

Ensayo de RAPD como marcador de genotoxicidad en humanos

Rosso, E.¹; Simoniello, M. F.²; Kleinsorge, E. C.²; Scagnetti, J. A.²; Grigolato, R.²

1- Cát. de Biología Celular y Molecular.

2- Cát. de Toxicología y Bioquímica Legal

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. CC 242. (3000) Santa Fe.

RESUMEN : El principal objetivo de esta investigación fue detectar posibles mutaciones en población expuesta a genotóxicos por largo tiempo. El empleo de marcadores microsatélites es una metodología promisoriosa por su alta sensibilidad. La técnica usada RAPD PCR (*random amplified polymorphic DNA PCR*), implica una combinación de PCR en gel de agarosa y posterior revelado con bromuro de etidio, empleando cebadores arbitrarios.

El estudio consistió en la extracción de ADN de trios madre-padre-hijo con malformación congénita mayor del Sistema Nervioso (Defecto del Tubo Neural) en una población altamente expuesta a sustancias químicas comparadas con un trió control (sin malformación y no expuesto). Inicialmente fueron utilizados veinte cebadores para encontrar patrones de bandas polimórficas. De éstos, 16 fueron seleccionados para producir dicho patrón. Identificamos un total de 78 bandas individuales para los 16 cebadores. Una de estas 78 bandas fue polimórfica en madre e hijo de un trió expuesto. La identificación de los marcadores de RAPD con correlación directa a los agentes contaminantes podría ser una herramienta valiosa, aunque no provee respuestas claras por sí sola.

Palabras Clave: RAPD / malformación congénita/ genotoxicidad

SUMMARY: RAPD assay as human genotoxicity marker. Rosso, E.; Simoniello, M. F.; Kleinsorge, E. C.; Scagnetti, J. A.; Grigolato, R.. The main objective of this research was to detect mutations in population exposed to genotoxic substances for a long time. Microsatellite markers is a promissory technique due to its high sensitivity. The technique used was RAPD PCR (*random amplified polymorphic DNA PCR*). This method implies a combination of PCR, electrophoresis in agarose gel and staining with ethidium bromide, using arbitrary primers.

The study involves DNA extraction of mother-father-son trios with congenital major malformation of Nervous System (Neural Tube Defect) in a population highly exposed to chemical substances compared to a control trio (without malformation and not exposed). Twenty different primers were initially used to screen polymorphic banding patterns. Of these, 16 were found to produce a polymorphic banding pattern. We scored a total of 78 individual bands for all 16 primers. One of these 78 bands was polymorphic in mother and son of one trio exposed. Identification of RAPD markers with direct correlation to exposure to particular pollutants could be a valuable research tool, although it does not provide clear answers by itself.

Key words: RAPD / congenital malformation/genotoxicity.

* Correspondencia:

E-mail: ekaczan@fbc.unl.edu.ar

Introducción

Ciertos agentes químicos ambientales pueden causar malformaciones congénitas por acción teratogénica y/o mutagénica. Ello depende del periodo crítico al momento de la exposición, de la susceptibilidad a dicho agente (tanto de especie como de genotipo) y de la dosis de exposición.

En general la acción mutágena es preconcepcional (materna o paterna) o acción teratogénica postconcepcional (materna). Los efectos preconcepcionales pueden incluir anomalías y síndromes cromosómicos como resultado de nuevas mutaciones. La acción postconcepcional se puede asumir que generalmente sucede durante el primer trimestre del embarazo, cuando se produce la etapa principal de organogénesis, aunque las exposiciones relevantes pudieron haber ocurrido antes si sus efectos son indirectos (por ejemplo, los efectos sobre la función endócrina) o si el producto químico tiene una larga vida media biológica (por ejemplo, PCBs).

