos de las cadenas juntas y se reconoce por medio de las proteínas KU70 y KU80 que protegen a las cadenas de la enzima exonucleasa, haciendo así que se peguen por acción de la ligasa IV sin tener una restauración de la cadena de ADN (Lagunas, 2018; Tarfut & Marin, 2014). Además, la ventaja que presenta este mecanismo se engloba en que puede actuar en cualquier etapa del ciclo celular (Lagunas, 2018).

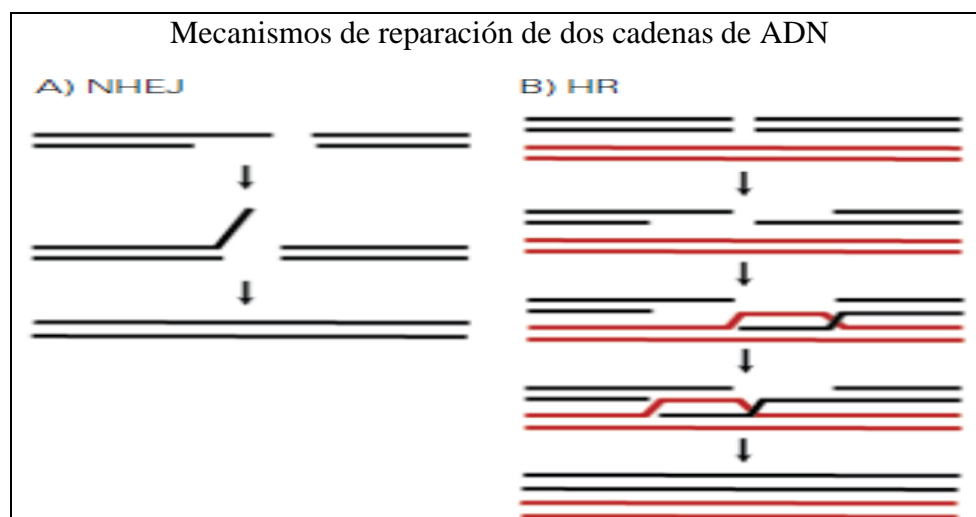


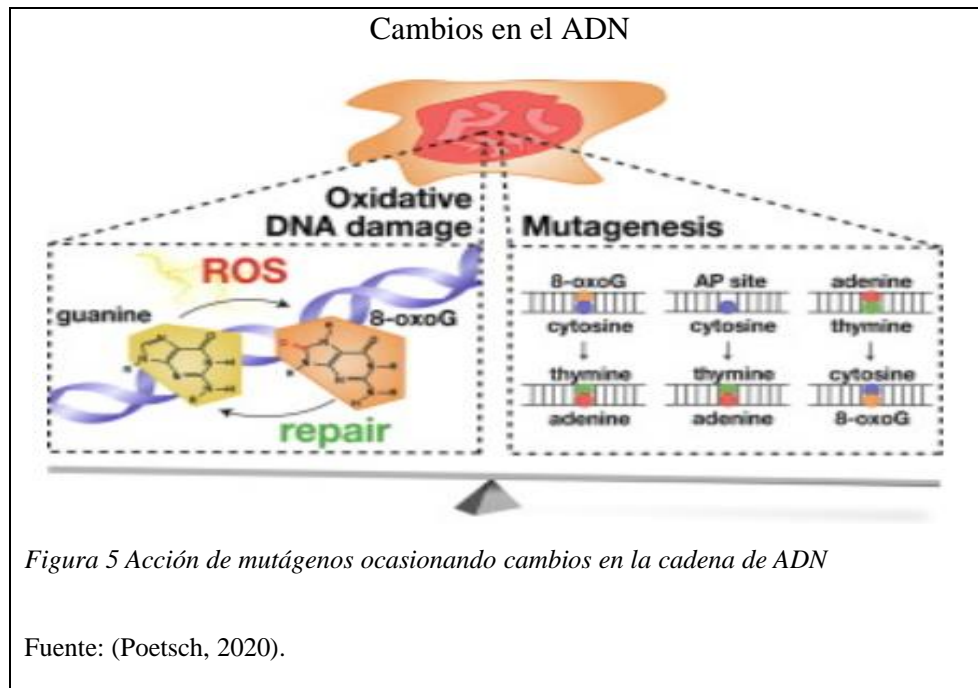
Figura 4 Mecanismos de reparación de dos cadenas de ADN

Mecanismos de reparación de las dos cadenas de ADN siendo 2: a) Reparación por recombinación homóloga (HR); b) Reparación por extremos no homólogos (NHEJ).

Fuente: (Lagunas, 2018).

2.3 Inducción de mutagénesis mediante mutágenos en las células

Según I. C. Ortiz et al., (2012), en el ambiente están presentes mutágenos en elementos como agua, tierra, aire y alimentos, con los cuales estamos en constante contacto, pero en bajas concentraciones llega a alterar la estructura de la cadena de ADN a causa de daño oxidativo como se observa en la Figura 5. Como ejemplo podemos nombrar a los hidrocarburos policíclicos aromáticos o como la furonona que está en el proceso de cloración de agua.



Según Landeros, (2012) los mutágenos se dividen en:

- Agentes físicos: inducen a las rupturas cromosómicas como son la luz ultravioleta, radiaciones, temperatura.
- Agentes químicos: ocasionan una mutación en las bases químicas que componen los genes; se los considera a productos oxidantes, redox, alquilantes, toxinas vegetales.

Por otra parte, la Fundación Mutua Madrileña de Prevención FREMAP, (2009) también clasifica los mutagénicos por categorías siendo:

- Categoría 1A y 1B: Sustancias de las que se conoce o se considera que induce mutaciones hereditarias

Frase H: H340: Provoca defectos genéticos

- Categoría 2: Sustancias que son causa de preocupación porque induce mutaciones hereditarias

Frase H: H341: Sospecha de defectos genéticos.

2.4 Métodos de evaluación de la genotoxicidad

Según I. Ortiz et al., (2012) la Agencia de protección medioambiental EPA sugiere que para realizar un análisis de genotoxicidad o riesgo en la salud se debe evaluar 4 puntos para conocer el efecto que causa en el organismo, como son:

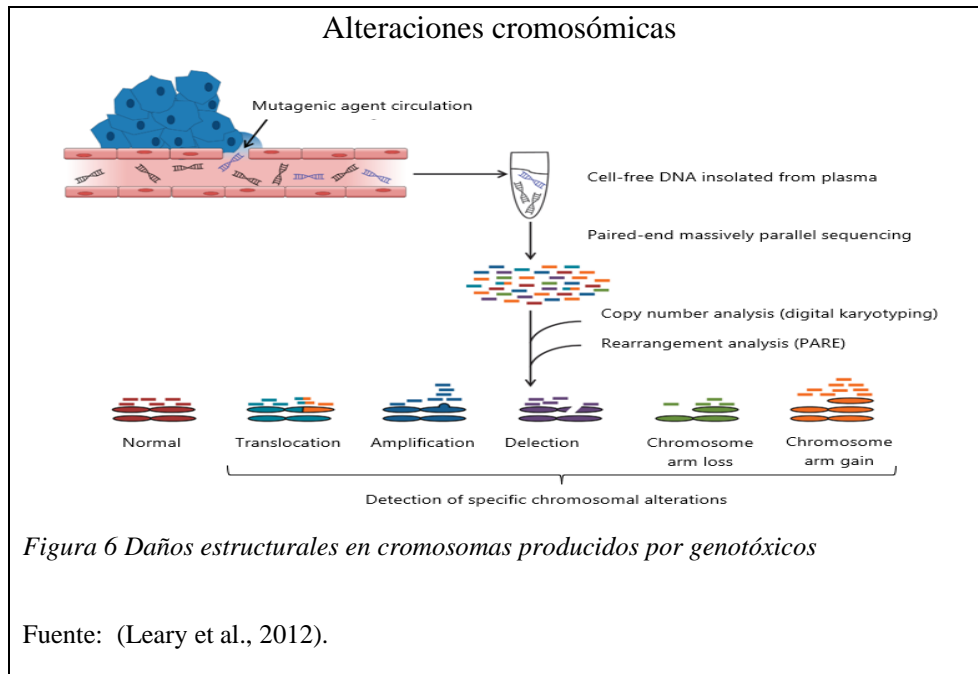
1. Identificación del peligro
2. Análisis de dosis y su respuesta correspondiente
3. Análisis de exposición
4. Caracterización del riesgo

Sin embargo, Arcaute et al., (2021) y Elespuru et al., (2022) mencionan que para evaluar la genotoxicidad se pueden emplear diversos materiales como son líneas celulares permitiendo potenciar el efecto de peligro de dicho agente mutagénico y se lo analiza por medio de pruebas FISH, ensayos cometa, estudios de micronúcleos e incluso estudio de cariotipos.

2.4.1 Prueba de cariotipos

Es considerado un estudio clásico para la observación de un daño citogenético, siendo esta prueba precisa debido a que se obtiene cromosomas en etapa de metafase y por medio de un microscopio y técnicas de bandeo se analizan los cromosomas a fin de identificar si están completos o tienen alguna alteración en su estructura (Landeros, 2012).

Arcaute et al., (2021); Landeros, (2012); Valbuena et al., (2020) en sus estudios indican que se analizan los cambios de cromosomas metafísicos y se observa las alteraciones tanto en su estructura como la presencia de aneuploidías, con el fin de conocer la actividad mutagénica que químicos ambientales pueden ocasionar en el cariotipo (Figura 6).



Por otro lado, Landeros, (2012) presenta en su estudio algunas desventajas, una de ellas es el costo y demanda de tiempo por el hecho de analizar detenidamente cada cromosoma, haciendo que sea una prueba muy poco empleada para analizar agentes genotóxicos que ocasionen un daño a los cromosomas. Adicionalmente, podría considerarse de baja sensibilidad ya que los daños a nivel de cariotipo generalmente solo se vislumbran en casos de daños muy severos.

2.4.2 Prueba hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

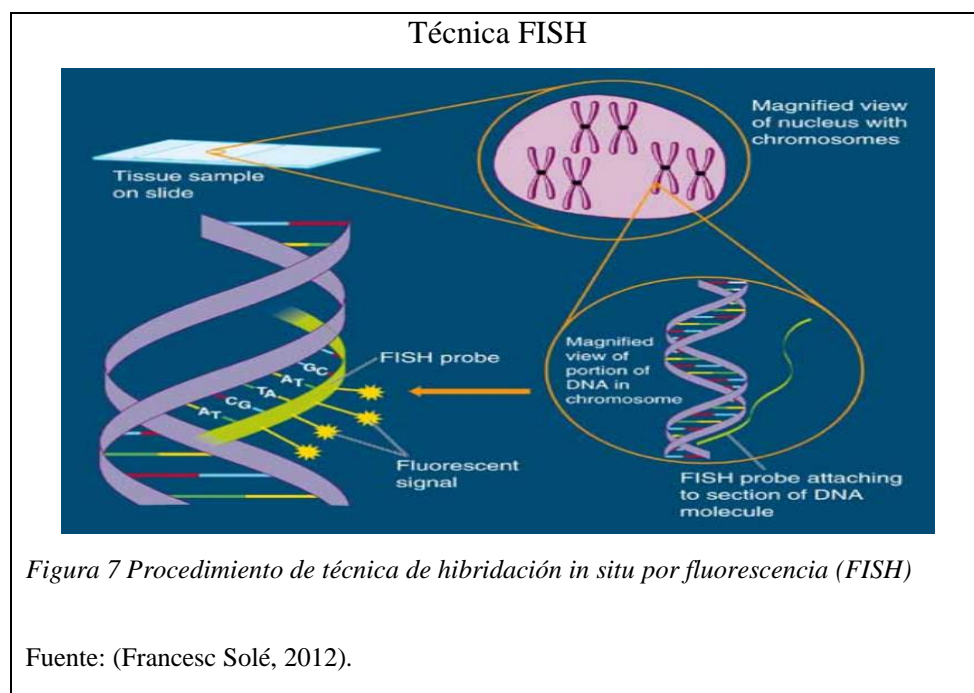
Considerada una técnica de citogenética molecular desarrollada en los años 80, la misma que consiste en la detección de anomalías en los cromosomas en la etapa de metafase o interfase. La técnica es capaz de detectar daños estructurales a nivel de locus. Esta prueba presenta una alta sensibilidad, especificidad y rapidez en la detección de secuencias en el ADN de un paciente (Roncancio et al., 2019). En la prueba FISH se emplean sondas complementarias a la secuencia objeto del análisis las mismas que son marcadas con fluorocromos como emisores de señal bajo microscopia de fluorescencia (Valbuena et al., 2020).

Los elementos usados para la técnica son:

- Sonda de ADN complementaria a la secuencia diana marcada con fluorescencia (Castro, 2009).

Adicionalmente, Castro, (2009) menciona que se puede emplear una diversidad de muestras como tejidos frescos, muestras citológicas o tejidos bajo parafina. Por otro lado, Rodríguez & Suescún, (2013) mencionan los pasos para la realización de una prueba FISH que consiste en (Figura 7):

1. Fijación
2. Preparación de la muestra
3. Hibridación
4. Lavado
5. Visualización



La técnica FISH, presenta ventajas y desventajas en la realización del método; como ventaja es que se la considera de gran utilidad en áreas genéticas medicas debido a que se puede hallar la localización puntual de genes de interés, mientras que, sus desventajas son que es una técnica complementaria al estudio de cariotipos y su análisis es costoso y requiere de elevado nivel de entrenamiento por parte del personal que realice el método y que interprete los resultados (Castro, 2009).

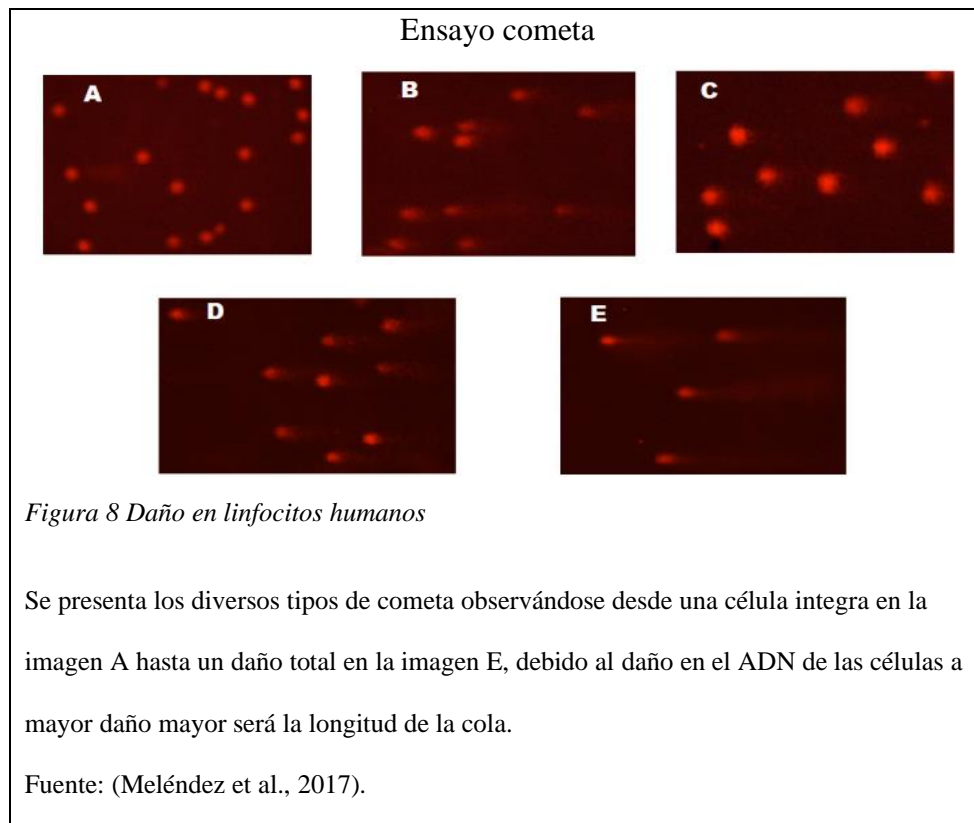
2.4.3 Ensayo cometa

La técnica de electroforesis en gel de células individuales o también conocida como ensayo cometa, consiste en colocar células individuales, en este caso, linfocitos que fueron previamente aislados y llevados a un tratamiento de lisis en gel de agarosa de bajo punto de fusión con el fin de tener una migración o recorrido que hace que el material genético se movilice hacia el ánodo gracias a las rupturas de las hebras de ADN y la carga negativa de este mismo, posteriormente, con la ayuda de colorantes fluorescentes de ADN como el bromuro de etidio o DAPI, se visualiza las placas en un microscopio de fluorescencia, permitiendo tener alta sensibilidad en la detección del daño de ADN (Lopez Montoya, 2011; Valbuena et al., 2020; Venegas, 2009).

De no existir daño, se observa una esfera compacta de ADN íntegro, caso contrario se forma una estructura con aspecto de cometa, el mismo está conformado por una cabeza y una cola, en el cual, la presencia de una cola nos indica que existe escisiones en la cadena de ADN de tipo doble o sencillo (Valbuena et al., 2020).

La electroforesis de células individuales SCGE permite evaluar las rupturas de doble cadena tras exposición a buffer alcalino $\text{pH} > 13$ el cual relaja las proteínas que mantienen al ADN enrollado y así expone estas rupturas en el material genético haciendo que la técnica sea muy sensible y de gran utilidad para el estudio de daños genéticos por exposición a sustancias tóxicas (Carrisoza, 2006).

La Figura 8 detalla los diversos grados de deterioro que pueden presentarse al visualizarse bajo microscopía de fluorescencia en el ensayo cometa. Van progresivamente desde ningún daño en la imagen A hasta un daño total en la imagen E.



Durante la electroforesis se toma en cuenta dos factores que son el voltaje/amperaje y el tiempo ya que esto permite la reproducibilidad del ensayo. Esta migración de material genético permite evaluar la cantidad de daño presente en el ADN que se ha desenrollado y separado de tal forma que migra en el gel de agarosa de bajo punto de fusión creando así una estructura denominada cola del cometa. En esta cola se mide la distancia de la migración desde el núcleo la cual indica el porcentaje de daño de ADN que ha sufrido la célula (Venegas, 2009).

2.4.3.1 Ventajas

Permite evaluar una alta variedad de células y tejidos que por diversos tratamientos pudieran verse afectadas ya sean por elementos físicos o químicos. Además, es una técnica sensible y cuantitativa, es decir, se observa actividad de respuesta a bajas dosis siendo estos niveles representativos de los daños (Cordelli et al., 2021).

Por otro lado, al ser una técnica de estudio de daño en células individuales, permite medir un gran número de células siendo esto un punto importante en cuanto a la heterogeneidad de la muestra

evaluada detectando tanto su daño como el posible mecanismo de reparación del mismo (Cordelli et al., 2021).

