
ARTÍCULOS ORIGINALES

Daño al ADN y capacidad de reparación en pacientes con hiperlipoproteinemias primarias.

DNA damage and repair capacity in patients with primary hyperlipoproteinemias.

Nayade Pereira Roche,^I Reinaldo Gutiérrez Gutiérrez,^{II} Alfredo Nasiff Hadad,^{III} Judith Pupo Balboa,^{IV} Gretel Riverón Forment,^V Anamarys Pandolfi Blanco.^{VI}

Resumen

Los trastornos del metabolismo de los lípidos están relacionados de forma directa con la aterogénesis y los de causa genética constituyen un grupo de importancia por su alta prevalencia y su difícil manejo terapéutico. Existen evidencias de la participación del estrés oxidativo tanto en los mecanismos de angiogénesis y remodelación vascular; así como en el daño directo sobre las estructuras vasculares durante la aterogénesis. El objetivo de este estudio fue determinar el daño basal y oxidativo en el ADN y su capacidad de reparación ante el daño inducido por un agente oxidante, en un grupo de pacientes con hiperlipoproteinemias primarias. Se estudiaron 6 pacientes procedentes de la clínica de lípidos del Hospital Hermanos Ameijeiras con diagnóstico de hiperlipoproteinemias de causa genética. Se utilizó el ensayo Cometa alcalino para la evaluación del daño basal al ADN, el daño oxidativo y la capacidad de reparación al daño inducido por peróxido de hidrógeno a través de estudios cinéticos. No hubo diferencias en el daño basal y el daño oxidativo al ADN entre pacientes y controles. Los pacientes presentaron menor capacidad de reparación al ADN que los controles. El 75 % de los pacientes con hipercolesterolemia familiar presentó baja capacidad de reparación con valores por debajo del 25 percentil. Todos los pacientes con dislipidemia mixta se consideran reparadores normales. Los trastornos en los mecanismos de reparación podrían estar relacionados con la evolución clínica y la severidad de las complicaciones en los pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Palabras clave: Daño al ADN, Reparación del ADN, Ensayo cometa, Hiperlipoproteinemias.

Abstract

Lipids metabolism disorders are directly related to atherogenesis and those with genetic causes constitute an important group due to their high prevalence and difficult therapeutic treatment. There exist evidences regarding the participation of oxidative stress in angiogenesis and vascular remodeling, as well as in the direct damage caused to vascular structures during atherogenesis. The aim of this study was to determine the basal and oxidative DNA damage and its repair capacity in the presence of an oxidizing agent, in a group of patients having primary hyperlipoproteinemias. Six patients from the Hermanos Ameijeiras Hospital Lipids Clinic diagnosed as having genetic cause hyperlipoproteinemia were studied. The alkaline Comet assay was used to evaluate the basal DNA damage; the oxidative damage and the repair damage capacity induced by hydrogen peroxide were evaluated through kinetic studies. No differences were found in DNA basal and oxidative damage between patients and controls. Patients showed less DNA repair capacity than controls. Among patients having familial hypercholesterolemia 75 % of them had low repair capacity with values below 25 percentile. All patients having mixed dyslipidemia were considered to be normal repairers. Disorders in repair mechanisms might be related to the clinical evolution and severity of complications in patients having familial hypercholesterolemia.

Keywords: DNA damage, DNA repair, Comet assay, hyperlipoproteinemia.

^I Máster en Ciencias en Investigación en Aterosclerosis. Doctora en Medicina. Especialista de I y II Grado en Bioquímica Clínica. Profesor Asistente. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: nayade.pereira@infomed.sld.cu.

^{II} Máster en Ciencias en Genética Médica. Licenciado en Ciencias Farmacéuticas. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica La Habana. Cuba. E-mail: rey@infomed.sld.cu.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares, y sus consecuencias, constituyen la primera causa de morbi-mortalidad en los países desarrollados y en gran parte de los países en vías de desarrollo. En Cuba, junto al cáncer, constituye un importante problema de salud por el alto número de defunciones anuales, la invalidez que dejan sus secuelas y la cantidad de años potencialmente perdidos que ocasiona.

La aterosclerosis constituye un elemento común presente en todas las enfermedades cardio y cerebrovasculares, las que comparten similares factores de riesgo como la obesidad, el sedentarismo, el hábito de fumar y los trastornos en el metabolismo de los lípidos, entre otros.

Existen varios criterios para la clasificación de los trastornos del metabolismo de los lípidos, dislipidemias o hiperlipoproteinemias. De acuerdo al tipo de lípido que se encuentra elevado en el plasma se clasifican en hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y dislipidemia mixta. Todas pueden ser clasificadas como dislipidemias primarias cuando la causa es genética o secundaria cuando las alteraciones del metabolismo lipídico es producido por factores ambientales o la presencia de otra enfermedad de base.¹

Las hiperlipoproteinemias primarias constituyen un grupo heterogéneo de anomalías que le provocan al paciente un elevado riesgo cardiovascular. La hipercolesterolemia familiar (HF) es un trastorno autosómico dominante con afectación del gen del receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que resulta en la elevación plasmática del colesterol LDL (LDLc) con niveles normales de triglicéridos. Posee una incidencia de 1 en 400-500 personas para la forma heterocigótica.^{1,2}