Se ha estimado que las malformaciones congénitas debidas a interacciones entre tendencias hereditarias y usualmente indefinidos factores no genéticos, representan el 20 % de todas las malformaciones en nacidos vivos, en tanto que un 5,5 % están asociadas a factores ambientales discretos; sin causas identificadas un 61 % y el 13,5 % corresponde a las malformaciones génicas y cromosómicas (1). Recientemente, empleando la misma selección de factores etiológicos, se realizó una reevaluación de esta clasificación (2). Las principales conclusiones indicaron que, en tanto aumentan las malformaciones multifactoriales poligénicas (48,8 %), disminuyen considerablemente las de causas desconocidas (33,6 %), debido a la aplicación de nuevas técnicas de detección precoz y conceptos de procreación.

El análisis genético de la población ofrece herramientas poderosas para evaluar los efectos de los agentes químicos ambientales, ya que examinan la diversidad genética de la población normal, infieren sobre su historia reciente y pueden predecir futuras direcciones (aunque su valor predictivo debe ser considerado con precaución).

Originalmente para estudiar los efectos genéticos de tóxicos sobre población expuesta fueron empleados marcadores proteicos (aloenzimas), pero en la actualidad hay una gran variedad de mar-

cadoreo/técnicas ADN disponibles para este fin (3). El ensayo clásico de PCR revolucionó el campo de la biología molecular, siendo actualmente utilizado para una gran variedad de propósitos.

A pesar de las ventajas del uso de ensayos basados en la PCR tradicional para la detección de alteraciones en el ADN, existen complicaciones a la hora de utilizar la misma para la detección de mutaciones. Una de ellas es que para el diseño de los cebadores se deben conocer las regiones "upstream" (corriente arriba) y "downstream" (corriente abajo) de la secuencia a estudiar.

Tal desventaja puede eliminarse utilizando una variante de la PCR, la técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), en la que se utilizan cebadores cortos de secuencia nucleotídica arbitraria, es decir que para su síntesis no se tuvo en cuenta ninguna secuencia de ADN en especial (4)(5). Los diferentes modelos se producen cuando las regiones genómicas varían para la presencia/ausencia de los sitios de *hibridación* (sitios complementarios al cebador). La amplificación de los productos es analizada por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida.

El grado de variabilidad observado para muchos cebadores sugiere que la técnica puede ser usada en ecología y ecotoxicología para múltiples fines, incluyendo identificación individual, análisis de paternidad, análisis filogenéticos (6)(7).

El ADN genómico generado a partir de dos individuos produce diferentes fragmentos de amplificación. Un fragmento en particular puede ser generado por uno de los individuos pero no representa al otro, por lo tanto puede ser empleado como marcador genético. Estos marcadores se heredan en forma Mendeliana. En estudios de mapeos, la segregación de estos marcadores a la progenie por cruzamiento sexual puede ser usada para estructurar un mapeo genético.

En el presente trabajo hemos aplicado la técnica de RAPD para estudiar posibles polimorfismos genéticos que sirvieran como biomarcadores de malformaciones congénitas entre individuos de familias no relacionadas, tratando de determinar si tales rasgos eran transmitidos por herencia mendeliana. Los casos son tríos: padre, madre y un hijo con malformación mayor del SNC (Defectos del Tubo Neural: Q05 o Q07 del ICD10) (8). Estos casos

se gestaron y nacieron en la ciudad de Esperanza (Santa Fe, Argentina) en la que se ha comprobado alta contaminación ambiental urbana por las actividades industriales. En dicha ciudad opera, desde hace cien años, una tannería de cueros y en las últimas décadas ha tenido un gran crecimiento industrial a expensas de la industria del mueble. En estudios previos se determinaron como contaminantes críticos al cromo, los solventes y distintos gases(9)(10)(11).

Materiales y Métodos

Toma de muestras y control positivo

La población en estudio estuvo conformada por los tríos (padre-madre-hijo) cuyos hijos fueron gestados y nacieron en la ciudad de Esperanza (Santa Fe, Argentina) entre los años 1980-2000, con defectos del tubo neural. De los 8 casos registrados para el período, solo quedaron incluidos aquellos que dieron consentimiento a la toma de muestra. De ellos se obtuvo sangre entera por punción venosa utilizando como anticoagulante EDTA (a los fines de no inhibir la acción de la enzima *Taq* polimerasa) y se conservaron a -20°C .