2.4.3.2 Desventajas

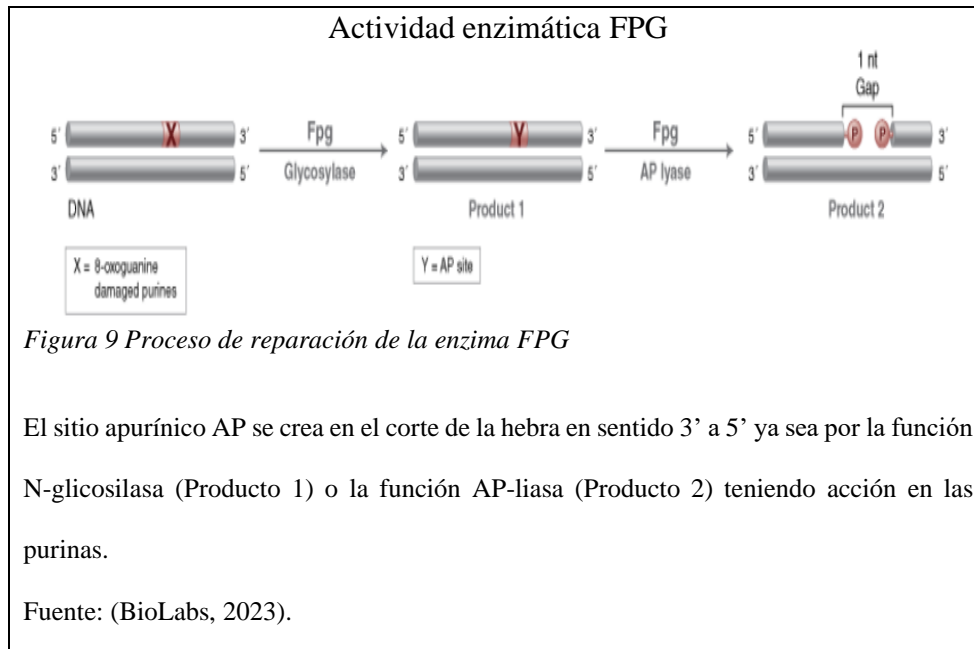
Venegas, (2009) menciona que esta técnica no se considera en su totalidad fiable debido a que el daño está muy ligado a la manera de obtención del material genético a comparación de otras técnicas. Sin embargo, al ser una técnica de alta sensibilidad, diversos factores pueden alterar los resultados, por ende, se debe manejar espacios y áreas con sumo cuidado para el análisis de dicho proceso como son diluciones, pH, temperatura, voltaje, nivel y condiciones del buffer de electroforesis, tiempo de cada etapa del ensayo cometa, luz en la habitación que pueda interferir en el ensayo o aumentar el ruido en la data.

2.5 Enzimas de reparación

2.5.1 FPG

La formamidopirimidina [fapy]-DNA glicosilasa, también denominada 8-oxoguanina DNA glicosilasa, realiza dos funciones enzimáticas que son la función N-glicosilasa y la función AP-liasa. Cuando la N-glicosilasa libera las purinas de la doble cadena que presentan daño, se crea un sitioapurínico (AP). Por otro lado, cuando entra en actividad la AP-liasa, ésta corta los extremos fosfato 3' y 5' del sitio AP el cual se llega a eliminar formando un hueco de 1 base (Figura 9) (Prakash et al., 2012; Wink & Laval, 1994).

La enzima FPG tiene la capacidad de reconocer bases dañadas como son 7, 8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina), 8-oxoadenina, fapy-guanina, metil-fapy-guanina, fapy-adenina, aflatoxina B1-fapy-guanina, 5-hidroxi-citosina y 5-hidroxi-uracilo (Wink & Laval, 1994).



2.5.2 ENDO III

La enzima endonucleasa III es proveniente de *E. coli*, y posee actividad bifuncional en la reparación del ADN como es AP-liasa y N-glicosilasa. La actividad de la N-glicosilasa libera pirimidinas dañadas del ADN de doble cadena creando un sitio AP, en el cual la actividad AP-liasa de la enzima corta el 3' al sitio AP y libera un fosfato 5' y un azúcar con un anillo 3' abierto (Yang et al., 2019) como se ve en la Figura 10.

La ENDO III distingue y descarta ciertas bases dañadas como son la urea, la 5,6 dihidroxitimina, la timina glicol, la 5-hidroxi-5 metilhidantoína, el uracilo glicol y la 6-hidroxi-5,6-dihidrotimina (Yang et al., 2019).

El proceso de respiración aeróbica conduce inevitablemente al daño oxidativo de los constituyentes celulares, el cual genera especies reactivas de oxígeno que conducen a mutaciones en el genoma a través de la oxidación de las bases del ADN. Por lo tanto, no sorprende que casi todos los organismos aeróbicos hayan desarrollado la capacidad de reparar el daño oxidativo del ADN mediante elaborados mecanismos de reparación del ADN (Fromme & Verdine, 2003; Sarre et al., 2019).

Según Fromme & Verdine, (2003) y Sarre et al., (2019) la Endo III es una enzima reparadora del ADN que está ampliamente presente y es responsable de reparar las lesiones de la base de pirimidina

oxidada en el ADN desempeñando un papel crucial en el inicio de la vía de reparación por escisión de base (BER) en ubicaciones específicas de daño en la base del ADN.

Por otro lado, posee dos funciones distintas, actuando como ADN N-glicosilasa y como β -liasa. Las glicosilasas bifuncionales exhiben una actividad bioquímica dual en la que facilitan la eliminación de una base dañada del ADN y, posteriormente, provocan el corte de la hebra 3' de la lesión. Después del procesamiento de la lesión por una ADN glicosilasa, las enzimas subsiguientes en la vía de reparación por escisión de base (BER) finalizan el proceso de reparación a través de la escisión completa del nucleósido de la lesión procesada, seguida de la repolimerización y unión por las ligasas del ADN (Fromme & Verdine, 2003; Sarre et al., 2019).

Endo III exhibe una amplia gama de especificidad de sustrato y muestra una actividad máxima hacia los sustratos de pirimidina oxidada presentes en el ADN, como la timina glicol (Fromme & Verdine, 2003; Sarre et al., 2019).

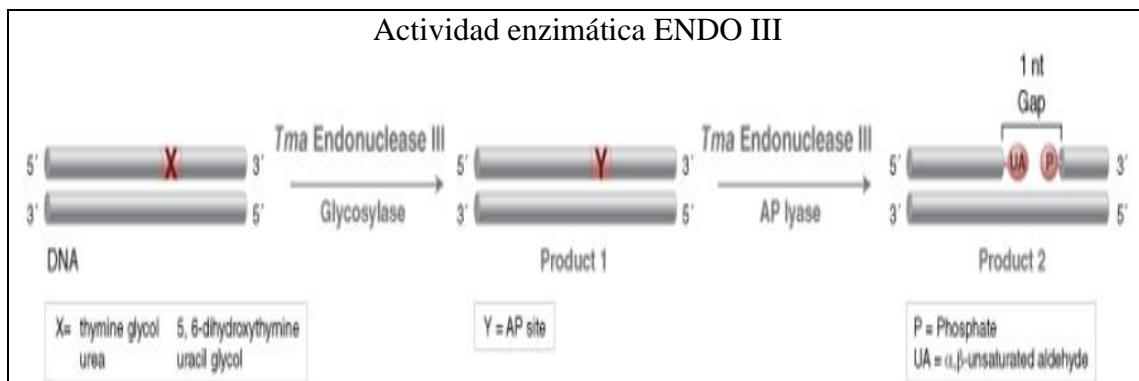


Figura 10 Proceso de reparación de la enzima ENDO III

El sitioapurínico AP se crea en el corte de la hebra en sentido 5' a 3' ya sea por la función N-glicosilasa (Producto 1) o la función AP-liasa (Producto 2) teniendo acción en las pirimidinas.

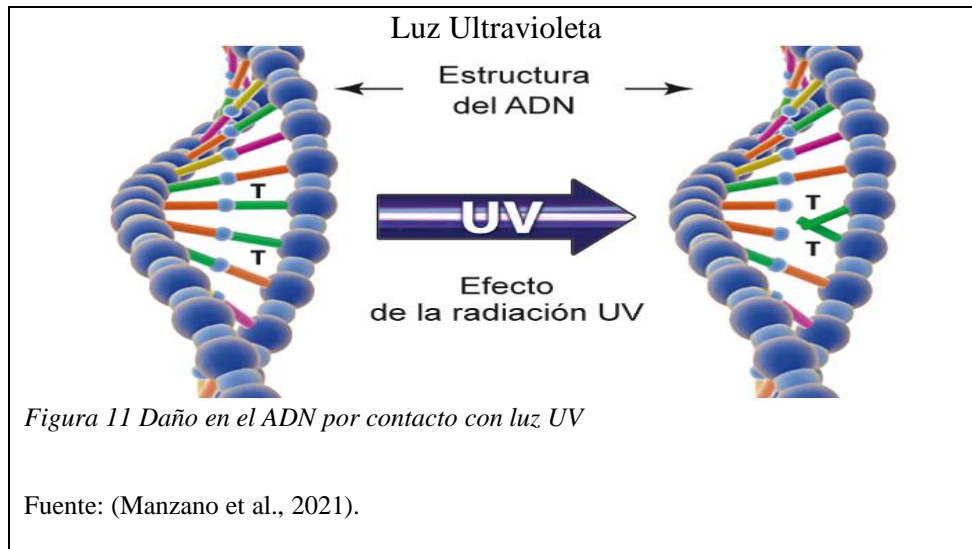
Fuente: (BioLab, 2023).

2.6 Controles Positivos

2.6.1 Luz ultravioleta UV

La luz UV o también conocida como ultravioleta es una radiación derivada de la luz solar natural siendo no ionizante, en el cual cubre un rango de luz de 100 a 400 nm (Villa Martínez, 2018), está dividida en 3 regiones o bandas:

- UV A: posee una longitud de onda de 320 – 400 nm, se la conoce como radiación de envejecimiento, causando un daño en las estructuras de la piel y desencadena procesos oxidativos celulares causando daño en el ADN y sistema inmunológico; sin embargo, es la radiación menos dañina (González et al., 2009).
- UV B: posee una longitud de onda 280 – 320 nm, se la conoce como la radiación de quemaduras, causando un daño en el genoma de los queratinocitos, detención del ciclo celular, desencadena el estrés oxidativo haciendo que reduzca su actividad de defensa a los procesos de radiación ionizante (Cabrera & López, 2006).
- UV C: posee una longitud de onda 100 – 280 nm, se la conoce como la radiación germicida o esterilizante, causando un daño en células de piel y ojos, generando un riesgo de desarrollar cáncer, es por eso que es la radiación más dañina de los rayos UV por la cantidad de energía que posee (González et al., 2009).



Los 3 tipos de luz conforman el espectro de luz ultravioleta en proporciones diversas. Por otro lado, Cabrera & López, (2006) menciona que las células al tener contacto con la radiación UV, estas inducen a la constitución de fotoproductos como son dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs), y 6-4 pirimidina pirimidona (6-4 PPs) denominándose “Hot spot” o puntos calientes de mutación presentando un daño oxidativo llamado “thymine glicol” o timina glicol.

Sin embargo, el efecto de estos agentes genotóxicos se puede ver reparado por el sistema de escisión de nucleótidos (NER) los cuales remedian lesiones que dan lugar a mutaciones en el material genético (Cabrera & López, 2006).

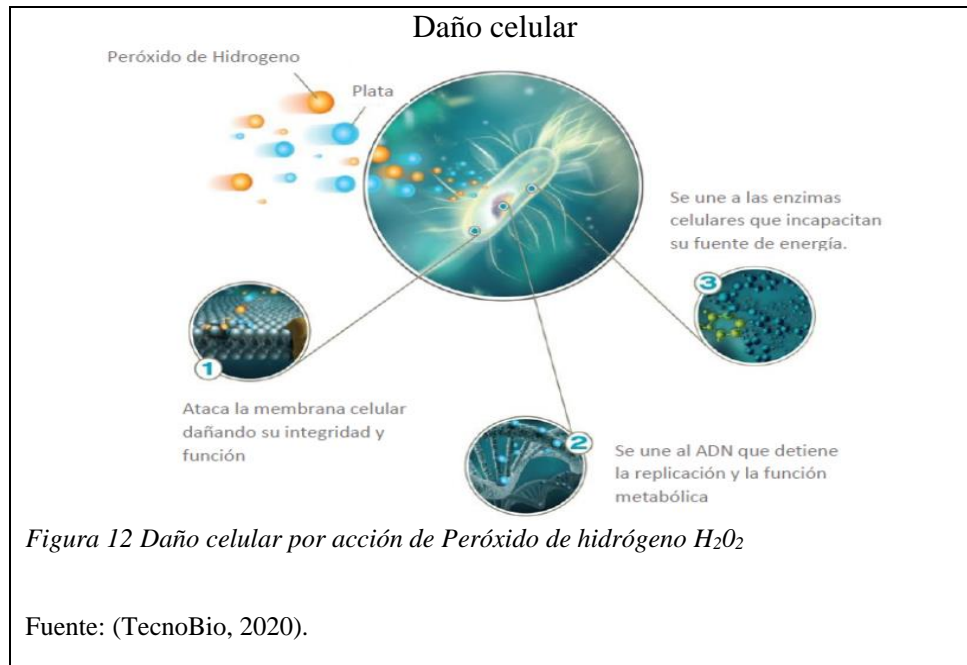
Hopking, (2016) menciona que si el tiempo de exposición es corto es poco probable que produzca un daño en el ADN, sin embargo, cuando se expone por tiempo prolongado, los rayos excitan el ADN haciendo que los anillos de las pares de bases se fusionen causando un error de copia que cambia la forma de codificar una proteína generando una proteína anormal provocando una enfermedad en una región donde se codifica una enzima de reparación o supresora de tumor (Figura 11).

2.6.2 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es un mutágeno oxidante con característica de ser inestable y su manipulación se debe realizar con precaución porque es carcinogénico (NJHealth, 2017). Sin embargo, no se lo considera un radical libre, pero bajo determinadas condiciones puede generar radicales libres de hidroxilo, es decir, presentar en su estructura un electrón libre haciendo que tenga la característica de toxicidad teniendo

la capacidad de unirse o reaccionar con moléculas a fin de generar un daño celular o tisular (González et al., 2000).

El efecto que tiene el peróxido de hidrógeno sobre los linfocitos humanos es que al ser un fuerte agente oxidante produce alteraciones por medio de rupturas en la cadena de ADN haciendo que se dé una formación del radical OH causando una oxidación endógena en las células (Vergara, 2010). Ver Figura 12.



Las especies reactivas de oxígeno resultan de la reducción de oxígeno permitiendo así reaccionar con el material genético actuando las bases con el radical OH⁻, a dicha interacción se la conoce como puntos calientes. Al reaccionar dichos elementos causan una fractura en la cadena y a consecuencia una variedad de reacciones derivadas, posteriormente al introducir las células en tratamiento alcalino se seguirán dando rupturas en el ADN denominándose “sitios sensibles de álcali” (González et al., 2000).

2.6.3 Bromato de potasio (KBrO₃)

El Bromato de potasio, un agente oxidante que se debe manipular con mucha precaución debido a que puede irritar ojos, nariz y piel (DoAS, 2016).

En base a la investigación por parte de Yalçın & Çavuşoğlu, (2022) indican que el Bromato de potasio ocasiona citotoxicidad, genotoxicidad, mutagenicidad y toxicidad bioquímica teniendo como síntomas vómito, diarrea, malestar abdominal, sin embargo, puede tener efectos más graves como son sordera, vértigo e hipotensión. Adicionalmente, se encuentra clasificado como un posible cancerígeno por varios entes internacionales.

Estudios realizados por Sánchez, (2011) indican que el bromato de potasio es un agente activo sobre el organismo y que al ser ingerido puede conducir a la aparición de tumores y mutaciones de células. Además, indica que su genotoxicidad se debe a la producción de radicales de oxígeno en la célula.

Sin embargo, Salim et al., (2004) indican que posee efectos tóxicos haciendo que sea prohibido en el sector alimenticio como materia prima para la producción de pan en el proceso de cocción, pero al estar en contacto con el tracto gastrointestinal se reduce a bromuro siendo un compuesto con menor toxicidad y se puede eliminar por medio de excreción renal.

El bromato de potasio no es un radical libre, pero produce especies reactivas de oxígeno bajo determinadas condiciones y procesos químicos como agentes reductores, los cuales pueden llegar a formar radicales hidroxilos (OH) y radicales bromatos (BrO_3) dichos radicales están asociados a la genotoxicidad y la citotoxicidad (Kawanishi & Murata, 2006).

El mecanismo de acción del bromato de potasio en las células se basa en la formación de la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-Dg) el cual es un marcador de daño oxidativo al ADN (Carvallo, 2015).

3 Materiales y métodos

3.1 Obtención de muestras por venopunción:

Las muestras se obtienen de sangre periférica proveniente de voluntarios saludables cuyo consentimiento ha sido previamente otorgado para la participación de este estudio. La venopunción es realizada por personal calificado. A continuación, se detalla el procedimiento estándar utilizado.

Se utiliza un tubo al vacío tipo Vacutainer con una capacidad de 7ml, el cual contiene ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como aditivo, el cual cumple la función de anticoagulante ya que quela al calcio presente en la sangre impidiendo de esta manera la activación de la trombina y consecuentemente la muestra permanece sin coagulación. Adicionalmente, el EDTA preserva la morfología celular y ayuda en la conservación de la misma. (Deltalab, 2022; Martí et al., 2015)

La venopunción se realiza mediante procedimiento estándar, el cual se detalla a continuación: Se coloca un torniquete 4 dedos sobre la zona que se realizará la punción; se identifica la vena por medio de tacto. Es recomendable realizar la punción en la fosa ante cubital debido a que ahí se encuentran venas superficiales fáciles de encontrar y de fácil acceso.

A continuación, el brazo se coloca en posición descendiente. Se toma una aguja de calibre 21G adecuada para uso con el sistema Vacutainer, y con el bisel hacia arriba, se forma un ángulo de 30° entre la aguja y antebrazo, y simultáneamente con ayuda del pulgar se estira la piel y se procede a realizar la punción (Fleury, 2019). Una vez introducida la aguja se coloca en la capsula porta agujas del sistema tipo Vacutainer, el tubo con EDTA previamente sanitizado con solución antiséptica y se observa el flujo de sangre hacia el tubo. Finalmente se retira el tubo y la aguja, se desecha la aguja en un envase apropiado para objetos cortopunzantes según las normativas de bioseguridad. Dicho proceso debe durar como tiempo máximo 1 minuto y se recomienda llenar 3/4 partes del tubo (Fleury, 2019).

3.2 Separación y aislamiento de células mononucleares por gradiente de Ficoll

La obtención de células mononucleares mediante gradiente de densidad de Ficoll puede realizarse mediante algunas variantes, sin embargo, todas las variantes utilizan los mismos pasos, no obstante, con ligeras variaciones en las cantidades de muestra, medio y Ficoll como se puede observar en la Tabla 1.

En este estudio se utilizó una micro técnica la cual se basa en los protocolos de Cytiva, (2020); Tice & Vasquez, (1998) quienes estandarizaron el empleo de los siguientes volúmenes: 300 uL de Ficoll, 200 uL de sangre total con 100 uL de DMEM (Roswell Park Memorial Institute), formando así una división entre la sangre y el Ficoll denominado interfase. Se evita la unión de las fases y posteriormente se lleva a centrifugación en un tiempo de 5 minutos a 2089 rpm en la centrifuga utilizada en este estudio (Thermo Fisher Scientific, 2022). A partir de dichos volúmenes se establecieron 4 variantes de la micro técnica, y se empleó una variación en tiempo de 10 minutos y 1637 rpm con el fin de definir cual permite obtener una mayor recuperación de linfocitos.

Posterior a la centrifugación se observa varias capas; la capa superior contiene plasma y plaquetas, seguido por una capa blanquecina y turbia en forma de anillo que corresponde a las células mononucleares (linfocitos), posteriormente una capa de Ficoll y finalmente en el fondo, se encuentran granulocitos y eritrocitos. A continuación, se extrae el anillo de células mononucleares utilizando una pipeta Pasteur. Se realizan movimientos circulares paralelos a fin de obtener mayor cantidad de los mismos (Cytiva, 2020; Tice & Vasquez, 1998).

Seguido de esto, se centrifuga nuevamente por 10 minutos a 1768 rpm con el fin de sedimentar los linfocitos; finalmente se desecha el sobrenadante y se agrega 150 uL de PBS con el propósito de realizar un lavado que elimine toda traza de Ficoll que puedan interferir en los pasos subsiguientes del ensayo (Cytiva, 2020). Se centrifuga nuevamente por 10 minutos a 1890 rpm, se retira el sobrenadante y se reposa hasta su posterior procedimiento en el cual se mezclará con 75 uL de agarosa de bajo punto de fusión (*LMPA* siglas en inglés) para ser colocados en las placas (Cytiva, 2020; Tice & Vasquez, 1998).

