

2011 Octubre, 2(3): 1-1

OPTIMIZACION DEL ENSAYO COMETA MEDIANTE LA UTILIZACION DE MICROGELES UNICOS

Crespo, R¹; M, Ricard²; García de Bravo M¹ y Güerci A³

¹INIBIOLP (UNLP-CONICET CCT La Plata) Fac. de Cs. Médicas. La Plata.

²Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Facultad de Biociencias. Laboratorio de Mutagénesis.

³CONICET-IGEVET. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

E-mail: albaguerci@fisica.unlp.edu.ar

Introducción

Dentro de las metodologías utilizadas en el ámbito de la Genética Toxicológica el *Ensayo Cometa* es reconocido por su sensibilidad, simpleza, rapidez y bajo costo. Es ampliamente utilizado para evaluar el daño genotóxico inducido por distintos agentes, y su atención en mutagénesis y biomonitoreo ambiental parece incrementarse con el desarrollo de las continuas mejoras que se van implementando. No obstante, uno de los puntos críticos es la no uniformidad de la electroforesis que aporta variabilidad a los resultados y también por la preparación de los microgeles respectivos. Se propone un nuevo protocolo como alternativa sencilla y económica a las presentes en punta. El diseño reside en ubicar la totalidad de las muestras del experimento en *un* solo gel de manera de compensar la utilización de materiales costosos (gel bond) y la preparación de geles individuales para cada punto. De esta manera, todas las muestras son sembradas dentro del mismo soporte y por ende se evitan las heterogeneidades consecuentes que pueden ser importantes al momento de interpretar los resultados considerando la sensibilidad extrema de la técnica y la variabilidad intrínseca del procedimiento electroforético.

Objetivos

Optimización de la versión alcalina del *Ensayo de Electroforesis de Células Aisladas* (COMETA) mediante la utilización de geles únicos.

Materiales y Métodos

El diseño fue implementado sobre diferentes líneas celulares utilizadas frecuentemente en el área de Genética Toxicología (CHO-K1; A549; HepG2 y Jurkat). Se realizó la versión alcalina de la técnica de acuerdo al método de Singh y colaboradores (1988) con las modificaciones en la preparación de los geles aludidas previamente en la Introducción. Mediante 5 entradas experimentales se ajustaron los siguientes parámetros: 1) Volumen de siembra (entre 10 y 25 μ l); 2) Número de puntos por gel (entre 2 y 8), número de células por punto (entre 500 y 10000 células) y relación volumen de suspensión celular/agarosa bajo punto de fusión (ABPF) (1/3, 1/4, 1/5). Los preparados fueron teñidos con Sybr Green I y/o DAPI y fueron analizados con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes fueron jerarquizadas en 6 categorías y clasificadas según su grado de daño en: 0 (sin daño), 1 (daño muy leve), 2 (daño leve); 3 (daño severo), 4 (daño muy severo) y células muertas (apoptóticas y necróticas). En segunda instancia se realizó la validación del método, ratificando los resultados obtenidos en células tratadas con un agente químico, inductor de daño genético, y sus respectivos controles, en la versión propuesta de la técnica con la versión convencional. El tratamiento estadístico se realizó según el test t-student.

Resultados

El mejor diseño se obtuvo con un total de 8 puntos por portaobjeto, dispuestos en dos hileras de 4 puntos cada una. El volumen óptimo de siembra fue de 16 μ l finales con 1000 células por punto y respetando la relación 1:4 (volumen de suspensión celular/ABPF). De esta manera se logró la individualización de puntos adyacentes y la no superposición de cometas dentro de los campos de observación. La versión propuesta fue validada estadísticamente ya que no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ambos procedimientos.

2011 Octubre, 2(3): 2-2

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que desde una perspectiva estricta de la exigencia experimental el protocolo propuesto permitiría eliminar la variabilidad intergeles, que contribuye muchas veces de manera sustancial a la falta de homogeneidad efectiva entre los diferentes puntos del diseño experimental. De esta manera se lograría la optimización de la técnica a través de variables no consideradas hasta el momento y de suma importancia para la eficacia de la técnica.