Para estandarizar el proceso de PCR se utilizó ADN de alto peso molecular proveniente de la línea celular K562 (Promega DD208A). Para los estudios de segregación alélica se utilizó como control un trío padre-madre-hijo, sano, no expuesto.

Aislamiento y purificación de ADN

Para la extracción de ADN se adaptó la técnica modificada por Murray-Thompson (12).

Se colocó 500 μl de sangre entera obtenida con EDTA en un tubo limpio y 3 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (buffer TE: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). El sobrenadante fue eliminado y se realizaron 2 lavados más. Posteriormente se procedió a obtener el ADN mediante el agregado de 3 ml de solución de digestión (CTAB 2 % p/v [bromuro de cetil trimetil amonio Sigma Cat. N^oH-5882], 1,4 M NaCl, 0,2 % p/v 2-Mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 7,5. Luego de homogeneizar se llevó a baño termostático de 60°C por 3 horas, mezclando cada 15 minutos. Posteriormente los tubos se llevaron a temperatura ambiente. Igual volumen de cloroformo fue agregado, se homogeneizó y centrifugó a 4000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se

colocó en otro tubo. El procedimiento fue repetido dos veces más.

Al último sobrenadante, se le adicionaron 2 ml de alcohol isopropílico para que precipite el ADN. Se procedió a homogeneizarlo y llevarlo a -20°C por 15 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm. El alcohol fue descartado, se secaron los bordes del tubo y eliminó el exceso de alcohol sin dejar que se reseque el pellet obtenido.

Se agregó 1 ml de agua bidestilada estéril, hasta que se hidrató y posteriormente se conservó a -20°C .

Las muestras se cuantificaron por medio de lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm respectivamente, y en geles de agarosa al 2 %, en comparación con bandas proporcionadas por el marcador K562 de concentración conocida, para evaluar cantidad y calidad del material obtenido. Con los valores de concentración calculados, se procedió a efectuar diluciones de las mismas para alcanzar una concentración de trabajo de 50 ng/ml. El resto de las muestras de ADN fueron alícuotadas y freezadas a -20°C para su conservación.

Evaluación del polimorfismo mediante cebadores arbitrarios

Para determinar las condiciones óptimas de reacción se procedió a realizar ampliificaciones con distintas concentraciones de ADN y MgCl_2 . Se demostró que con una concentración de 50 ng/ μl de ADN, combinada con 2,5 mM de MgCl_2 , se puede obtener una mayor cantidad de fragmentos de ADN visibles. Todas las corridas se realizaron por duplicado para comprobar las variaciones intra e interexperimento.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μl , conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl_2 , 0,01 % Gelatina, 100 μM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0,2 μM del cebador seleccionado, 50 ng de ADN genómico y 1,25 unidades de la enzima *Taq* polimerasa, en Termociclador (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research). Las ampliificaciones se realizaron con el siguiente programa de ciclado: 45 ciclos de 1 minuto a 94°C , 1 minuto a 36°C y 2 minutos a 72°C , con una extensión final de 10 minutos a 72°C (4).

Se analizaron 10 cebadores de la serie A y 10 de la serie B de Promega para RAPD (N^o Cat B050-10 y B051-10), utilizando para tal fin un trío de mues-

tras de una familia al azar. Luego se seleccionaron los que demostraron amplificar un número de bandas intermedio cuyo peso molecular oscile entre 100 pb y 1000 pb. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2 % en buffer TBE 0,5 % a 60 mA constantes durante 2 horas. Para la asignación del tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizaron ladders (marcadores de peso molecular) de ADN de 50 bp, 100 bp y pGEM DNA Markers (20 ng/ μ l) de Promega Corp.

En cada amplificación se agregó a las muestras a analizar un tubo que contenía ADN K562 (control positivo) y un tubo (control negativo) al que se le agregaba agua bidestilada estéril en reemplazo del ADN para evaluar posibles contaminaciones.

Los resultados se documentaron mediante fotografía de los geles bajo transiluminador de luz UV.

Resultados

La técnica de extracción de ADN resultó ser adecuada a los fines de este estudio, comprobándose

se que los extractos obtenidos eran de alto peso molecular, no presentaban signos de degradación al ser corridos en los geles de agarosa y amplificaron todos sin excepción.