Antes de proceder a la técnica del ensayo cometa, se realizan varios ensayos con el propósito de estandarizar la técnica de micro extracción, el objetivo es lograr obtener la mayor cantidad de linfocitos y para tal se evalúan varios parámetros tales como volumen de Ficoll, cantidad de muestra de sangre y medio de dilución (DMEM). En la Tabla 1 se resumen los parámetros utilizados, los cuales se realiza cada método por triplicado. El medio de cultivo cumple la función de mantener la integridad y viabilidad celular.

Tabla 1 Metodología para extracción de linfocitos

	Método 1 uL	Método 2 uL	Método 3 uL	Método 4 uL	Método 5 uL
Sangre	400	200	400	400	400
Medio	-	100	-	200	-
Ficoll	400	300	500	600	600

Elaborado por: (Los autores, 2023).

En este estudio se utilizó como medio DMEM, pero se evaluó también con PBS con el fin de determinar cual permite una mejor separación de linfocitos; no obstante, existen otros que utilizan el MEM (Dusinska & Collins, 2008). El Ficoll se utiliza con el fin de ser un agente separador de densidad, es decir, facilitar la separación de células mononucleares de otras células como eritrocitos, plaquetas, entre otras (Seeligmüller, 1968).

3.3 Evaluación de la extracción de células mononucleares

3.3.1 Recuento de células mediante cámara de Neubauer

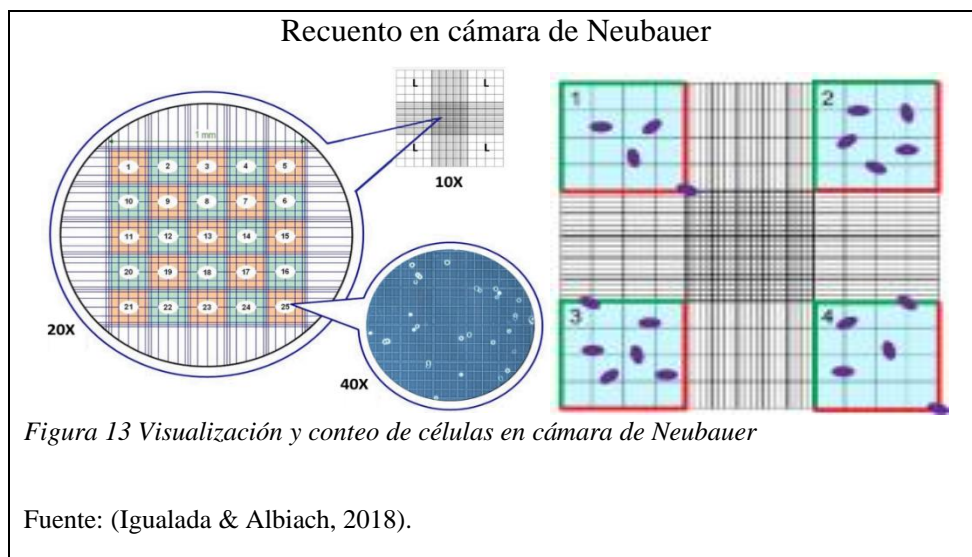
La cámara de Neubauer o hemocitómetros permiten evaluar el rendimiento del aislamiento de linfocitos mediante la enumeración de células por mililitro tomando en cuenta el volumen total de la suspensión celular (Rueda, 2016).

La cámara consta de subdivisiones de 9 cuadrantes. Cada cuadrante a su vez posee cuadrantes internos (Igalada & Albiach, 2018). Ver Figura 13.

En la metodología presentada por Igalada & Albiach, (2018) para el recuento de células se debe preparar una dilución de las células con azul de tripán con el fin de poder observar las células. A continuación, se limpia la cámara y el cubre de cristal y se coloca el cubre sobre los cuadrantes o

cuadrícula añadiendo 20 uL de la muestra diluida en el borde del cubre para que por capilaridad se extienda por la cámara. Este proceso se realiza a los dos extremos del cubre, posteriormente se deja reposar la suspensión durante 4 minutos y se procede a observar bajo microscopio utilizando un lente de 20x.

Para su conteo se toma en cuenta los 4 cuadrantes externos debido a que las células estudiadas son de gran tamaño y permite tener una mejor y mayor visibilidad, sin embargo, en el conteo no se deben incluir las células que están en las líneas inferiores o derecha de los cuadrantes externos debido a que los bordes o cuadrantes externos están en contacto con el borde de la cámara y otros cuadrantes, permitiendo de esta manera tener una menor variabilidad y evitar sesgos o errores en cuanto a la precisión del conteo, realizando 2 repeticiones en el conteo de células (Igalada & Albiach, 2018; Santos et al., 2022; Zhang et al., 2020).



Agregado a lo anteriormente dicho, una vez culminado el conteo se realiza un cálculo de la densidad el cual está basado en la Ecuación 1:

Ecuación 1 Cálculo de densidad celular

$$Densidad = \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{superficie de conteo (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad (mm)} * \text{Dilución}}$$

Igualada & Albiach, (2018) menciona que la profundidad de la cámara es de 0,1 mm, la superficie de recuento es de 4 mm², es decir, los 4 cuadrantes de 1mm cada uno, y la dilución recomendada es 1:50.

3.3.2 Viabilidad celular

El azul de tripano utilizado en el diluyente para el contaje, además de proporcionar un medio de contraste para la fácil visualización de los linfocitos también permite evaluar la viabilidad de las células ya que adicionalmente es un colorante de exclusión, es decir, cuando la membrana celular se encuentra intacta (célula viva) el colorante no puede penetrar dotando a la célula un aspecto transparente o claro con respecto al fondo y cuando la membrana se encuentra permeable (célula muerta) el colorante penetra al citoplasma y dota a la célula de un aspecto azulado (Paschoal & Zara, 2018; Ramirez et al., 2020).

Para el empleo de azul de tripano se diluye en 100 mL de agua destilada 1 g de azul de tripano para realizar el conteo (Paschoal & Zara, 2018). En el mismo, se debe tomar en cuenta solo aquellas células vivas, pero se puede determinar el porcentaje de células vivas y muertas con ayuda del colorante, el cual se busca que para la realización del ensayo cometa la viabilidad celular deberá sobrepasar el 95% de células vivas para evitar la presencia de ruido durante el ensayo (Posada, 2005).

3.4 Ensayo cometa

3.4.1 Preparación de portaobjetos con micro geles de agarosa

Para la elaboración de las placas portaobjeto se utilizan dos 2 tipos de agarosa, siendo:

1. Agarosa de punto de fusión normal (NMA):

Es la agarosa que irá de base en las placas con el fin de actuar como un adherente para las posteriores capas donde se emplea el segundo agar de bajo punto de fusión acompañado de las células. Los autores Shukla, (2018) y Tice & Vásquez, (1998) realizan su preparación en tubos Falcon, la concentración de agarosa es al 1%, es decir, se necesita 0,5 g el mismo que se mezcla con agua destilada hasta llegar a un aforo de 50 mL. Enseguida se calienta hasta

que la agarosa se disuelva por completo y se mantiene en una temperatura de 60 °C en un termobloque durante 35 minutos.

2. Agarosa de bajo punto de fusión (LMPA):

Es la agarosa que se mezcla con la muestra de linfocitos y servirá como segunda capa para la muestra. Su punto de fusión es por debajo de los 37 °C razón por la cual es apta para embeber los linfocitos sin la producción de efectos nocivos debidos a la temperatura, su preparación se realiza en tubos Falcon, la concentración de agarosa puede ser variable.

No obstante, Shukla, (2018) y Tice & Vázquez, (1998) emplean agarosa de bajo punto de fusión en concentraciones de 0,5% - 1%. De tal forma, para la concentración de 0,5% se necesita 0,25 g de agarosa que se aforan a 50 mL con solución PBS, la misma que se calienta hasta que la agarosa se disuelva por completo y se mantiene a 37 °C en el termobloque hasta su utilización con el fin de evitar su gelificación.

3.4.2 Preparación de la muestra

3.4.2.1 Preparación de placas portaobjetos

Para la preparación de placas que son la base de las muestras se necesitan los siguientes materiales: portaobjetos esmerilados, mechero, agarosa de punto de fusión normal (NMA), plancha fría y caliente, papel absorbente, metanol e isopropanol

El procedimiento para su elaboración consiste en colocar los portaobjetos en isopropanol y pasarlos por llama azul con el fin de consumir todo el isopropanol y enfriar, luego se coloca los portaobjetos en metanol y se vuelve a pasarlos por llama azul igualmente, con la finalidad de consumir todo el metanol. Posteriormente, se los coloca en una plancha a 50 °C durante 2 minutos y se introduce la placa en NMA al 1% verticalmente hasta el extremo de la parte esmerilada, se retira el exceso con papel absorbente del revés del portaobjetos y colocamos la placa en la plancha. Una vez transcurrido 3 minutos se deja secar al ambiente.

El uso de isopropanol y metanol permite que se adhiera de mejor manera el agar además de retirar cualquier impureza o suciedad que pueda estar presente en el portaobjetos. Una vez secos los

portaobjetos se pueden almacenar en temperatura ambiente para su posterior uso (Shukla, 2018; Tice & Vasquez, 1998).

3.4.2.2 *Preparación de linfocitos*

En los tubos con linfocitos previamente aislados, se coloca 75 uL de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) líquida a 37 °C y se lleva a vortex suave con el fin de homogenizar la agarosa y las células. Enseguida se coloca 3 gotas en la placa y se tapa con cubreobjetos y se lo lleva a la plancha fría hasta que se solidifique la agarosa (Tice & Vasquez, 1998).

El autor, Shukla, (2018) indica en su protocolo la implementación de una capa adicional de agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) al 0,5% permite obtener una mayor protección e integridad de las células permitiendo dicha capa un análisis de precisión de los cometas.

3.4.3 Inducción de células a agentes mutagénicos

En el ensayo se emplea el estudio de 3 agentes como son Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), Luz ultravioleta (UV) y Bromato de potasio (KBrO₃) con la finalidad de evaluar el daño oxidativo que ocasionan los mencionados agentes a las células, realizando por cada agente placas por duplicado, es decir, en cada control se evalúa aproximadamente 200 células inducidas a daño.

Para H₂O₂ previamente se diluyó 200 mM en PBS, el cual una vez secada la tercera capa de agarosa a bajo punto de fusión, se retira el cubreobjetos y se aplica 50 uL sobre las células y se cubre nuevamente y se deja actuar durante 5 minutos a 4 °C (BioLabs, 2023).

Para el caso de Luz UV posterior a la tercera capa de agarosa a bajo punto de fusión se lleva las placas a estudiar a una cámara de flujo laminar durante 6 y 13 minutos, con el fin de evaluar los cambios ocurridos a diversos tiempos. Cabe resaltar que la cámara de flujo laminar posee rayos ultravioletas tipo C debido a que cumple la función de germicida en el proceso de desinfección de material.

El KBrO₃ previamente se diluyó 0,5 mM en PBS, el cual una vez secada la tercera capa de agarosa a bajo punto de fusión, se retira el cubreobjetos y se aplica 50 uL sobre las células y se cubre nuevamente y se deja actuar durante 10 minutos a 37 °C (Møller et al., 2020).

3.4.4 Lisis de linfocitos

Una vez que se ha añadido la tercera capa de agarosa a bajo punto de fusión y se ha secado la misma, se procede al lisado celular, el mismo que tiene como objetivo romper la membrana celular y nuclear se utiliza el buffer de lisis de tal manera que durante la electroforesis el ADN fragmentario pueda liberarse de las estructuras celulares en caso de que este se encuentre presente. Este buffer está compuesto de 2,5 M cloruro de sodio (NaCl), 0.1 M EDTA y 10 mM de tris base.

El procedimiento consiste en pesar todos los reactivos y aforar a 1 L con agua destilada, enseguida, se realizan agitaciones constantes a fin homogenizar el buffer. Posteriormente se ajusta el pH a 10 con hidróxido de sodio (NaOH) y se deja en refrigeración a 4 °C hasta su posterior uso en el ensayo (Shukla, 2018; Venegas, 2009).

Previo a la utilización se coloca en el buffer 10 % de DMSO y 1 % de Tritón x-100, posterior a eso se sumerge las placas en el buffer sin cubreobjetos y se deja durante un lapso de 1 hora (Shukla, 2018; Venegas, 2009).

3.4.5 Tratamiento enzimático

Según Zheng et al., (2023) indican que se prepara 300 mL de buffer enzimático que contiene 40 mM de tampón HEPES, 0,1 M de cloruro de potasio (KCl), 0,5 mM de EDTA, 0,2 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA), se lo homogeniza y se ajusta el pH usando un potenciómetro hasta llegar a pH 8.0 mediante la adición de hidróxido de potasio (KOH) y se lo almacena a 4 °C hasta su posterior uso.

Los stocks de enzimas tanto de ENDO III como FPG se almacena a -20 °C con el fin de no perder su capacidad enzimática. El stock de ENDO III posee una concentración de 8 000 unidades/mL, mientras que, el stock de FPG tiene una concentración de 10 000 unidades/ mL (BioLabs, 2023). Para la preparación de las concentraciones de enzimas ENDO y FPG se usa 1 mL del buffer enzimático respectivamente para ser mezclado con la solución stock de enzimas, el cual se empleó del stock 1×10^3 tanto para ENDO como para FPG (Kushwaha et al., 2011) .

Una vez culminado el tiempo de lisado de células, se retira las placas portaobjetos del buffer de lisis, y se realizan 2 lavados con buffer de enzimas en lapsos de 3 minutos con el objetivo de retirar detergentes y sales residuales con el fin de que no influyan en el tratamiento con las enzimas o en los pasos posteriores del ensayo. Luego se las deja escurrir 3 minutos y se coloca la dilución enzimática 1×10^3 realizada previamente de ENDO III y FPG, se coloca la dilución por placa, es decir, una placa para cada enzima y por duplicado. Se coloca el cubreobjetos y se lleva a incubación a 37 °C sobre una placa semi húmeda la cual previene que se sequen las placas y tenga actividad enzimática adecuada, dicho proceso se lleva a cabo durante 45 minutos para ENDO III y 30 minutos para FPG (Tice & Vázquez, 1998).

Cabe resaltar que se analizará linfocitos con y sin diluciones enzimáticas con el fin de determinar si dicha solución influye en la formación de cometas (Kushwaha et al., 2011; Tice & Vasquez, 1998).

3.4.6 Tratamiento alcalino

3.4.6.1 Preparación buffer alcalino o de electroforesis

El buffer alcalino está compuesto de 1 mM de EDTA, 300 mM de hidróxido de sodio (NaOH), los cuales son aforados a un 1 L con agua destilada y la debida agitación para homogenizar el buffer. Se ajusta el pH para que este se encuentre a $\text{pH} > 13$ y se almacena en refrigeración a 4 °C para su uso posterior (Shukla, 2018).

Una vez concluida la incubación de las placas con las enzimas, se retiran los cubreobjetos y se las coloca a temperatura ambiente con el fin de evitar un choque de temperaturas al ingresar las placas dentro del buffer de alcalinización en el paso subsiguiente. Transcurrido 5 minutos, se sumerge las placas en el buffer alcalino a una temperatura de 4 °C durante 25 minutos (Tice & Vázquez, 1998).

3.4.7 Electroforesis SCGE

Para Tice & Vázquez, (1998) los parámetros para correr la electroforesis se estandarizan a un voltaje de 25V (0,7 V/cm) siendo este constante y a un amperaje de 300 mA durante 24 minutos. Adicionalmente, es crítico mantener la temperatura del buffer lo más constante y cercano a 4 °C, ya

que la velocidad de migración del ADN y por lo tanto el tamaño de la cola de un cometa está en función de la temperatura del buffer durante la corrida. Por otro lado, de ser necesario para una mejor visualización y migración puede ajustarse a un mayor periodo de tiempo, el cual puede llegar hasta los 30-40 minutos.

3.4.8 Neutralización y fijación

3.4.8.1 Preparación buffer de neutralización

Para Shukla, (2018); Tice & Vázquez, (1998) el buffer de neutralización está compuesto de tris base 0,4 M ajustado a pH 7,5 con una solución de HCL 1M y se lo almacena a temperatura ambiente.

Las placas una vez culminado el tiempo en buffer de lisis, son lavadas 3 veces con tris al 0,4 M durante lapsos de 3 minutos con el fin de retirar el exceso alcalino. En seguida se colocan en el buffer de neutralización durante 4 periodos siendo que en primera instancia se introduce 5 minutos se retira quedando al ambiente 5 minutos y se deja 5 minutos nuevamente dentro del buffer y 5 minutos fuera del mismo para un total de 20 minutos en esta fase del procesamiento de las muestras. (Shukla, 2018)

3.4.9 Tinción de ADN

Para teñir las placas se puede emplear diversos fluorocromos como son el 4,6-diamidino-2-2fenilindol (DAPI) o el bromuro de etidio (EB). No obstante, se optó por emplear DAPI por su mejor visualización. La solución de tinción con DAPI se prepara a una concentración de 1 ug/ml y se la conserva en refrigeración a 4 °C. Adicionalmente, se cubre el vial con papel aluminio debido a que el DAPI es sensible a la luz y de esta manera se evita su degradación y se conserva la capacidad que posee de unirse al ADN (Rédei, 2008). A continuación, se deja reposar las placas protegidas de la luz durante 5 minutos para poder visualizar bajo microscopia de fluorescencia (Martínez, 2017).

3.4.10 Lectura del ensayo cometa

Para la visualización de los daños en el ADN se visualiza con los objetivos de 20X y 40X, empleando microscopio de fluorescencia dotado de filtros adecuados tanto para la excitación como para la emisión según el fluorocromo utilizado. En el caso de este estudio DAPI, Shukla, (2018) indica que

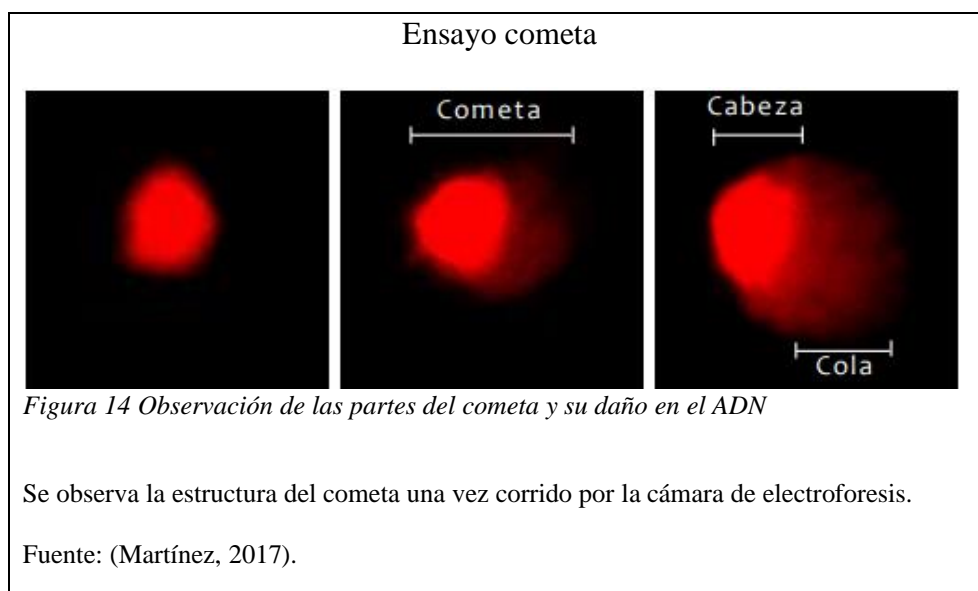
debe utilizar filtros con una excitación de 515-560 nm, y con un filtro de emisión que tenga una longitud de onda de 590 nm. Adicionalmente, el microscopio posee una cámara que permite visualizar y captar la imagen en una computadora a fin de obtener imágenes que permitan su posterior análisis como se observa en la Figura 14 para el cual se aplica la Ecuación 2. Además, como parte del análisis de las imágenes se evalúan los siguientes parámetros:

Ecuación 2 Cálculo de momento de cola (MCO)

$$MCO = \frac{\text{longitud de la cola} * \% \text{ ADN en la cola}}{100}$$

Donde:

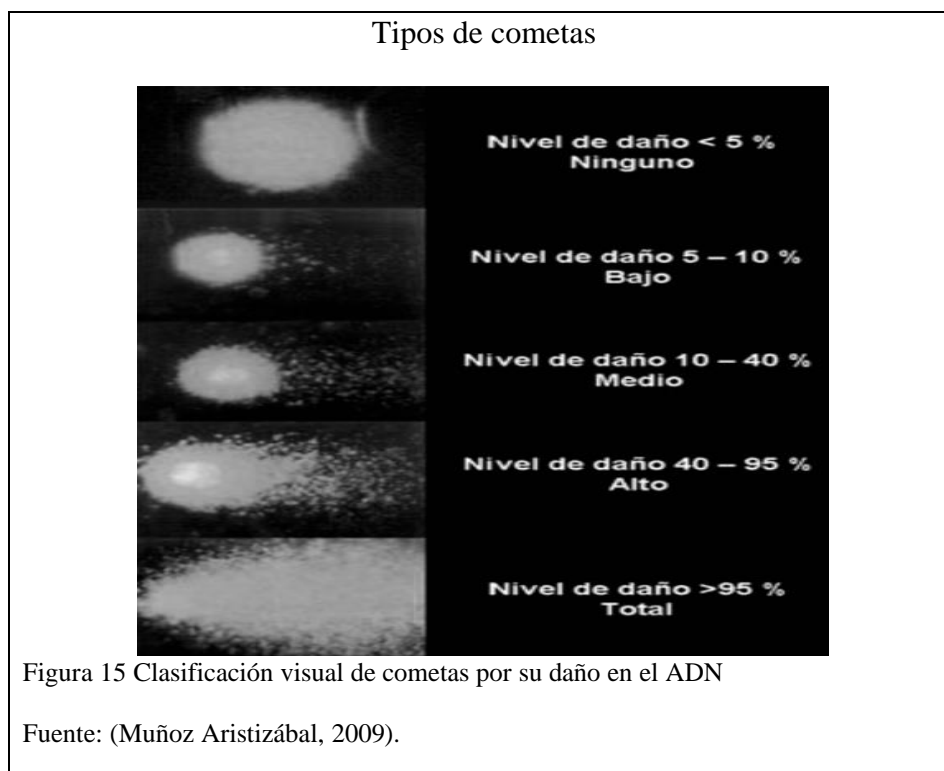
- **Momento de cola (MCO):** Se conoce como el producto de la longitud de la cola y el % de ADN presente en la misma.
- **Longitud de la cola:** se conoce como la longitud de la migración del ADN desde el núcleo de la célula, permite ver el grado de daño.
- **Porcentaje de ADN cola:** se conoce como el fragmento de ADN en la cola



3.4.11 Análisis de daño

El autor, Martínez, (2017) menciona que se puede realizar de manera cualitativa y/o cuantitativa, siendo:

- **Cualitativo:** consiste en realizar el recuento de células analizando según el grado de daño en la escala de 1 a 5 como lo indica la Figura 15.



- **Cuantitativo:** consiste en tomar alrededor de 30 a 50 cometas por tratamiento y se evalúa cada cometa por medio de la fórmula de momento de cola (MCO) y se realiza una desviación estándar de cada tratamiento.

Para el recuento, se deben excluir del mismo los cometas que se encuentren en el borde del gel o los que están sobrepuestos debido a que no se da su migración correctamente y por lo tanto no se puede identificar la longitud de la cola correspondiente a cada cometa. Adicionalmente, se deberá excluir aquellas células que presenten alteraciones morfológicas por ejemplo células muy grandes o polimorfas, o que estén teñidas inadecuadamente ya sea por falta de tinción o por exceso del mismo. (Rueda Torres, 2017).

Para facilitar el análisis e interpretación de los cometas se utiliza programas de software específicos para el ensayo cometa. Tal es el caso del software llamado OpenComet, el cual permite evaluar mediante medición automática el tamaño de la cabeza y de la longitud de la cola. Los datos son

almacenados de forma automática en una base de datos la misma que contine los diversos parámetros críticos para el análisis de cada cometa. Por otra parte, el programa Infostat permite comparar el daño de ADN entre tratamientos por medio del estudio de gráficas que permitan un mejor análisis de las mismas (Vergara, 2010).

El programa de software OpenComet facilita el análisis automático de fotografías de ensayos cometa, el cual proporciona técnicas fiables para localizar cometas y cabezas de cometas; se puede analizar un lote de fotos del ensayo, ubicarlos y delimitar de forma sencilla las estructuras principales de un cometa tales como: la cabeza y longitud de la cola (Gyori et al., 2014).

Además, según Gyori et al., (2014) OpenComet realiza un análisis automatizado de imágenes que es más rápido y menos propenso a sesgo humano, en el cual analiza el porcentaje de ADN en la cabeza y cola del cometa, área de la cabeza y cola, longitud de la cola, momento de cola, intensidad en sus estructuras, entre otros parámetros.

Por otro lado, permite realizar mediciones y cambios de cometas en tiempo real utilizando un editor interno del programa, así como el examen manual de los datos de análisis (opcional) (Gyori et al., 2014).

Sin embargo, de manera manual se realiza una comprobación con los datos obtenidos por el software por medio un análisis estadístico denomina t-student, el cual permite evaluar las diferencias significativas entre las medias de los dos grupos de enzimas de reparación frente a los diversos agentes oxidativos empleados, donde se observa el valor de p, debido a que si dicho valor es menor que el nivel de significancia se concluye que existe una diferencia significativa entre las mediciones estudiadas, es decir, si el valor de p es menor a 0,05 si existe una diferencia significativa (Olea, 2016).

Cometa y sus regiones

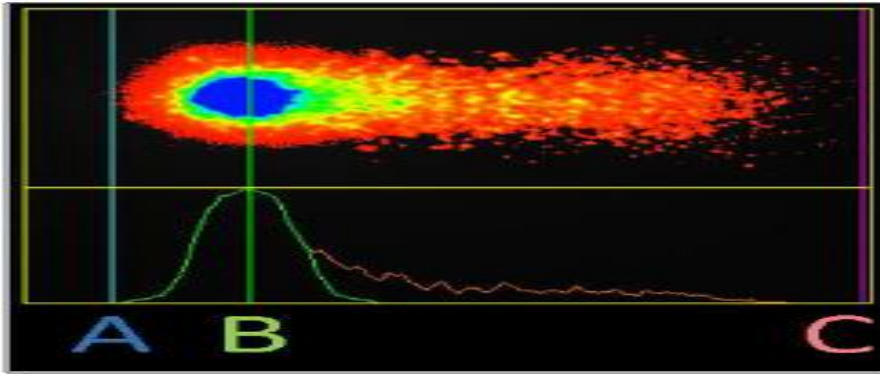


Figura 16 Visualización de las partes del cometa por medio del software Comet Assay IV

Línea A inicio de la cabeza, línea B es el centro de gravedad de la cabeza y línea C es la cola del cometa.

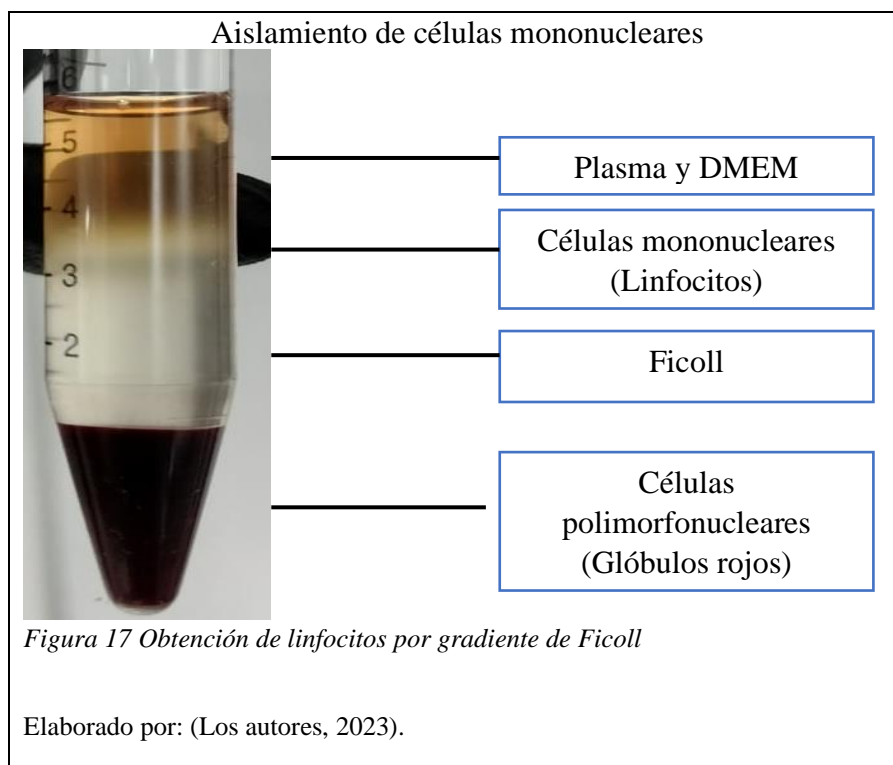
Fuente: (Rueda Torres, 2017).

En la Figura 16 se observa las coloraciones del cometa, el cual la línea A o azul representa el comienzo de la cabeza, la línea B o verde marca el centro de gravedad del núcleo o cabeza y la línea C o magenta hace representación a la cola hasta su final por el cual se puede medir la distancia de la cola, la intensidad de la cola y el momento de la cola respectivamente (Rueda Torres, 2017).

4 Resultados y discusión

4.1 Separación y aislamiento de células mononucleares por micro técnica de gradiente de Ficoll

La Figura 17, muestra la interfaz blanquecina en la cual se encuentran las células mononucleares de interés, en este caso, linfocitos. Los componentes celulares de la sangre entera se diferencian y logran separarse según su densidad tras centrifugación, las células mononucleares (en su mayoría linfocitos) no son suficientemente densas como para atravesar la interfaz del gradiente de densidad del Ficoll. En la parte baja o sedimentada se encuentran los glóbulos rojos y granulocitos, seguido del Ficoll por encima, y por la parte superior los linfocitos (y algunos monocitos), y finalmente, el plasma diluido con el medio y plaquetas.



Cabe resaltar que los linfocitos se encuentran en la interfaz encima del Ficoll formando un anillo definido de aspecto turbio blanquecino. Dependiendo de la cantidad de sangre y el tiempo de centrifugación se obtiene un anillo más definido, y generalmente posee un ancho de 1-2 mm.

El método de separación por densidad mediante gradiente de Ficoll para el aislamiento de células mononucleares, según, Cortina Rosales et al., (2008) permite tener una mayor recuperación,

concentración y pureza de los mismos ya que elimina la mayoría de los otros elementos formados de la sangre con la excepción de monocitos, un mínimo de plaquetas y hematíes.

En otras palabras, entre mayor sea la cantidad empleada de Ficoll, mayor será el espacio disponible durante la centrifugación para la separación y, por ende, será más definido el anillo de células mononucleares en el tubo Eppendorf (Rojas, 2018). Sin embargo, para el aislamiento de células mononucleares se evaluó diversas cantidades de medio, Ficoll y sangre con el fin de conocer en qué combinación se podrá obtener un mayor rendimiento dadas las condiciones y realidades de nuestro laboratorio.

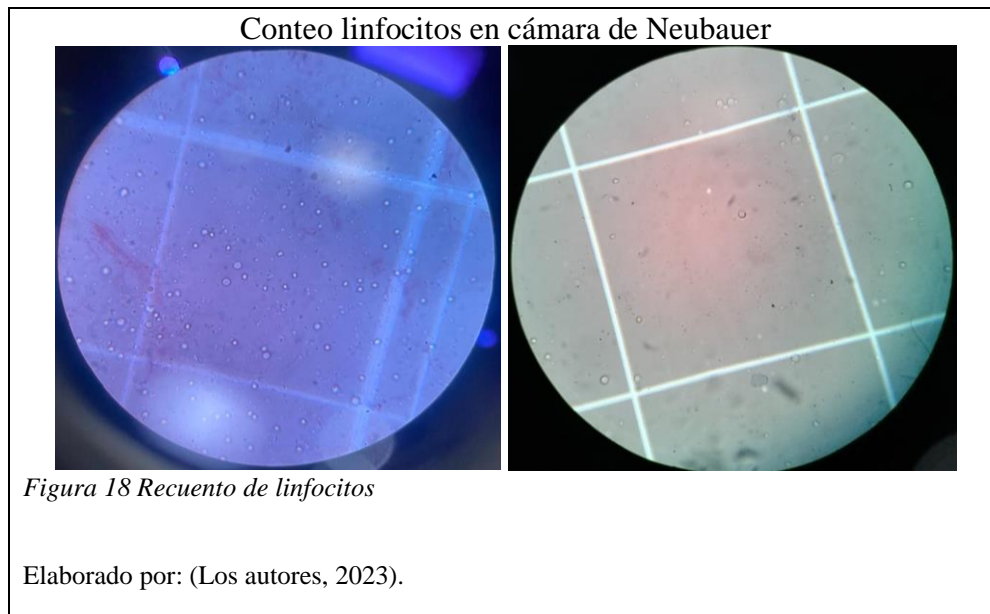
Según el estudio realizado, se determinó que el incremento de Ficoll en la separación, permitió obtener una mejor recuperación de células en un volumen pequeño, pero trae consigo sus desventajas, siendo una de ellas la visualización del anillo, al ser gran cantidad de medio en gradiente de densidad no se define con precisión el anillo de linfocitos que se busca haciendo que se torne turbio y dificultoso en su extracción (Rojas, 2018).

Además, el tiempo y revoluciones por minuto (RPM) son factores importantes para la migración de las células presentes en la muestra y al aumentar el tiempo como lo propuesto por Cytiva, (2020); Venegas, (2009) permitió que, por la densidad de la solución, exista una migración más completa y eficiente hacia la base del tubo por parte de los hematíes y granulocitos. De la misma manera en la capa superior se retiene de forma más eficiente las plaquetas. Para lograr esta optimización se aumentó el tiempo de 5 a 10 minutos y se redujo las revoluciones de 2089 a 1637 rpm obteniendo así una separación uniforme en el tubo como se observa en la Figura 17.

Otro punto clave para la efectividad en la separación es el desarrollar una buena técnica manual en el proceso de vertido o sobre colocación de la muestra diluida con medio sobre el Ficoll como se mencionó anteriormente, se diluye la sangre con el medio, el mismo que posteriormente, se coloca con precaución y de manera lenta sobre la capa de Ficoll con el objetivo de no romper la tensión superficial que existe entre el Ficoll y el medio con sangre. La buena técnica conduce a un aislamiento exitoso (Ibarra, 2018; Rojas, 2018).

Por otro lado, el uso de medio DMEM, en comparación a PBS, no causó una diferencia significativa en el aislamiento, sin embargo, se lo emplea debido a que es un medio destinado al cultivo celular, por lo que contiene tanto las sales como nutrientes apropiados de tal manera que brinda un entorno adecuado para la conservación de la viabilidad celular durante el proceso de aislamiento (Beltrán & González, 2016).

4.2 Recuento de células mediante cámara de Neubauer



La Figura 18, presenta células mononucleares teñidas con azul de tripano vistas con objetivo 40x, ubicadas en el cuadrante superior izquierdo de la cámara de Neubauer. Se utilizó azul de tripano para cerciorar la viabilidad de los linfocitos. Se enumeró las células en los cuadrantes de las esquinas para su respectivo conteo celular, teniendo en cuenta que estén dentro de las líneas del cuadrante.

En el proceso de aislamiento, al someter las células a centrifugación existe una cantidad de células que mueren o se rompen por las fuerzas ejercidas y estrés físico del proceso, por esa razón se empleó azul de tripano con el propósito de determinar el porcentaje de células viables dentro de la muestra al concluir el proceso de separación y aislamiento (García de Insausti, 2012).

En la visualización de las células se obtiene una gran cantidad de las mismas, pero además de linfocitos, se observan algunos eritrocitos, plaquetas y granulocitos en pequeñas cantidades, los cuales no son de interés para la realización del ensayo cometa. Razón por lo cual se optó por realizar lavados

con PBS y centrifugación a 1890 rpm; posterior a la obtención del pellet a fin de eliminar y limpiar la muestra para su siguiente paso (Estrada & Venegas, 2007).

Una vez culminado el conteo de los cuadrantes, se procedió a empelar la Ecuación 1. para obtener el estimado de la densidad celular por mililitro de volumen total de suspensión celular.

$$Densidad = \frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{superficie de conteo (mm}^2\text{)} * \text{Profundidad (mm)} * \text{Dilución}}$$

$$Densidad = \frac{19}{4\text{mm}^2 * 0,1 \text{ mm} * 0,2}$$

$$Densidad = 237,5 \text{ células/mm}^3$$

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = 237,5 \frac{\text{células}}{\text{mm}^3} * 10\ 000$$

$$\frac{\text{cel}}{\text{mL}} = 2,3 * 10^6 \text{ células/mL}$$

Tabla 2 Conteo de células mediante cámara de Neubauer (células x 10⁶)

	Método 1	Método 2	Método 3	Método 4	Método 5
Repetición 1	2,1	2,3	3,0	1,7	1,9
Repetición 2	2,2	2,4	2,6	1,6	2,1

Elaborado por: (Los autores, 2023).

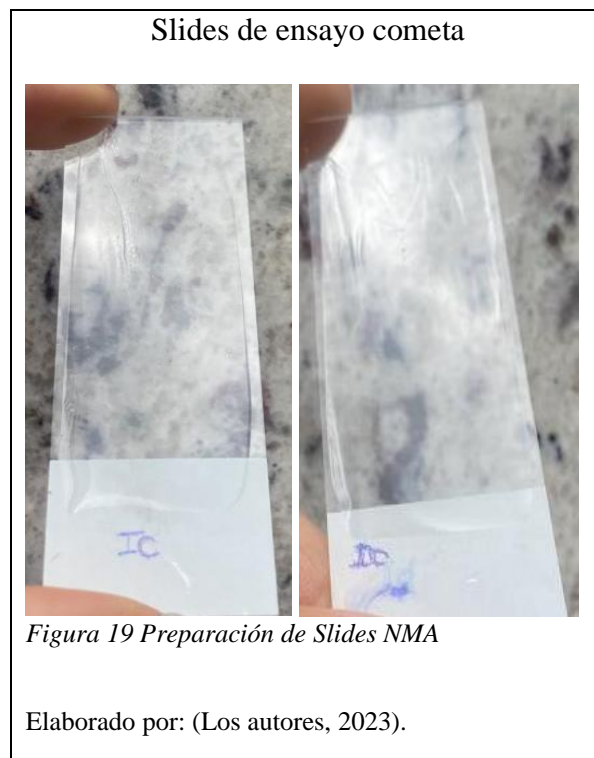
La Tabla 2, presenta los datos obtenidos mediante conteo en la cámara de Neubauer. Comparando las diversas concentraciones con los valores originales del método 100 uL de medio, 200 uL de sangre y 300 uL de Ficoll, se obtiene valores y por lo tanto concentraciones de linfocitos más altos en el método 3 siendo que esta emplea 400 uL de sangre y 500 uL de Ficoll, en ausencia de medio. Siendo que se obtuvo en totalidad aproximadamente de 2 a 3 x10⁶ células mononucleares a partir de 400 uL de sangre periférica.

Se determinó que la concentración adecuada es la antes mencionada, debido a que se obtiene una menor contaminación, es decir, se recupera en su mayoría linfocitos con una cantidad mínima de otras células como hematíes, plaquetas, entre otras.