Los resultados fueron variables en lo que respecta al número de fragmentos obtenidos, teniendo en cuenta aquellos que tenían entre 100 pb – 1000 pb y cuya intensidad era mayor, dejándose de lado aquellos que eran poco visibles, considerados "indeterminados" (Tabla 1).

Inicialmente fueron utilizados veinte cebadores para encontrar patrones de bandas polimórficas. De estos, 16 fueron seleccionados para producir dicho patrón. Identificamos un total de 78 bandas individuales para los 16 cebadores.

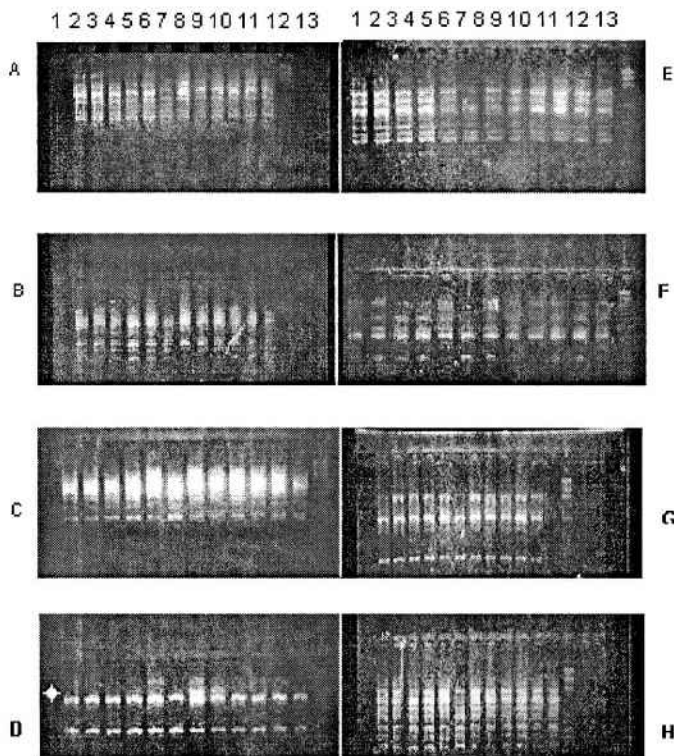
La corrida de las muestras amplificadas con el cebador **A04**, mostró en un trío la presencia de una banda compartida por madre e hijo, hallándose ausente en el resto de los individuos (Figura 1). No se observaron diferencias entre los patrones de bandas entre los individuos con los cebadores restantes.

Tabla 1: Nombre del cebador, secuencia nucleotídica y número de fragmentos significativos de los cebadores usados para el análisis de RAPD.

cebador	Secuencia	Nº de fragmentos amplificados
A01	CCC AAG GTC C	5
A02	GGT GCG GGA A	4
A03	AAG ACC CCT C	4
A04	CTT CAC CCG A	2-3
A05	CAC CAG GTG A	8
A06	GAG TCT CAG G	*
A07	CCC GAT TCG G	*
A08	ACG CAC AAC C	*
A09	CTA ATG CCG T	7
A10	ACG GCG TAT G	5
B01	TCG AAG TCC T	3
B02	GCA TGT CAG A	3
B03	ACT TCG ACA A	4
B04	TCG CAT CAG T	4
B05	GCG CTC ACG C	5
B06	GTG ACA TGC C	6
B07	AGA TCG AGC C	5
B08	TCA CCA CGG T	5
B09	ATG GCT CAG C	*
B10	CAG GCA CTA G	7

*: indeterminados.

Figura 1: Patrones de amplificación de integrantes de 4 familias, de las 7 que compusieron el estudio, ordenados: M-H-P, de los 16 cebadores seleccionados se observa la imagen de (A) A01, (B) A02, (C) A03, (D) A04, (E) A05, (F), A09, (G) A10, (H) B10. Se indica con una cruz blanca la banda encontrada sólo en 2 integrantes de un trío: madre e hijo, en las calles 7 y 8 respectivamente; la calle 13 corresponde al marcador de pesos moleculares pGEM DNA Markers de Promega.