La sangre para este estudio provino de un voluntario masculino; el cual cumplía con la media de conteo adecuada de $2,5 \times 10^3$ células/uL propuesta por Huerta & Cela, (2018). Comparando con los valores obtenidos en el estudio se determina que se recupera y se obtiene la cantidad de linfocitos adecuada para el estudio con un rango de 2 a 3×10^3 /uL siendo el valor normal de linfocitos de $2,3 \times 10^6$ células/mL.

El recuento de células permite saber cuánto se recupera de su aislamiento de sangre periférica, además al tener comparación de valores referenciales permite conocer si el voluntario posee alguna enfermedad que pueda afectar el estudio como son las infecciones, alimentación, entre otras que causen una reducción de la cantidad total de linfocitos presentes en la sangre (Huerta & Cela, 2018).

4.3 Preparación de slides



En su preparación para el ensayo cometa se determinó que al usar portaobjetos esmerilados se lograba una mejor adhesión tanto de las capas de gel como de las células, debido a que estas poseen una superficie rugosa la cual brinda una mejor adhesión a la capa de agarosa. Consecuentemente, la segunda capa de agarosa LMP a su vez se adhiere mejor y no se corre durante la inmersión en los diversos buffers que se emplea durante el ensayo (Dusinska & Collins, 2008; Tice & Vasquez, 1998).

Por otro lado, el empleo previo de alcoholes como isopropanol y metanol permitieron limpiar las placas de residuos oleosos y particulados como pelusas y polvo siendo de gran importancia dicho paso para que se forme correctamente el film de agarosa de punto de fusión normal (NMA) y que este pueda secarse y adherirse a la superficie a lo largo de la placa como se observa en la Figura 19 (Dusinska & Collins, 2008).

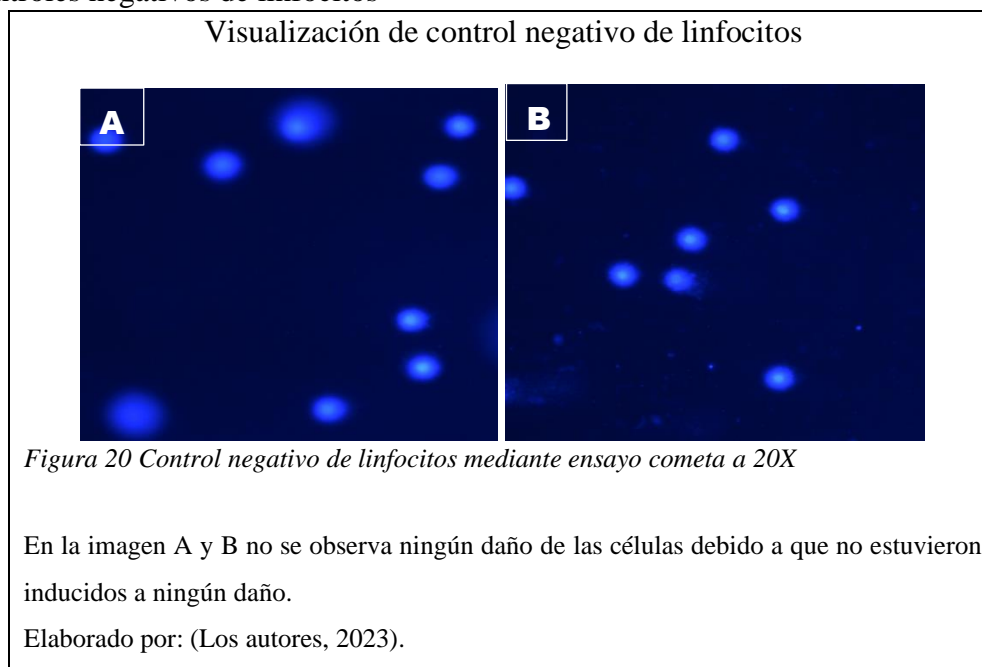
4.4 Preparación de linfocitos

Previa al proceso que corresponde al ensayo cometa se observó que existen células que no son de importancia e interés en el ensayo, y por esa razón se evaluó el uso de PBS una vez obtenido el pellet con el fin de realizar un lavado para ayudar a eliminar las células que se obtuvieron conjuntamente con los linfocitos al igual que para eliminar trazas de Ficoll que puedan interferir posteriormente en el proceso del ensayo cometa. Por esta razón, se optó por resuspender el pellet con 150 uL de PBS y posteriormente centrifugar durante 10 minutos a 400 g.

4.5 Control positivo y negativo de células mononucleares

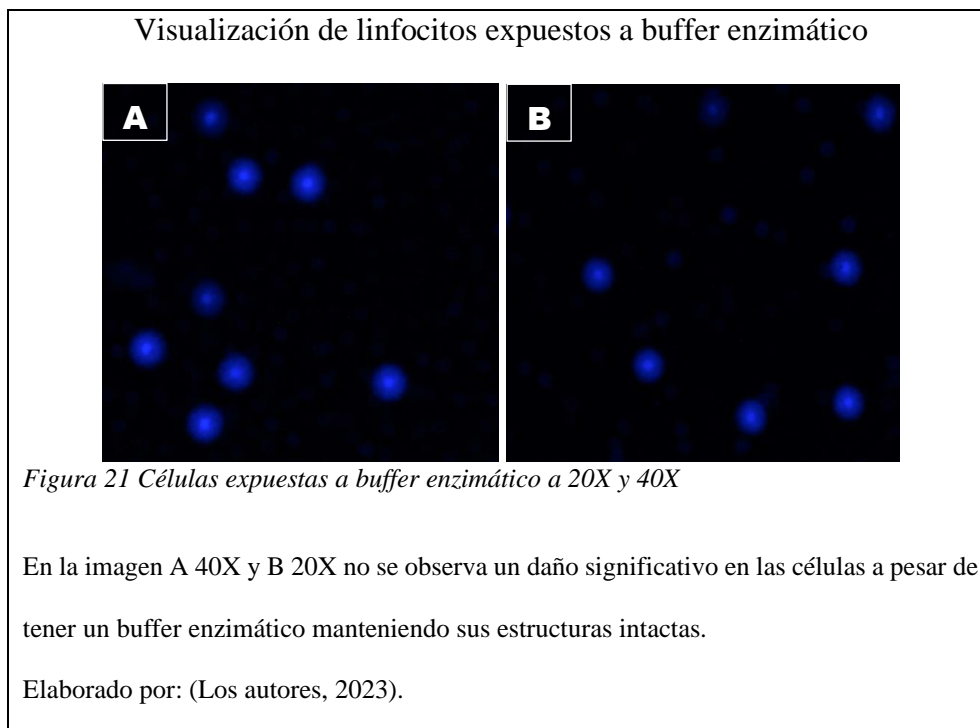
Para la visualización y captura de imágenes se utilizó el programa M-Shot en el cual se evaluaron 100 núcleos por placa, es decir, 50 por cada muestra, con un objetivo de 20X y 40X con el fin de observar núcleos con daño en su cadena o sanas.

4.5.1 Controles negativos de linfocitos



La Figura 20, presenta células visualizadas con un objetivo de 20x en un microscopio de fluorescencia y mediante tinción con DAPI. Estas presentan una estructura circular y compacta con el ADN del núcleo íntegro y por lo tanto podemos confirmar que estas son células normales sin ninguna afectación o daño a su ADN. Adicionalmente, podemos afirmar que no se observa la formación de un cometa, es decir, el núcleo se mantiene íntegro al no existir migración de ADN durante la electroforesis, ya que este no contenía cortes en su doble cadena efecto de los agentes oxidantes o mutágenos.

Para la tinción, se utilizó 5 uL de una solución de trabajo de DAPI a una concentración de 1ug/mL por muestra. Un exceso de este fluorocromo no está relacionado a una mejor visualización de las células. El uso de la concentración final apropiada de la solución de trabajo del tinte fluorescente es importante para lograr una correcta visualización (Rodríguez, 2020).

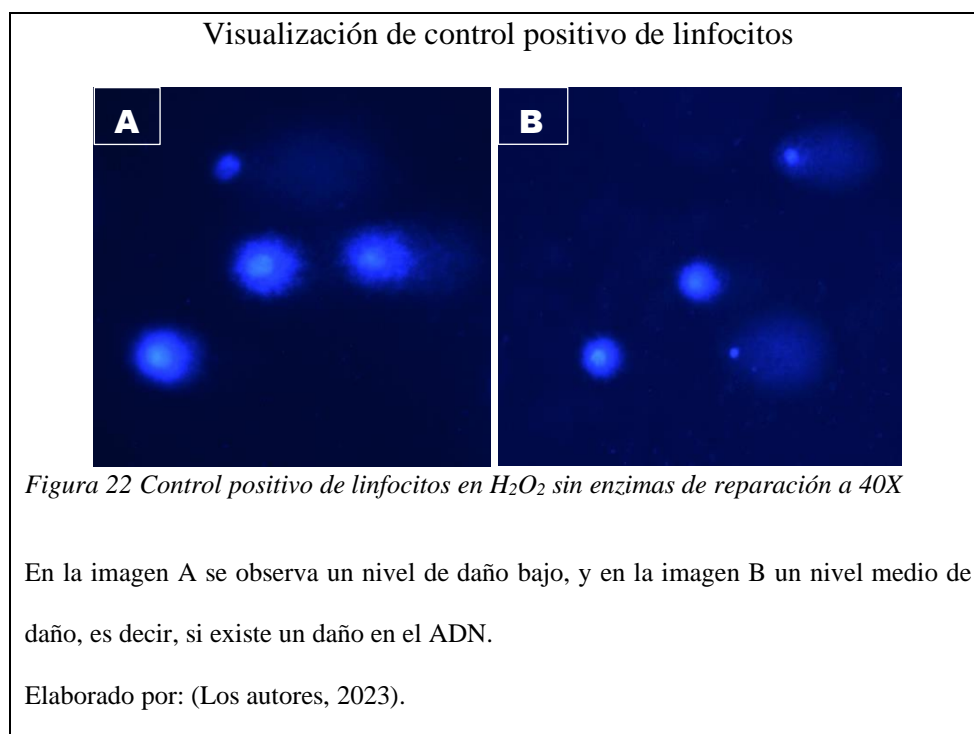


Las células fueron tratadas conforme al protocolo establecido del ensayo cometa, con la diferencia de que fueron expuestas a buffer enzimático desprovisto de las enzimas, esto con la finalidad de

determinar si el buffer enzimático por sí solo puede llegar a inducir daños oxidativos en el ADN de las células (Figura 21).

Se observa en los resultados obtenidos del análisis estadístico presentados en el Anexo 1 y Anexo 2 que el buffer enzimático por sí solo no llega a inducir un daño, es decir, no existe una diferencia significativa de daño en las células, ni introduce ruido en la medición. Dicha consideración es importante para eliminar las posibles variaciones y ruidos que puedan intervenir en la sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad del análisis.

4.5.2 Controles positivos de linfocitos con Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

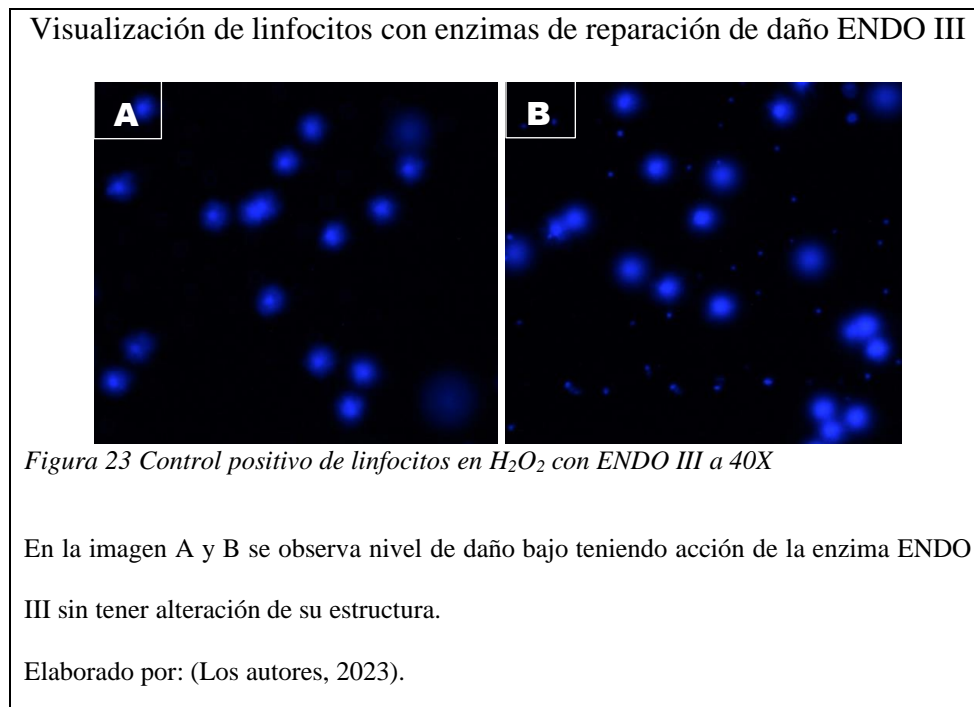


La Figura 22, indica la presencia de daño en el material genético por la acción de Peróxido de hidrógeno o comercialmente conocido como agua oxigenada (H_2O_2) a una concentración de 200 mM, el cual posee un fuerte efecto oxidante en el ADN de las células, sin embargo, se observa diversos niveles de cometa con un porcentaje de nivel de daño bajo (5 – 10 %) y medio (10 – 40 %).

En la figura de la izquierda se observa cometas con daño moderado debido a que se observa migración de ADN, formación de una cola y reducción del tamaño del ADN nuclear, mientras que la figura de

la derecha se observa un cometa con menor grado de daño oxidativo debido a que se presenta con un núcleo roto y una cola que tiene su ADN con poca migración, observándose que la distancia de su cola al núcleo es corta.

Sin embargo, todas las células presentan daño en diferentes grados, llegando a la conclusión que sí existió actividad oxidante por parte del peróxido de hidrógeno, y que por lo tanto es un agente que puede ser utilizado como oxidante en la elaboración de control positivo (G. Camacho et al., 2011).



La Figura 23, presenta núcleos sanos incubados con la enzima de reparación ENDO III, en los cuales se presenta un porcentaje de daño al material genético bastante bajo (5 – 10 %) lo cual, si está acorde a los resultados esperados puesto que en este caso no deben presentar bases como pirimidinas alteradas, indicando que la enzima de reparación ENDO III lleva a cabo su actividad N-glicosilasa y AP liasa, por lo tanto, el ADN nuclear de las células se encuentra intacto y sin formación de cometas.

Visualización de linfocitos con enzimas de reparación de daño FPG

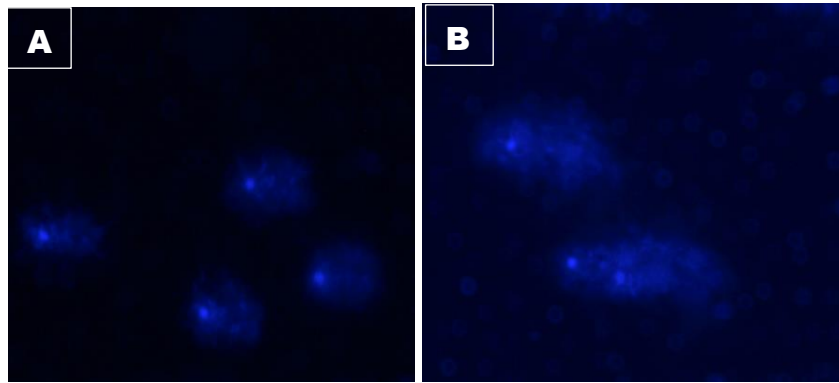


Figura 24 Control positivo de linfocitos en H_2O_2 con FPG a 40X

En la imagen se observa niveles altos de daños en el ADN, la imagen A tiene un daño alto y la imagen B un daño total.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

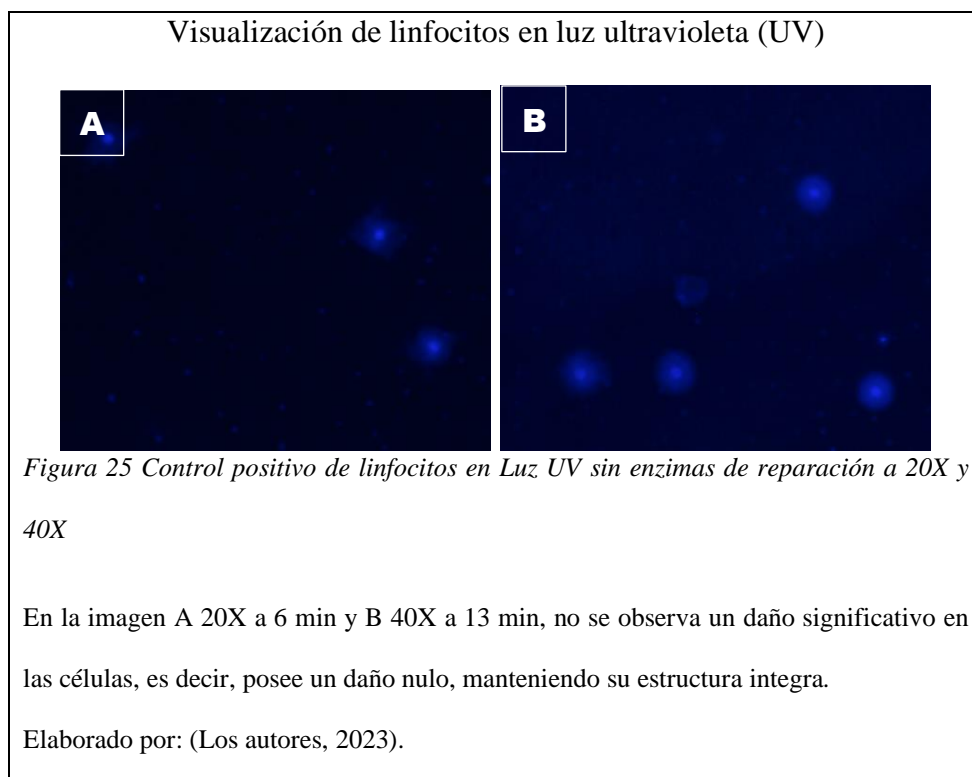
La Figura 24, presenta controles positivos bajo tratamiento oxidativo con el uso de peróxido de hidrógeno a 0,2 M, incubada con la enzima a 37 °C ocasionando daño severo en el material genético. En la imagen A se presenta un porcentaje de nivel de daño alto (40 – 95 %) tras una breve exposición de 6 minutos, mientras que, la imagen de la derecha presenta un porcentaje de daño total (> 95 %) tras una exposición al Peróxido de hidrógeno más prolongada de 13 minutos. Ambos controles fueron incubados y tratados bajo las mismas condiciones de temperatura (37 °C).

Los resultados presentes confirman que el peróxido de hidrógeno es un excelente agente oxidante. Por esta razón, y dado que el H_2O_2 daña el material genético de células mononucleares de forma consistente y reproducible y por su facilidad de uso, el peróxido de hidrógeno es una excelente herramienta para la formación de controles positivos y a su vez para la estandarización del protocolo del ensayo cometa (Razo, 2011).

La exposición de las células a dicho agente oxidante genera cambios en la doble cadena del ADN por la formación de radicales libres OH que interactúan con las bases nitrogenadas y los enlaces de las pentosas ocasionando la oxidación del ADN por la ruptura de la cadena (Ayala et al., 2004; Londoño-Velasco et al., 2019).

En el Anexo 3, Anexo 4 y Anexo 5 se presentan los resultados de las células expuestas al agente como es el peróxido de hidrógeno y a las enzimas de reparación FPG y ENDO III, en la cual se concluye que la enzima FPG tiene un mayor efecto sobre la reparación del daño oxidativo del material genético debido a que los valores obtenidos en el resultado de la media del momento de cola (MCO) indican cuanto daño existe en la célula teniendo concordancia con la función de la enzima como se observa en el Anexo 4, en el cual la prueba t presenta una diferencia significativa entre las enzimas confirmando que tiene mayor acción la enzima FPG debido a que la enzima posee la capacidad de identificar y cortar las regiones de purinas oxidadas. Tal es el caso como ocurre con la 8-hidroxi guanina haciendo que forme cometas de gran tamaño con la formación de una cola larga debido a las rupturas de ADN presentes en la célula ya que quedan sitios apúrinicos (Razo, 2011).

4.5.3 Controles de linfocitos con Luz Ultravioleta (UV)



La Figura 25, presenta las células mononucleares con un halo casi nulo a su alrededor y manteniendo su núcleo íntegro, el cual no presenta un daño significativo (daño < 5 %); sin embargo, el borde difuminado se puede deber a factores ambientales presentes en el laboratorio durante la realización del ensayo como por ejemplo la luz sea esta natural o artificial.

Adicionalmente, los resultados nos demuestran que bajo las condiciones de nuestro ensayo con células expuesta a luz UV los controles negativos arrojan valores similares a aquello de las células expuesta a la luz UV tanto en el caso de exposición durante 6 minutos como durante 13 minutos. En este caso se deduce que las radiaciones no aumentan la apariencia del daño al material genético de las células debido a que el daño es principalmente por oxidación de las pirimidinas y no por las roturas de cadenas. No obstante, los resultados utilizando la enzima ENDO III demuestran un aumento significativo en el incremento de la cola de la cometa demostrando así que el daño es debido a oxidación específicamente en las pirimidinas (Ayala et al., 2004).

En el Anexo 6, podemos observar los dos tratamientos en función del tiempo. Como es de esperarse, conforme aumenta el tiempo de exposición del material genético a la luz ionizante de alta energía, mayor daño existirá a la molécula. Dichas medidas nos ayudan a comparar la cantidad de daño que ocurre por sí solo como se corrobora en el Anexo 7 el cual nos indica que si presentan una diferencia significativa en la exposición de las células a diferente tiempo. Más adelante, se realiza una comparación con enzimas de reparación específica que determinaran el tipo de daño que sufrió la molécula tras la exposición a niveles altos de energía de alta frecuencia.

Las radiaciones al entrar en contacto con el material genético se da una fotosensibilización la cual absorbe la energía y se excitan haciendo que se dé la conformación de especies reactivas de oxígeno (ERO's) haciendo que se dañe el material genético (Ayala et al., 2004).

Visualización de linfocitos con enzimas de reparación de daño ENDO III

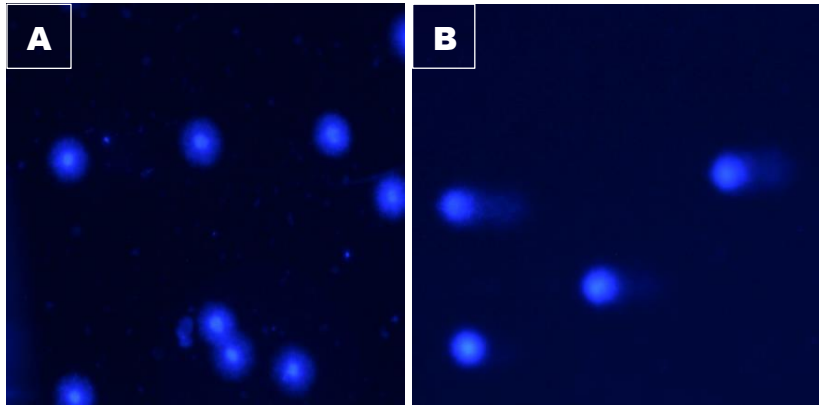


Figura 26 Control positivo de linfocitos en Luz UV con ENDO III a 40X

La imagen A presenta un nivel de daño bajo debido a la poca inducción a luz UV (6 min), mientras que, la imagen B presenta un nivel de daño medio por su mayor exposición (13 min).

Elaborado por: (Los autores, 2023).

La Figura 26 presenta a las células mononucleares con diversos porcentajes de daño, en la imagen de la A se observa un porcentaje de nivel de daño ninguno ($< 5\%$) en un tiempo de exposición de 6 minutos, mientras que la imagen de la B presenta un porcentaje de nivel de daño medio (10 – 40 %) a un tiempo de exposición de 13 minutos.

La enzima ENDO III tiene su acción en el ensayo cometa cortando la cadena de ADN en la cual detecta las regiones de pirimidinas dañadas por actividad de la luz UV que ha llegado a generar un daño oxidativo en el material genético de las células. Según las condiciones como tiempo y longitud de onda se observa el nivel de daño en la célula (Toledano, 2015).

En la imagen se observa que la luz UV no tiene una acción mayor sobre la rotura de las cadenas de ADN ya que cualquier daño estaría a nivel de las pirimidinas en mayor frecuencia como lo menciona Villa Martínez, (2018) por esta razón se observa un porcentaje del nivel de daño celular bajo no llegando a un 40%.

Por otro lado, este bajo nivel de daño producido por la luz UV, existe posiblemente debido a una reversión del dímero dañado por medio de una absorción de luz ultravioleta a una longitud de onda de 240 nm la cual puede inducir una reparación mínima de los dinucleótidos (Toledano, 2015).

El Anexo 8 y Anexo 9 nos exponen la diferencia en tratamientos según el tiempo de exposición del material genético a la luz UV y posterior incubación con enzimas de reparación ENDO III. Utilizando los datos del Anexo 1 como control, se realiza una comparación con la acción enzimática de ENDO III, el cual conforme mayor fue el tiempo de exposición a la energía ionizante así mismo mayor fue la longitud de la cola y porcentaje de ADN en la cola como se observa en el Anexo 10 en comparación al Anexo 11 (Cadet & Douki, 2018).

Dado que la exposición del material genético a la luz UV da lugar a mutaciones específicas y formación del sustrato de la enzima de reparación; en este caso, los sustratos de la enzima fueron dímeros de pirimidinas donde dos pirimidinas iguales forman un doble enlace que las une covalentemente, por lo cual dicho dímero no se encuentra de manera natural en el ADN, haciendo que estas formaciones de dímeros sean las causales de un aumento en la longitud de la cola (Cadet & Douki, 2018; Janssens et al., 2020).

Visualización de linfocitos con enzima de identificación de daño FPG

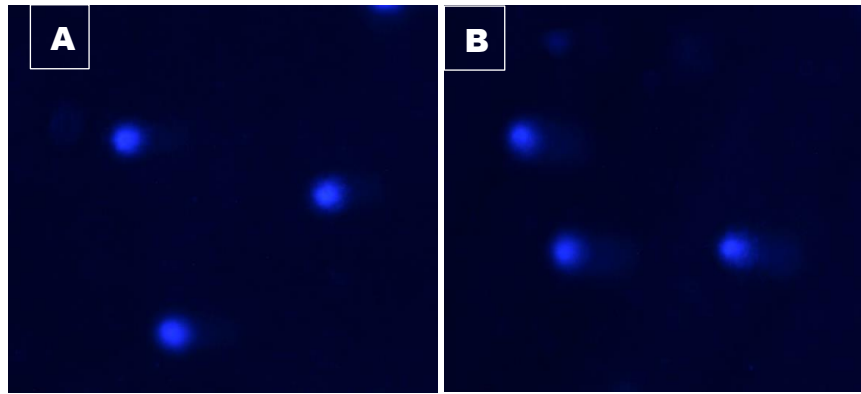


Figura 27 Control positivo de linfocitos en Luz UV con FPG a 40X

La imagen A presenta un nivel de daño bajo debido a la poca inducción a luz UV (6 min), mientras que, la imagen B presenta un nivel de daño alto por su mayor exposición (13 min).

Elaborado por: (Los autores, 2023).

La Figura 27, presenta la actividad de la enzima FPG en células expuestas a luz UV, imagen de la A que estuvo en un tiempo de exposición de 6 minutos presenta un porcentaje de nivel de daño bajo (5 - 10 %), mientras que la imagen B presenta un porcentaje de nivel de daño alto (40 – 95 %) a un tiempo de exposición de 13 minutos.

En la exposición de luz ultravioleta durante 6 minutos no se observó un daño elevado sino un nivel de daño bajo o medio. En otras palabras, la luz ultravioleta ocasiona daños tanto a las purinas como pirimidinas, sin embargo, no se presenta un daño relativamente alto en todas sus células, sino que en aproximadamente un 90% de células presenta un nivel de daño bajo debido a que la radiación ultravioleta causa un mayor daño en purinas que pirimidina (Martinez-Fernandez et al., 2017).

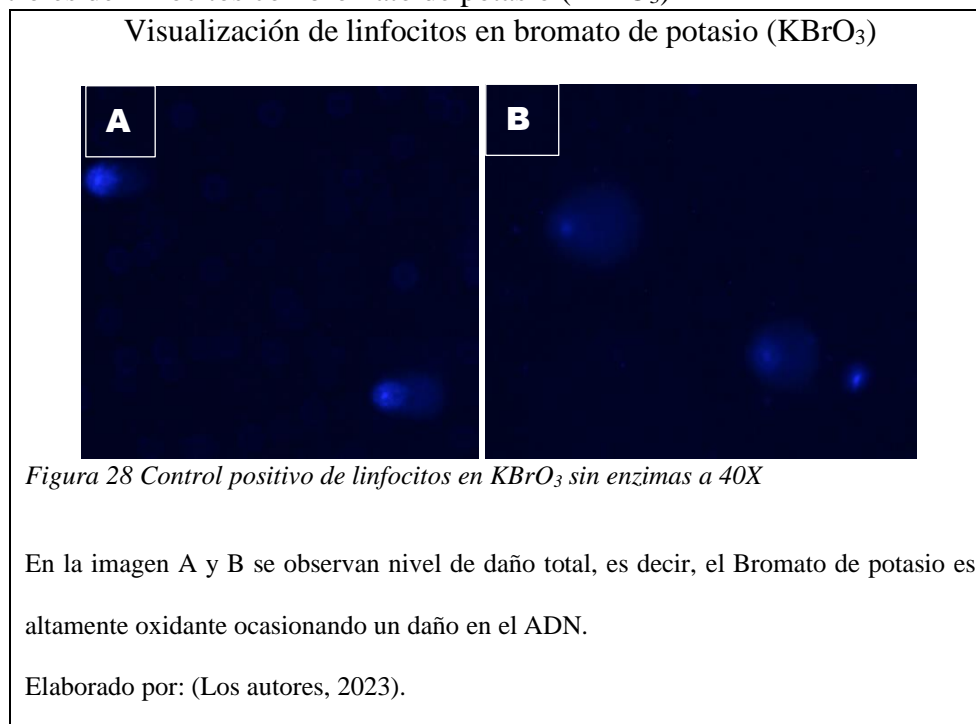
En el Anexo 12, se puede apreciar la diferencia en el área de los cometas en función al tiempo de exposición a la luz ionizante tras tratamiento enzimático con enzima de reparación FPG, por lo cual a mayor es el tiempo de exposición del material genético a la luz UV, mayor será el nivel de daño presente en dicho núcleo teniendo una diferencia significativa como se observa en el Anexo 13.

En conformidad con el aumento en el nivel de daño en la molécula de ADN, mayor será la actividad bifuncional enzimática en la molécula de ADN por lo que tras la electroforesis, se esperaba hallar una mayor concentración de ADN en la cola; de igual manera, el presente ensayo demuestra que la luz ionizante de alta energía da lugar a la formación de mutaciones por dimerización y por oxidación (Cadet & Douki, 2018).

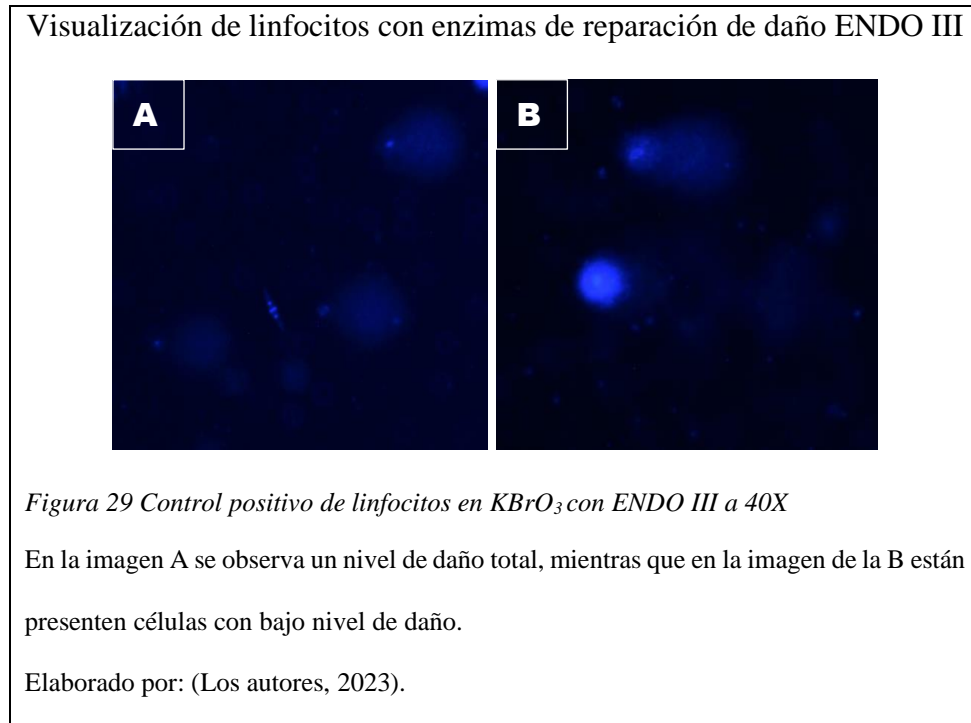
En el caso de la enzima FPG, es más probable que el sustrato sean bases de ADN oxidadas por fotosensibilización con carácter oxígeno dependiente tal y como la 8-oxoguanina, por lo cual indica que la formación de dímeros será más común en pirimidinas (Janssens et al., 2020).

Sin embargo, en la evaluación de daño se debe tomar en cuenta el tiempo de incubación al agente oxidante en las placas. La Figura 25; Figura 26; Figura 27 presentan imágenes en un tiempo de exposición de 6 minutos siendo A y de 13 minutos siendo B, en las cuales, se observa una diferencia de longitud de los cometas a pesar de haber estado bajo la misma concentración del agente oxidante (G. Camacho et al., 2011). Por lo que existe una correlación entre el tiempo de exposición al agente oxidante y el porcentaje de daño inducido al núcleo.

4.5.4 Controles de linfocitos con bromato de potasio ($KBrO_3$)



En la Figura 28, se presenta un efecto del Bromato de potasio en las células mononucleares con un porcentaje de nivel de daño total (> 95 %), el mismo que indica que dicho agente empleado es un fuerte agente oxidante del ADN. Dicho compuesto puede utilizarse para estandarizar el protocolo del ensayo cometa al permitir la formación de ejemplares con cometa como control positivo interno del ensayo. La capacidad oxidante del compuesto se da incluso en concentraciones a nivel milimolar.



La Figura 29, presenta las células con diversos porcentajes de nivel de daño ante el tratamiento enzimático de ENDO III, como el caso de la imagen A un nivel de daño total (> 95 %) demostrado mediante la presencia de la longitud de cola, mientras que la imagen B presenta diversos niveles de daño tanto total (> 95 %) como bajo (5 – 10 %) respectivamente, predominando células con un nivel de daño total, esto se puede deber a que el agente no tuvo contacto con la totalidad de células presentes en la placa, por lo que existe presencia de células con bajo nivel de daño.

Visualización de linfocitos con enzimas de reparación de daño FPG

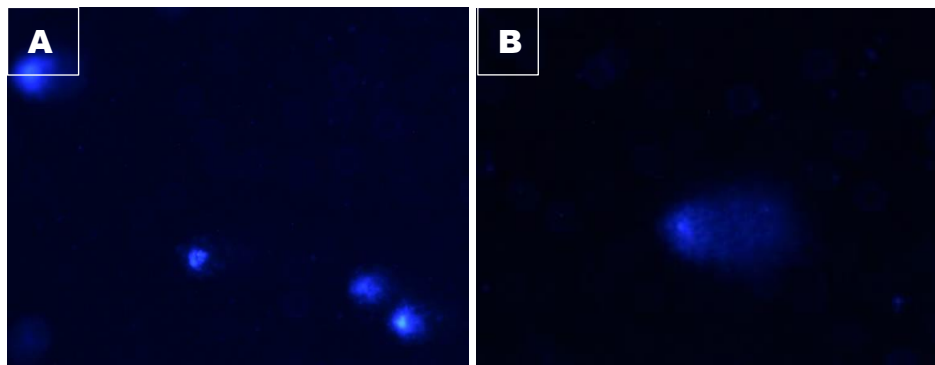


Figura 30 Control positivo de linfocitos en $KBrO_3$ con FPG a 40X

La imagen A y B presentan diferentes niveles de daño, sin embargo, son altos lo cual indica que su acción en las células si resulta altamente oxidante.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

La Figura 30, presenta las células con un nivel de daño elevado en el cual la imagen A presenta un porcentaje de nivel de daño alto (40 – 95 %), mientras que la imagen B presenta un porcentaje de nivel de daño total (> 95 %), el cual se observa que en efecto el Bromato de potasio presenta un fuerte daño oxidante en las células mononucleares debido a la longitud del largo de la cola en el cometa.

La acción enzimática de la formamidopirimidina (FPG) es significativa y específica debido a que su actividad enzimática en las purinas degeneradas, ocasionan una ruptura en la doble cadena de ADN permitiendo así la migración de ADN durante la electroforesis, de tal manera que aumenta la longitud e intensidad (cantidad de ADN en la cola) de la cola de los cometas (Ballmaier & Epe, 1995).

El Anexo 14 y Anexo 15, presentan la acción de las enzimas de reparación para pirimidinas como es el caso de ENDO III y las purinas FPG en las cuales se ve una mayor actividad de reparación del ADN por parte de la enzima FPG como se observa en el Anexo 16. El bromato de potasio actúa sobre las guaninas permitiendo que se forme aductos en el ADN, es decir una modificación en su estructura, siendo el blanco perfecto para la unión de dicho agente oxidante al material genético ocasionando lesiones en la cadena y originando roturas que se conviertan en mutaciones impidiendo y frenando procesos de replicación y transcripción de ADN (Murata et al., 2001).

5 Conclusiones y recomendaciones

Durante el proceso de estandarización de la separación y aislamiento de células mononucleares a partir de sangre completa se reconocieron las variables que influyen en la optimización del proceso tales como son el tiempo de centrifugación, cantidad de muestra, cantidad de Ficoll y cantidad de medio como diluyente. Posteriormente, se determinó los parámetros más idóneos para cada una de las variables mencionadas.

Por otro lado, se concluyó que a mayor tiempo de centrifugación y menos revoluciones por minutos el rendimiento es óptimo. Adicionalmente, se determinó que a mayor cantidad de Ficoll mejor es la separación y visualización de las fases, así como que el lavado final de las células utilizando PBS conduce a un aislamiento más puro de linfocitos. Estas optimizaciones condujeron a la recuperación de un 97% de los linfocitos presentes en la sangre completa por medio de los cálculos realizados del conteo de la cámara de Neubauer y permitieron el uso de la micro técnica de separación por Ficoll, produciendo beneficios adicionales en términos de ahorro de reactivos y tiempo.

En la evaluación correspondiente al efecto que producen los agentes mutagénicos permite realizar una amplia comparación, siendo que se determinó que el Bromato de potasio fue el agente que mayor daño produjo al material genético, esto debido a que actúa en la formación de nucleótidos anómalos tales como el 8-oxoG.