Discusión

Las principales ventajas de utilizar RAPD consisten en la rapidez de la aplicabilidad de dicha técnica para el estudio en cualquier organismo sin conocer información previa de secuencia nucleotídica y sobre todo en la potencial detección de mutaciones y daño a nivel de ADN (13). Sin embargo, los ensayos de RAPD sólo proveen resultados cualitativos, por lo que la naturaleza y el grado de las alteraciones son especulativos, debiéndose analizar por otras metodologías los perfiles genéticos que se atribu-

yan a tales alteraciones (por ejemplo: clonado de las bandas discordantes, secuenciación, etc.)(14).

La metodología aplicada en este estudio permitió lograr amplificadas reproducibles y constantes bajo las condiciones estandarizadas. Esto corrobora experiencias de otros investigadores que plantean que si las condiciones de reacción de la PCR son rígidamente estandarizadas y mantenidas constantes durante las sucesivas pruebas, los resultados obtenidos son altamente reproducibles (15).

De los 20 cebadores que utilizamos, 16 arrojaron resultados satisfactorios para ser analizados mediante la sola observación visual de las bandas

obtenidas. El cebador **A04** presentó un patrón diferencial en un par de individuos (madre-hijo) de uno de los tríos. Debemos considerar que el ensayo de RAPD puede detectar mutaciones cuando estas alcanzan al menos el 2 % del ADN estudiado y a su vez depende del grado de exposición al que esté sometido (16). Si las alteraciones genómicas inducidas por genotóxicos ambientales son menores en frecuencia, entonces el ensayo de RAPD podría no ser sensible para la detección de posibles transmisores de la mutación (17). Los resultados hasta ahora obtenidos en esta investigación demuestran ser preparatorios para nuevos estudios que involucren cambios en las condiciones de esta técnica y su complementariedad con otras técnicas que permitan detectar la mutación buscada.

La técnica de RAPD fue empleada para hallar mutaciones de novo en familias provenientes de Chernobyl que estuvieron expuestas a bajos niveles de radiación. Se emplearon 100 cebadores de 400 testeados en 13 familias expuestas, obteniendo 3270 segmentos polimórficos amplificados. Estas investigaciones encontraron nuevas bandas en niños nacidos después del accidente nuclear y también en niños de las tres familias control (18). Considerando estos resultados, nos planteamos la importancia de aumentar la cantidad de cebadores ya que los fragmentos amplificados pueden ser obtenidos de distintas regiones del genoma, tanto codificantes como no codificantes, por lo que frecuentemente no se puede asociar, de manera determinante, un patrón de bandas con un cierto tipo de daño.

El empleo de geles de agarosa al 2 % reveló ser de gran practicidad para instrumentar esta metodología en laboratorios de mediana complejidad. Para aumentar su resolución se considera, en una siguiente etapa, emplear geles de poliacrilamida al 4 % en condiciones desnaturizantes.

Conclusiones

La técnica de RAPD aún no es muy empleada en el análisis genómico de humanos y mamíferos. En las exposiciones medioambientales a genotóxicos, las dosis de los agentes químicos, por lo general, son muy bajas y por tanto es difícil demostrar que esas exposiciones causen cambios heredables.

La comparación de los perfiles genéticos obtenidos mediante la técnica de RAPD, permite concluir que sólo se observa variabilidad en uno de los tríos estudiados con los cebadores seleccionados para tal fin. Las secuencias obtenidas de los cebadores utilizados no detectaron variaciones significativas en el resto de la población en estudio. Considerando el tamaño de la población analizada y el resultado hallado, se puede decir que la técnica de RAPD podría ser de aplicación práctica en la detección de marcadores que pongan en evidencia daños a nivel del ADN en individuos expuestos a genotóxicos. Es sabido que las mutaciones pueden deberse a simples cambios de bases en la secuencia de un gen o a pérdidas de fragmentos mayores. La sustitución de una base en la secuencia del cebador podría ser un artificio válido para la detección de variabilidad genética, pero para ello se deberían sintetizar nuevos cebadores modificando una base por vez.