Las enzimas de reparación FPG y ENDO III juegan un papel crítico en la detección y remoción de bases dañadas en la cadena doble de ADN. Por un lado, la enzima FPG reconoce y remueve purinas dañadas presentes en la doble cadena de ADN, mientras que, la enzima ENDO III detecta y remueve pirimidinas dañadas en la doble cadena, pero, ambas enzimas poseen actividad N-glicosilasa, la misma que cumple la actividad de cortar los enlaces glicosídicos entre la base alterada y el esqueleto de azúcar-fosfato del ADN, generando un sitio AP, también, poseen actividad AP-liasa, la cual realiza el corte en el sitio AP, dando lugar a un espacio de un nucleótido en el ADN AP (Wink & Laval, 1994; Yang et al., 2019). Sin embargo, ambas enzimas FPG y ENDO III, se obtuvieron de una cepa

de *Escherichia coli* modificada que contiene los genes fpg y nth respectivamente para la producción y obtención de dichas enzimas (Kushwaha et al., 2011; Wink & Laval, 1994; Yang et al., 2019).

La inclusión de las enzimas de reparación en el ensayo cometa permitieron caracterizar los orígenes del tipo de daño inducido por los diversos agentes oxidantes y mutágenos. Pudiéndose concluir que el principal daño ocasionado por aquellos agentes evaluados en este estudio es oxidativo.

El software OpenComet posee un algoritmo robusto de análisis de imágenes para clasificar y discernir los cometas en sus respectivas partes, el mismo que facilita el conteo de los cometas, debido a que su análisis de perfil de imagen está basado en el reconocimiento de figuras geométricas y segmentación de la cabeza del cometa a través de perfiles de intensidad de color en la imagen por lo cual facilita y ahorra tiempo en la obtención de los datos paramétricos claves para el análisis del daño a las células objeto de estudio (Gyori et al., 2014).

Finalmente, se concluye que el ensayo cometa es un método que presenta una alta sensibilidad, especificidad y rapidez para la evaluación de daños en la cadena de ADN causado por agentes mutagénicos llegando a ser un método eficaz para el estudio de eficacia en reparación de daños en el ADN que permitan comprender los diversos mecanismos de reparación y protección del ADN, así como la estabilidad genética que presente ante la acción de diversos agentes mutagénicos dañinos para el material genético.

Como recomendación final, una vez establecidos mediante este estudio preliminar, parámetros básicos para la estandarización del ensayo cometa, se deberá pasar a una segunda fase de validación del método. Para tal finalidad se deberá incluir un número significativo de muestras, las mismas que deberán ser repetidas varias veces durante varias ocasiones de tal manera que se pueda determinar coeficientes de variación al igual que la reproducibilidad, repetibilidad y sensibilidad del método.

También como parte del proceso de estandarización y validación se deberán elaborar controles tanto positivos como negativos los mismo que deberán mantenerse bajo congelación en nitrógeno líquido o en ultra congeladora de tal manera que para cada ensayo se incluya una alícuota para poder afirmar

que el ensayo corrió de forma tanto correcta como de una forma reproducible. Estos controles siempre deberán arrojar los mismos resultados. Por otro lado, una vez validado el método, sería cuestión de darle una utilidad práctica mediante la realización de estudios en campo, por ejemplo, la determinación del daño genotóxico en trabajadores agrícolas con exposición crónica a pesticidas y herbicidas de la agroindustria ecuatoriana.

6 Bibliografía

- Arcaute, C. R. De, Laborde, M., Soloneski, S., & Larramendy, M. (2021). *Genotoxicidad y carcinogénesis*. 148–183.
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/131176/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ayala, M. C., Hernández, Y. G., Piñeiro, J. C. G., & González, E. P. (2004). Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(3), 277–284.
http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_1_1_X085X3299R.pdf
- Ballmaier, D., & Epe, B. (1995). Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 16(2), 335–342.
<https://doi.org/10.1093/carcin/16.2.335>
- Barbosa, M. C., Aiassa, D., & Mañas, F. (2017). Evaluación de daño al adn en leucocitos de sangre periférica humana expuestos al herbicida glifosato. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(3), 403–410. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.04>
- Beltrán, E., & González, H. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos. In *Madrid, 2011*.
https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf
- BioLab. (2023). *Tma Endonuclease III*. Obtenido de https://international.neb.com/products/m0291-tma-endonuclease-iii#Product%20Information_Properties%20&%20Usage
- BioLabs. (2023). *Comet Assay - Modified for Detection of Oxidized Bases Using the Repair Endonucleases Fpg, hOGG1 and Endonuclease III (Nth)*. Obtenido de

<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/comet-assay-modified-for-detection-of-oxidized-bases-using-the-repair-endonucleases-fpg-hoggi-and-endonuclease-iii-nth>

BioLabs. (2023). *Fpg*. Obtenido de <https://international.neb.com/products/m0240-fpg#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>

Cabrera, C., & López, M. (2006). Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*, 29(7), 25–32. <https://doi.org/10.4321/s0378-48352006000700003>

Cadet, J., & Douki, T. (2018). Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(12), 1816–1841. <https://doi.org/10.1039/c7pp00395a>

Camacho, G., Morán, J., Betancourt, N., Monreal, D., & Benítez, A. (2011). *Evaluación por ensayo cometa de daño celular inducido con peróxido de hidrógeno a linfocitos de sangre periférica in vitro*. 45(7), 276–291. https://doi.org/10.2150/jiej1917.45.7_276

Camacho, M. R. (2018). *Determinación de la genotoxicidad por exposición a plaguicidas en el personal agrícola mediante la técnica de ensayo cometa*. 113. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/17594>

Carrisoza, M. (2006). *Estandaización de la técnica de electroforesis en gel de células individuales (SCGE) para evaluar alteraciones en el ADN de ostión japonés*. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/345/1/carrisoza_m.pdf

Carvalho, C. (2015). *Efecto del KBrO3 sobre la calidad seminal y su correlación con la citotoxicidad y genotoxicidad en eritrocitos policromáticos de la médula ósea roja en ratón “ Mus musculus .”* https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4406/Carvalho_mc.pdf?sequence=3&isAllowed=y

- Castro, M. (2009). *Valor de la técnica Fish para la detección de translocaciones en linfomas no Hodgkin*.
https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2587/9788498872491_content.pdf?sequence=1
- Chabicovsky, M., Winkler, S., Soeberdt, M., Kilic, A., Masur, C., & Abels, C. (2019). Pharmacology, toxicology and clinical safety of glycopyrrolate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 370(March), 154–169. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.016>
- Cordelli, E., Bignami, M., & Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*, 10(1), 68–78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- Cortina Rosales, L., Hernández Ramírez, P., López De Roux, M. D. R., Artaza Sanz, H. M., Dorticós Balea, E., Macías Abraham, C., Socarrás Ferrer, B. B., Lam Díaz, R. M., González Suárez, T., De Los Ángeles Matamoros, M., González Iglesias, A. I., Salgado Arocena, O., & Hernández Rego, Y. (2008). Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica para trasplante de células madre. Método simplificado. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 24(3). <http://scielo.sld.cu/pdf/hih/v24n3/hih04308.pdf>
- Cytiva. (2020). *Ficoll-Paque PLUS Cell preparation Instructions for Use*. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-12637-pdf>
- Deltalab. (2022). *Hematología y Bioquímica*. <https://www.deltalab.es/wp-content/uploads/2022/04/V2-ES-03-Hematologia-y-Bioquímica-2019-72-89.pdf>
- Dizdaroglu, M. (2015). Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 763, 212–245. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.11.002>
- DoAS. (2016). Bromato De Potasio (Potassium Bromate). *Senior Services*, 158, 6. <https://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1559sp.pdf>

- Dusinska, M., & Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: Gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191–205. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen007>
- Elespuru, R. K., Doak, S. H., Collins, A. R., Dusinska, M., Pfuhler, S., Manjanatha, M., Cardoso, R., & Chen, C. L. (2022). Common Considerations for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4(May), 1–6. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.859122>
- Espinosa, G., González, M., Ilizaliturri, C., Yolanda, P., Días, F., & Mejía, J. (2014). *Ensayo cometa en fauna terrestre*. https://www.researchgate.net/publication/260417342_Ensayo_cometa_en_fauna_terrestre
- Estrada, R., & Venegas, P. (2007). Comparación De Diferentes Protocolos Para El Cultivo De Células Madre Mesenquimales De Origen Adiposo. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas @BULLET*, 28(21), 21–28. <http://www.scielo.sa.cr/pdf/rccm/v28n1-2/a03v28n1y2.pdf>
- Fleury, M. (2019). Manual de toma de muestra en Laboratorio Clínico. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. [http://pncq.org.br/uploads/2019/Manual de toma - 2019.pdf](http://pncq.org.br/uploads/2019/Manual_de_toma_-_2019.pdf)
- Francesc Solé. (2012). *Bases técnicas del FISH*. https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=065873b3-02a9-452f-9b49-605a3ebcbddd&groupId=10157
- FREMAP. (2009). *Cancerígenos y mutágenos*. 340–342. [https://www.ujaen.es/servicios/prevencion/sites/servicio_prevencion/files/uploads/Información cancerígenos y mutágenos.pdf](https://www.ujaen.es/servicios/prevencion/sites/servicio_prevencion/files/uploads/Información_cancerígenos_y_mutágenos.pdf)
- Fromme, J. C., & Verdine, G. L. (2003). Structure of a trapped endonuclease III-DNA covalent intermediate. *EMBO Journal*, 22(13), 3461–3471. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg311>
- García de Insausti, C. L. (2012). *Aislamiento y caracterización células membrana amniótica. Una nueva fuente para terapia celular e inmuno-modulación [Tesis doctoral]*. 1–269.

https://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf

García, L. P., Marqués, J. P., & Viola, M. (2015). Oxidative Stress, Dna Damage and Cancer. *Rev.Cienc.Biomed*, 6(1), 107–117.

<https://repositorio.unicartagena.edu.co/bitstream/handle/11227/10741/14>

Oxidativo.pdf?sequence=1

García, P. (2015). *Estudio de citotoxicidad y genotoxicidad de productos de reacción de diclorofeno catalizado por lacasa de Corioloipsis gallica en linfocitos humanos.*

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/648/1/241881.pdf>

Girós, M., López, J., Serrano, M., Sierra, C., Toledo, L., & Pérez, C. (2016). *Protocolo de diagnóstico y tratamiento de los trastornos peroxisomales del espectro Zellweger y de la condrodysplasia punctata rizomélica.* 1–23. <https://aecom.com.es/protocolos/protocolo14.pdf>

Gollapudi, B. B., Su, S., Li, A. A., Johnson, G. E., Reiss, R., & Albertini, R. J. (2020). Genotoxicity as a toxicologically relevant endpoint to inform risk assessment: A case study with ethylene oxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 61(9), 852–871.

<https://doi.org/10.1002/em.22408>

González, M., Tamayo, M., & Sánchez, Á. (2009). La Radiación Ultravioleta. Su Efecto Dañino Y Consecuencias Para La Salud Humana. *Theoria*, 18(2), 69–80.

<https://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>

González, M., Torres, M., & Ortiz, R. (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 3–9. <https://www.redalyc.org/pdf/576/57611797001.pdf>

Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., & Clement, M. V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*, 2(1), 457–465.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.020>

- Hopking, R. (2016). DNA Damage Causing Aging or Aging Causing DNA Damage? *SciBytes*.
<https://www.nature.com/scitable/blog/scibytes/>
- Huerta, J., & Cela, E. (2018). Hematología práctica: interpretación del hemograma y de las pruebas de coagulación. *Curso de Actualización Pediatría*, 507–526.
https://www.aepap.org/sites/default/files/507-526_hematologia_practica.pdf
- Ibarra, C. L.-S. C. O.-M. A. U. H. C.-S. V. H. (2018). Aislamiento y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales en Sangre Periférica Humana. *Artículo Original .Investigación En Discapacidad*, 7, 47–52. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2018/ir182a.pdf>
- Igualada, P., & Albiach, G. (2018). Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. *Instituto de Ciencia y Tecnología Animal*, 1–8.
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez - Estimacion de la Densidad Celular.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- INSST. (2022). *Agentes cancerígenos en el trabajo*. 1–12.
<https://www.insst.es/documents/94886/2730585/Ficha+nº0+Aspectos+generales+-+Año+2022.pdf/40d4793f-be61-7456-94e2-1361173ee164?t=1643757709465>
- Janssens, R., Cristóvão, B. M., Bronze, M. R., Crespo, J. G., Pereira, V. J., & Luis, P. (2020). Photocatalysis Using UV-A and UV-C Light Sources for Advanced Oxidation of Anti-Cancer Drugs Spiked in Laboratory-Grade Water and Synthetic Urine. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 59(2), 647–653. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b04608>
- Kawanishi, S., & Murata, M. (2006). Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology*, 221(2–3), 172–178.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.002>
- Kirkland, D., Aardema, M. J., Battersby, R. V., Beevers, C., Burnett, K., Burzloff, A., Czich, A., Donner, E. M., Fowler, P., Johnston, H. J., Krug, H. F., Pfuhler, S., & Stankowski, L. F. (2022). A weight of evidence review of the genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂). *Regulatory*

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105263>

Kushwaha, S., Vikram, A., Trivedi, P. P., & Jena, G. B. (2011). Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726(2), 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.10.004>

Lagunas, F. (2018). Daño y reparación del ADN. *Ciencia*, 69(4), 7–11. <https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/DanoADN.pdf>

Landeros, J. (2012). *Agentes mutagénicos y su daño en el ADN*. 136. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5800/Landeros_Gutiérrez_Juan_Fernando.pdf?sequence=1

Leary, R. J., Sausen, M., Kinde, I., Papadopoulos, N., Carpten, J. D., Craig, D., O’Shaughnessy, J., Kinzler, K. W., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Diaz, L. A., & Velculescu, V. E. (2012). Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Science Translational Medicine*, 4(162). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004742>

Londoño-Velasco, E., Martínez-Perafán, F., Carvajal, S., García-Vallejo, F., & Hoyos-Giraldo, L. S. (2019). Evaluation of oxidative and methylating DNA damage in painters occupationally exposed to organic solvents and paints | Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pinturas. *Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 39(3), 464–477. <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/4289/4138>

Lopez Montoya, C. (2011). *Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por benzo[a]pireno en Dunaliella tertiolecta*. 84. <https://repositorioinstitucional.uabc.mx/bitstream/20.500.12930/841/1/ENS069930.pdf>

- Manzano, E., Ferreira, M., Cudmani, D., Costa, D., Nobrega, M. De, & Gómez, A. (2021). *Radiación ultravioleta C aplicada a la desinfección de ambulancias*. *March*.
https://www.researchgate.net/publication/350103362_Radiacion_ultravioleta_C_aplicada_a_la_desinfeccion_de_ambulancias/figures?lo=1
- Martí, S., Abril, C., Bosh, A., & Rodríguez, C. (2015). *Derivados Hemáticos. Criterios de trabajo según la muestra y el estudio destinado*. 19–33.
- Martínez, S. (2017). *Biomarcadores de genotoxicidad y estudios de homogeneidad genética en *Heleobia cf. australis* para el análisis ambiental de la costa uruguaya*. 1–34.
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10206/1/uy24-18587.pdf>
- Martinez-Fernandez, L., Banyasz, A., Esposito, L., Markovitsi, D., & Improtta, R. (2017). UV-induced damage to DNA: Effect of cytosine methylation on pyrimidine dimerization. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2(January), 1–7. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.21>
- Meléndez, I., Quijano, A., & Yañez, L. (2017). Genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de durazno, *Prunus persica* cultivados en pamplonita Norte de Santander. *Ciencia En Desarrollo*, 8(1), 83–91. <https://doi.org/10.19053/01217488.v8.n1.2017.6221>
- Møller, P., Muruzabal, D., Bakuradze, T., Richling, E., Bankoglu, E. E., Stopper, H., Langie, S., Azqueta, A., Jensen, A., Scavone, F., Giovannelli, L., Wojewódzka, M., Kruszewski, M., Valdiglesias, V., Laffon, B., Costa, C., Costa, S., Teixeira, J. P., Marino, M., ... Collins, A. (2020). Potassium bromate as positive assay control for the Fpg-modified comet assay. *Mutagenesis*, 35(4), 341–348. <https://doi.org/10.1093/mutage/geaa011>
- Muñoz Aristizábal, A. F. (2009). Evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 12(1).
<https://doi.org/10.31910/rudca.v12.n1.2009.637>
- Murata, M., Bansho, Y., Inoue, S., Ito, K., Ohnishi, S., Midorikawa, K., & Kawanishi, S. (2001). Requirement of glutathione and cysteine in guanine-specific oxidation of DNA by carcinogenic

potassium bromate. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 678–685.

<https://doi.org/10.1021/tx000209q>

NJHealth. (2017). Peróxido de Hidrógeno. *New Jersey Department of Health*, 6.

<https://www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1015sp.pdf>

OIT. (2014). La seguridad y la salud en el uso de productos químicos en el trabajo. *Revista*, 1, 1–30.

https://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/@ed_protect/@protrav/@safework/documents/publication/wcms_235105.pdf

Olea, F. (2016). Técnicas estadísticas aplicadas en nutrición y salud. *Departamento de Nutrición y Bromatología. UGR*, 15–31.

Ortiz, I., Peláez, C., Orozco, L., & Zuleta, M. (2012). Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. *Biomedica*, 32(3), 437–448. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.739>

Ortiz, J. M., & Medina, M. E. (2020). Estrés oxidativo ¿un asesino silencioso? *Educación Química*, 31(1), 2. <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2020.1.69709>

Paschoal, L. R. P., & Zara, F. J. (2018). Sperm count of *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) populations with distinct life histories, with introduction of a simple counting method. *Aquaculture*, 491, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.12.046>

Paz y Miño, C., Sánchez, M., Arévalo, M., Muñoz, M., Witte, T., De-la-Carrera, G., & Leone, P. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 456–460. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000300026>

Peña, J. (2017). *Sistema Inmune*. Obtenido de https://inmunosalud.net/index.php?option=com_content&view=article&id=79&catid=71&Itemid=580

- Poetsch, A. R. (2020). The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>
- Posada, O. (2005). *Estudio descriptivo de las técnicas para la evaluación del efecto genotóxico y citotóxico de biomateriales in vitro*. 2, 1–7. https://repository.eia.edu.co/bitstream/handle/11190/5574/PosadaOlga_2005_EstudioDescriptivoTecnicas.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Prakash, A., Doublíé, S., & Wallace, S. S. (2012). The Fpg/Nei family of DNA Glycosylases: Substrates, structures, and search for damage. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 110, 71–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387665-2.00004-3>
- Quintero, M. Z., María, A., Ruiz, V., Cristina, I., & Trujillo, O. (2009). Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. *Medicina Upb*, 28(1). <https://www.redalyc.org/pdf/1590/159013067005.pdf>
- Ramirez, G., Neira, C., Sedano, E., & Verona, J. (2020). Validation of a new method for estimating low platelet counts: G&S method. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 56, 1–7. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200036>
- Razo, G. (2011). Efecto genoprotector del jugo de toronja mediante la reparación y apoptosis. *Instituto Politécnico Nacional*, 85. <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8917/1/tesis%20guadalupe.pdf>
- Rédei, G. (2008). Dapi. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*, 0747(815), 468–468. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_4115
- Rodríguez, Fontanetti, C., Christofolletti, C., & Díaz, S. (2014). *Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica / Enhanced Reader*. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181238817005.pdf>

- Rodríguez, R. (2020). *Estudio de la genotoxicidad de nanopartículas de óxidos metálicos en leucocitos extraídos a partir de muestras de saliva*.
https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/29202/RodriguezFernandez_Raquel_TFM_2021.pdf?sequence=2
- Rodríguez, R., & Suescún, G. (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica hibridación in situ fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Salud Uninorte*, 29(2), 327–340.
<http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v29n2/v29n2a17.pdf>
- Rodriguez, Y., Hinz, J., & Smerdon, M. (2015). Accessing DNA damage in chromatin: Preparing the chromatin landscape for base excision repair. *DNA Repair*, 32, 113–119.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.021>
- Rojas, A. C. (2018). *Aprender es conocer Método : aislamiento de células sanguíneas por gradiente de Ficoll- Paque*. 1–5. <https://conogasi.org/articulos/metodo-aislamiento-de-celulas-sanguineas-por-gradiente-de-ficoll-paque/>
- Roncancio, T., Parra, R., Mejia, J., & Guevara, G. (2019). Hibridación in situ fluorescente (FISH) en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) de Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*, 23(1), 3–11. <https://doi.org/10.35509/01239015.73>
- Rueda, L. (2016). *Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas in vitro en la evaluación del daño al ADN*. <https://core.ac.uk/download/pdf/323349621.pdf>
- Rueda Torres, L. V. (2017). *Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas in vitro en la evaluación del daño al ADN, Lima 2016. Repositorio de Tesis - UNMSM*.
- Salim, D. R., Flores, T., Chuy, S. C., Domínguez, S., Ovando, P., Juárez, G., Rúa, W., & López, L. (2004). *Intoxicación con bromato de potasio en una escuela*. XI, 196–198.
https://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2004/xi_3_196.pdf

- Sánchez, G. (2011). *Intoxicación con bromato de potasio*.
<https://baleromedico.files.wordpress.com/2011/01/intoxicacion3b3n-por-bromato-de-potasio.pdf>
- Sánchez, S. (2023). *¿Cómo se produce una mutación genética?* Obtenido de
<https://medicoplus.com/ciencia/mutacion-genetica>
- Sánchez, V., & Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad periodontal. *Revista de La Asociación Dental Mexicana*, 70(6), 298–301.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>
- Santos, A., Grijalba, E., Torres, L., & Uribe, L. (2022). Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad. In *Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad*.
<https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7405125>
- Sarre, A., Stelter, M., Rollo, F., De Bonis, S., Seck, A., Hognon, C., Ravanat, J. L., Monari, A., Dehez, F., Moe, E., & Timmins, J. (2019). The three Endonuclease III variants of *Deinococcus radiodurans* possess distinct and complementary DNA repair activities. *DNA Repair*, 78(March), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.03.014>
- Seeligmüller, N. (1968). *Aislamiento más rápido de PBMC usando Ficoll-Paque® Plus. figura 2, 2–7.*
https://www.eppendorf.com/product-media/doc/es/169514/Eppendorf_Centrifugation_Application-Note_372_Centrifuge-5920-R_Centrifuge-5910-R_Faster-Isolation-PBMC-Ficoll-Paque-Plus-Eppendorf-Multipurpose-Benchtop-Centrifuges-5920-R-5910-R.pdf
- Shukla, R. K. (2018). An introduction to the single cell gel electrophoresis assay: a technique resolving issues in forensic science. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 8(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s41935-017-0035-5>
- Sohn, J., Lee, S. E., & Shim, E. Y. (2023). DNA Damage and Repair in Eye Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijms24043916>

- Stobbe, M. D., Thun, G. A., Docampo, A., Oliva, M., Whalley, J., Raineri, E., & Gut, I. (2019). Recurrent somatic mutations reveal new insights into consequences of mutagenic processes in cancer. *PLoS Computational Biology*, *15*(11), 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007496>
- Tarfut, Y., & Marin, M. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, *13*(2), 95–110. <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v13n2/v13n2a08.pdf>
- TecnoBio. (2020). *El peróxido de hidrógeno, un potente desinfectante*. 1–5. <https://www.tecnobio.es/el-peroxido-de-hidrogeno-como-desinfectante/>
- Thermo Fisher Scientific. (2022). *RPMI 1640 Medium Product Information Sheet*. 1–3.
- Tice, R., & Vasquez, M. (1998). Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, *175*(1995), 184–191. <http://cometassay.com/Tice and Vasques.pdf>
- Toledano, J. F. (2015). *Alteraciones del DNA irradiado con luz ultravioleta*. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/53375/1/5310031324.pdf>
- Valbuena, D. S., Meléndez-Flórez, M. P., Villegas, V. E., Sánchez, M. C., & Rondón-Lagos, M. (2020). Daño celular y genético como determinantes de la toxicidad de los plaguicidas. *Ciencia En Desarrollo*, *11*(2), 25–42. <https://doi.org/10.19053/01217488.v11.n2.2020.11245>
- Venegas, L. (2009). Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana. *Tesis Doctoral*, 223. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3930/lazv1de1.pdf?sequence=1>
- Vergara, A. (2010). *Estandarización del ensayo del cometa alcalino en células de sangre periférica*. *15*(1), 156–179. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8667/tesis619.pdf;jsessionid=4AD2C70C2A711FDDCCA8CCDBE0B4691D?sequence=1>

- Villa Martínez, E. (2018). Efectos de la radiación visible en la estructura del ADN. *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Del Instituto Politecnico Nacional*, 1–56. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2118/SSIT0015553.pdf?sequence=1>
- Wink, D. A., & Laval, J. (1994). The fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 15(10), 2125–2129. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.10.2125>
- Yalçın, E., & Çavuşoğlu, K. (2022). Toxicity assessment of potassium bromate and the remedial role of grape seed extract. *Scientific Reports*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25084-7>
- Yang, Y., Park, S. H., Alford-Zappala, M., Lee, H. W., Li, J., Cunningham, R. P., & Cao, W. (2019). Role of endonuclease III enzymes in uracil repair. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 813, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2018.12.001>
- Yin, D., Xu, Z., Feng, M., Zhao, Z., Chen, D., & Song, L. (2022). Genotoxicity Evaluation of Metformin in Freshwater Planarian *Dugesia japonica* by the Comet Assay and RAPD Analysis. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2822605>
- Zhang, M., Gu, L., Zheng, P., Chen, Z., Dou, X., Qin, Q., & Cai, X. (2020). Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(1), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jcla.23024>
- Zheng, C., Shaposhnikov, S., Collins, A., Brunborg, G., & Oancea, F. (2023). Comparison of comet - based approaches to assess base excision repair. *Archives of Toxicology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03543-y>

7 Anexos

	Positivo				Negativo			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	1,0E+06	1,4E+08	1,9E+09	2,1E+15	1,0E+06	1,3E+06	1,6E+09	1,9E+15
Min	1,2E+02	0,0E+00	1,7E+09	0,0E+00	1,2E+02	0,0E+00	1,4E+06	0,0E+00
Max	1,2E+05	1,3E+02	1,6E+03	2,1E+03	1,0E+03	1,2E+01	1,3E+01	1,6E+00

Anexo 1 Diferencia significativa de las medidas de daño por buffer enzimático

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Prueba t-student de células antes buffer enzimático		
	MCO_Positivo	MCO_Negativo
Media	2,0592E+15	2,0089E+15
Varianza	2,0113E+32	8,8522E+31
Observaciones	100	100
Coeficiente de correlación de Pearson	0,10923487	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	3,55178739	
P(T<=t) una cola	0,00029384	
Valor crítico de t (una cola)	1,66039116	
P(T<=t) dos colas	0,00058769	
Valor crítico de t (dos colas)	1,98421695	

Anexo 2 Evaluación de la diferencia significativa de acción de buffer enzimático por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores, 2023).

	FPG				ENDO III			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	7,5E+15	2,0E+16	6,1E+16	1,5E+15	9,8E+15	1,0E+16	2,0E+16	5,2E+15
Min	5,4E+02	0,0E+00	4,9E-01	0,0E+00	4,3E+02	0,0E+00	2,6E-01	0,0E+00
Max	1,6E+05	4,1E+02	9,8E+15	4,1E+18	4,4E+04	9,0E+01	1,0E+15	9,0E+16

Anexo 3 Diferencias significativas de las medidas de daño en H₂O₂

Elaborado por: (Los autores, 2023).

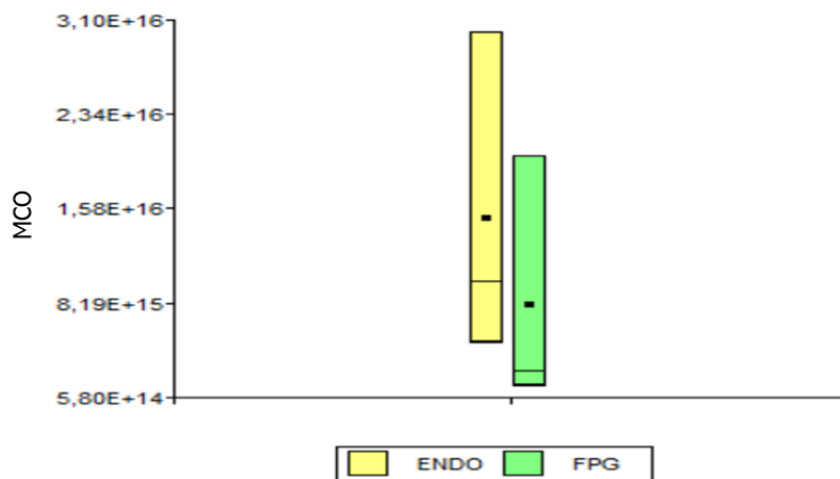
Prueba t-student de H₂O₂ ante las enzimas de reparación

	MCO_FPG	MCO_ENDO
Media	1,62026E+15	5,47621E+15
Varianza	1,00565E+31	1,19366E+32
Observaciones	100	100
Coeficiente de correlación de Pearson	0,080604526	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	-3,465022377	
P(T<=t) una cola	0,000392626	
Valor crítico de t (una cola)	1,660391156	
P(T<=t) dos colas	0,000785252	
Valor crítico de t (dos colas)	1,984216952	

Anexo 4 Evaluación de la diferencia significativa de H₂O₂ ante las enzimas de reparación por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Acción de enzimas de reparación ante peróxido de hidrógeno (H₂O₂)



Anexo 5 Acción de enzimas ENDO III y FPG ante Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ tiene mayor efecto de reparación con la enzima FPG debido a que dicho agente afecta a las purinas.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

	6 min				13 min			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	1,5E+16	1,0E+16	3,1E+16	3,8E+15	2,7E+16	1,3E+16	1,8E+15	8,7E+14
Min	4,2E+02	0,0E+00	1,6E+16	0,0E+00	5,5E+02	0,0E+00	2,0E-03	0,0E+00
Max	2,1E+04	1,2E+02	1,0E+16	1,2E+16	5,4E+04	1,8E+02	9,8E+15	1,7E+16

Anexo 6 Diferencias significativas de las medidas de daño en Luz UV

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Prueba t-student de Luz UV a diferentes tiempos

	<i>MCO_6min</i>	<i>MCO_13min</i>
Media	4,75483E+15	9,88123E+14
Varianza	7,61681E+31	1,15088E+31
Observaciones	100	100
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,001398348	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	4,020815879	
P(T<=t) una cola	5,66648E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1,660391156	
P(T<=t) dos colas	0,00011333	
Valor crítico de t (dos colas)	1,984216952	

Anexo 7 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores,2023).

	6 min				13 min			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	1,5E+16	1,0E+16	2,1E+16	1,3E+15	3,0E+16	4,6E+15	1,8E+16	4,1E+15
Min	4,2E+02	0,0E+00	1,6E+16	0,0E+00	5,0E+02	0,0E+00	2,3E-02	0,0E+00
Max	2,1E+04	1,2E+02	1,0E+15	1,2E+15	8,7E+04	1,9E+02	9,9E+14	1,9E+15

Anexo 8 Diferencias significativas de las medidas de daño por acción de la enzima ENDO III

Elaborado por: (Los autores,2023).

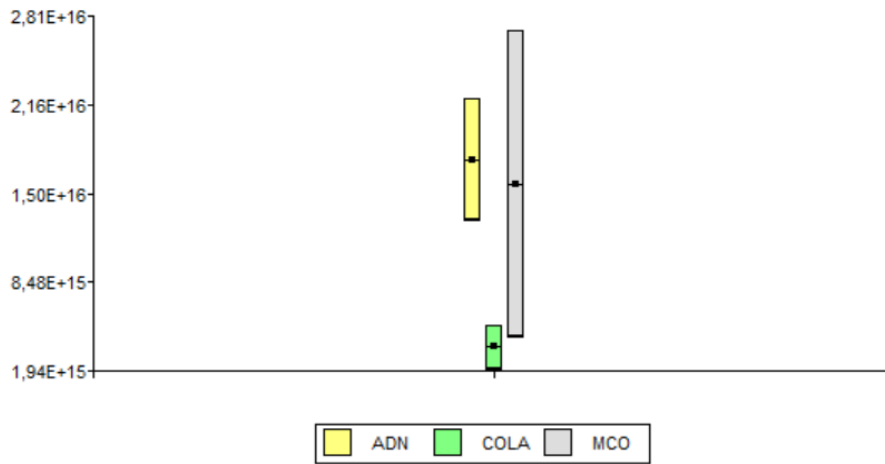
Prueba t-student de Luz UV a diferentes tiempos ante ENDO III

	<i>MCO_6min</i>	<i>MCO_13min</i>
Media	1,25831E+14	4,2959E+15
Varianza	7,41004E+31	1,76848E+32
Observaciones	100	100
Coeficiente de correlación de Pearson	0,000506826	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	-5,232599048	
P(T<=t) una cola	4,68371E-07	
Valor crítico de t (una cola)	1,660391156	
P(T<=t) dos colas	9,36742E-07	
Valor crítico de t (dos colas)	1,984216952	

Anexo 9 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min ante ENDO III por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores,2023).

Acción de enzimas de reparación ante luz ultravioleta (UV)

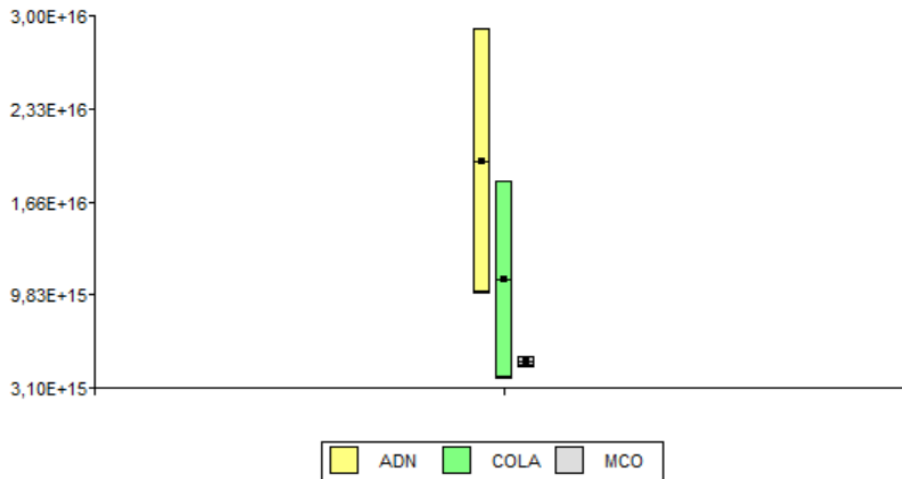


Anexo 10 Porcentaje de ADN y longitud de cola ante exposición a 6 min de Luz UV.

En la gráfica indica que existió una migración corta y menor daño de ADN induciendo las células a 6 minutos a Luz UV.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Acción de enzimas de reparación ante luz ultravioleta (UV)



Anexo 11 Porcentaje de ADN y longitud de cola ante exposición a 13 min de Luz UV.

En la gráfica indica que existió una migración corta y menor daño de ADN induciendo las células a 13 minutos a Luz UV.

Elaborado por: (Los autores, 2023).

	6 min				13 min			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	1,6E+15	3,4E+15	1,3E+15	1,2E+16	1,1E+16	2,4E+15	2,0E+15	1,6E+16
Min	3,8E+03	0,0E+00	5,3E-01	0,0E+00	3,1E+02	0,0E+00	1,3E+16	0,0E+00
Max	3,1E+04	2,5E+02	9,6E+15	2,4E+16	4,0E+04	2,3E+02	1,0E+16	2,3E+16

Anexo 12 Diferencias en las medias de daño por acción de la enzima FPG tras tratamiento de luz UV en diferentes tiempos

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Prueba t-student de Luz UV a diferentes tiempos ante FPG

	MCO_6min	MCO_13min
Media	1,0593E+16	1,7583E+16
Varianza	1,7967E+32	1,7685E+32
Observaciones	100	100
Coefficiente de correlación de Pearson	0,03419266	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	0,0054629	
P(T<=t) una cola	0,49782612	
Valor crítico de t (una cola)	1,66039116	
P(T<=t) dos colas	0,99565225	
Valor crítico de t (dos colas)	1,98421695	

Anexo 13 Evaluación de la diferencia significativa de Luz UV a 6min y 13 min ante FPG por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores, 2023).

	ENDO III				FPG			
	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO	Área de cometa	Longitud de cola (px)	Porcentaje de ADN en cola	MCO
Media	8,8E+14	4,5E+15	6,1E+14	2,7E+16	7,6E+03	3,8E+16	4,7E+15	1,8E+16
Min	4,5E+02	0,0E+00	1,2E+15	0,0E+00	4,5E+02	0,0E+00	1,1E+16	0,0E+00
Max	8,4E+04	3,5E+02	9,9E+15	3,5E+16	5,1E+04	1,4E+02	1,0E+16	1,4E+16

Anexo 14 Diferencias significativas de las medidas de daño en KBrO₃

Elaborado por: (Los autores, 2023).

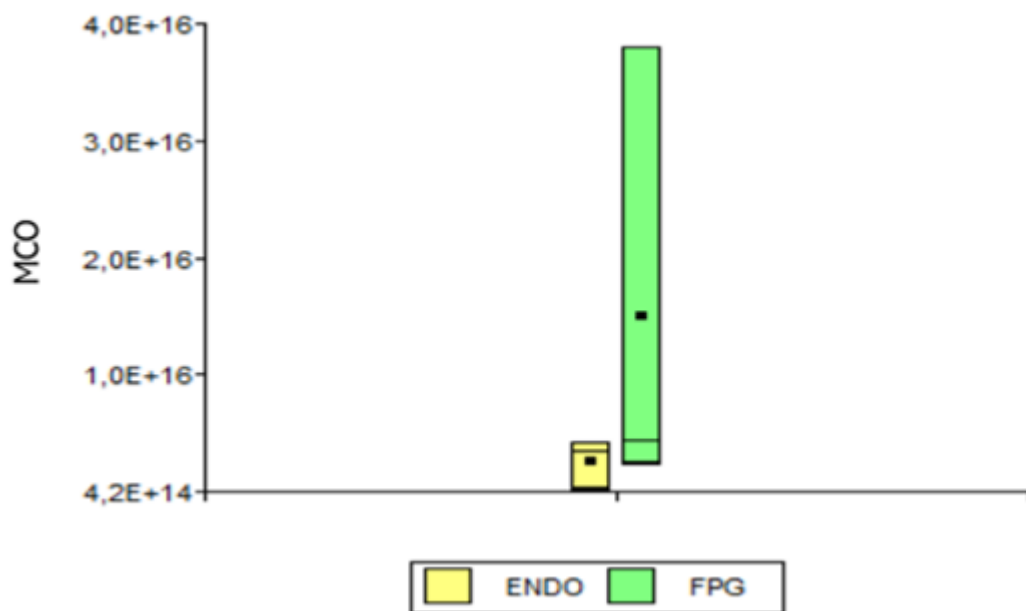
Prueba t-student de KBrO₃ ante las enzimas de reparación

	MCO_ENDO	MCO_FPG
Media	2,8613E+16	1,783E+16
Varianza	2,42134E+32	1,7991E+32
Observaciones	100	100
Coefficiente de correlación de Pearson	0,207487267	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	99	
Estadístico t	1,000166364	
P(T<=t) una cola	0,159834188	
Valor crítico de t (una cola)	1,660391156	
P(T<=t) dos colas	0,319668375	
Valor crítico de t (dos colas)	1,984216952	

Anexo 15 Evaluación de la diferencia significativa de $KBrO_3$ ante las enzimas de reparación por prueba t-student

Elaborado por: (Los autores, 2023).

Acción de las enzimas de reparación ante Bromato de potasio ($KBrO_3$)



Anexo 16 Acción de enzimas ENDO III y FPG ante Bromato de potasio ($KBrO_3$)

El $KBrO_3$ tiene mayor efecto de reparación con la enzima FPG debido a que dicho agente afecta a las purinas.

Elaborado por: (Los autores, 2023).