El uso de geles de poliacrilamida podría incrementar el poder de resolución de los fragmentos obtenidos y de esa forma, revelar patrones diferenciales con el mismo set de cebadores empleados. Además el empleo de nuevos cebadores o combinaciones de ellos, posiblemente permitirían hallar fragmentos a los cuales asociar la aparición de anomalías congénitas.

El uso de RAPD es una herramienta muy útil para ensayos preeliminares en la determinación de la estructura genética de poblaciones naturales, pero no provee respuestas claras por sí sola, sino que exige una investigación más profunda de las bandas nuevas o más frecuentemente expresadas, mediante técnicas de clonado y secuenciación de las mismas para luego tratar de identificar las regiones detectadas.

Bibliografía

1. Kalter, H., Warkany, J., 1983. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (two parts). *N. Eng J. Med.* **308** (8): 424-31; **308** (9): 491-7. [Pubmed]
2. Rösch, C., Steinbicker, V., 2002. Congenital Malformation Center Magdeburg, Germany. En: www.icbd.org/document/Ar/189_215.pdf
3. Mullis, K.B., Faloona, F., 1987. *Meth. Enzymol.*: 155:335.
4. Williams, J.G.K., Kubelic, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary

- primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535
5. Williams, J.G.K., Reiter, R.S., Young, R.M., Scolnik, P.A., 1993. Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD. *Nucleic Acids Res.* **21** (11): 2697-2702.
6. Léry, X., La Rue, B., Cossette, J., Charpentier, G., 2003. Characterization and authentication of insect cell lines using RAPD markers. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**: 1035-1041.
7. Loeffler, W., Morden, C., 2003. "Genetic diversity and biogeography of the Hawaiian cordage plant, aloná (*Touchardia latifolia*, *Urticaceae*); based on RAPD markers. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**: 1323-1335.
8. WHO ICD 10. 2003. En: www3.who.int/icd/vol1htm2003/fr-icd.htm
9. Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable (SEMAyDS) de la Provincia de Santa Fe. Primer Estudio Ambiental de la Ciudad de Esperanza, Departamento las Colonias. 2001. Informe Oficial: 1-118.
10. Kleinsorge, E., Rocco, D., Grigolato, R., Simoniello, M.F., Castoldi, F., Altahaus, M., Melano, M., 2001. Epidemiología de Malformaciones Congénitas en Esperanza (Santa Fe, Argentina). Informe PNS-CAID (1998-2000). UNL.
11. Paris, M., Tujchneider, O.C., Délia, M., Perez, M., Fili, M., 1998. Estudio de la interacción entre el sistema hídrico subterráneo y las actividades industriales de la Ciudad de Esperanza (Prov. Santa Fe, Argentina). Primera Fase. En: Anales de XVII Congreso Nacional del Agua. II Simposio de Recursos Hídricos del Cono Sur. BRH Digital. Tomo 3: 80-89.
12. Murray, M.G, Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8** (19): 4321-4325
13. De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T., 2004. The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research* **566**: 249-262.
14. Benter, T., Papadopoulos, S., Pape, M., Manns, M., Poliwoda, H., 1995. Optimization and Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA in Human. *Analytical Biochemistry*, **230** (1): 92-100
15. Atienzar, F. A., Venier, P., Jha, A., Depledge, M., 2002. Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research* **521**:151-163
16. Jones, C., Kortenkamp, A., 2000. RAPD library fingerprinting of bacterial and human DNA: application in mutation detection. *Teratogen, Carcinogen, Mutagen.* **20**: 49-63.
17. Theodorakis, C.W., 2001. Integration of genotoxic and population genetic endpoints in biomonitoring and risk assessment. *Ecotoxicology* **10**: 245-256.
18. Weinberg, H., Nevo, E., Korol, A., Fahima, T., Rennert, G., Shapiro, S., 1997. Molecular changes in the offspring of liquidators who emigrated to Israel from the Chernobyl Disaster Area. *Env. Health Perspectives*, **105**, Suppl.6: 1479-1481.