Varios autores han reportado estudios en modelos animales y en humanos en los que se evidencia la existencia de condiciones de estrés oxidativo en las hiperlipoproteinemias y fundamentalmente en la HF.^{3,4}

El estrés oxidativo (EO) se ha definido más recientemente como la afectación de las vías de señalización controladas por el estado redox celular como consecuencia del aumento de las especies reactivas del oxígeno (ERO).⁵ Esta condición forma parte de una de las principales hipótesis de la aterosclerosis.⁶

El aumento en la producción de ERO provoca daño a las moléculas celulares y dentro de estas al material genético (ADN nuclear y mitocondrial y ARNs). El daño inducido por ERO ocasiona inestabilidad genómica con afectación de la función vascular, la detención del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia vascular prematura.⁷ Se reconocen más de 30 modificaciones diferentes al ADN inducido por EO, pero la más estudiada es la formación de la 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua).^{8,9}

Se ha reportado por varios investigadores la asociación de alteraciones en los mecanismos de reparación del ADN con aumento de la presión arterial, rigidez vascular y baja actividad de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial con deficiencia en el funcionamiento de las células musculares lisas vasculares.¹⁰

El objetivo del presente trabajo es determinar el daño basal y oxidativo en el ADN de pacientes con hiperlipoproteinemias primarias y la capacidad de reparación del ADN frente a un daño inducido por un agente oxidante.

Métodos

Diseño del estudio y selección de pacientes:

Se realizó un estudio observacional analítico de casos y controles con selección de todos los pacientes que acudieron a la Clínica de Lípidos del Hospital Hermanos Ameijeiras (HHA) durante el año 2010, con diagnóstico clínico y bioquímico de hiperlipoproteinemia primaria sin otras enfermedades crónicas no transmisibles concomitantes, sin ingestión de medicamentos o suplementos nutricionales con efectos antioxidantes ni pro-oxidantes reconocidos, ni hábitos tóxicos.

^{III} Doctor en Ciencias Médicas. Doctor en Medicina. Especialista de I y II Grado en Medicina Interna. Profesor Titular. Investigador Titular. Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras. La Habana. Cuba. E-mail: nasiff@infomed.sld.cu.

^{IV} Doctora en Ciencias Médicas. Doctora en Medicina. Especialista de I Grado en Bioquímica Clínica. Investigador Agregado. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: judith.pupo@infomed.sld.cu.

^V Máster en Ciencias en Bioquímica. Licenciada en Bioquímica. Profesor Instructor. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: gretel.riveron@infomed.sld.cu

^{VI} Licenciada en Tecnología de la Salud. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba. E-mail: anamarys.pandolfi@infomed.sld.cu.

Los controles se seleccionaron de forma pareada 2:1 con relación a los casos, de acuerdo a sexo y edad. Estos fueron previamente interrogados y se les realizó un examen físico y estudios de laboratorio clínico para descartar la presencia de otras enfermedades relacionadas con el EO. Se constató la no utilización de suplementos antioxidantes y la ausencia de hábitos tóxicos.

Todos los participantes fueron incluidos luego de emitir voluntariamente su consentimiento, siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2008. El protocolo de esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM).

Se utilizó como muestra biológica sangre venosa sistémica. La extracción se realizó en ayunas, mediante punción venosa, en el laboratorio clínico del HHA. Se extrajeron 5 mL de sangre, en un tubo heparinizado para la realización de los ensayos de genotoxicidad.

Determinación del daño basal al ADN:

Se obtuvieron los linfocitos periféricos a partir de la técnica de centrifugación bajo gradiente de densidad. Se cuantificó la supervivencia celular a partir de la exclusión del colorante azul de tripano y se obtuvo una concentración celular de 1×10^6 cells/mL para la realización de los ensayos.

Se utilizó el ensayo Cometa Alcalino descrito por Singh y colaboradores¹¹ en el que se fijan las células en un soporte de agarosa sobre una lámina portaobjeto (dos láminas por cada condición experimental), se sumergen en buffer de lisis celular y posteriormente de desnaturalización del ADN. Las láminas son sometidas a una electroforesis en condiciones de pH alcalino en la que el ADN al migrar, después de teñido, muestra la apariencia de un cometa. El ADN no dañado permanece en la “cabeza del cometa” y los fragmentos de ADN se dispersan en la “cola”. El tamaño e intensidad de coloración de la cola del cometa es proporcional a la intensidad del daño del ADN, lo cual es cuantificado en niveles de daño con escala cualitativa de 0 a 4. Se cuantifican 100 nucleoides por lámina y se determinan las unidades arbitrarias (UA) mediante la sumatoria de la cantidad de células en cada nivel multiplicado por el nivel de daño, de forma tal que las UA pueden tener valores entre 0 (sin daño) y 400 (todas las células poseen daño total al ADN).

Determinación del daño oxidativo al ADN:

Se realizó el ensayo Cometa Alcalino acoplado a la

adición de la enzima 8-oxoguanina ADN glicosilasa (hOGG1). Esta enzima reconoce la aparición de 8-oxoGua en el ADN, posee función endonucleasa y produce fragmentación de la cadena polinucleotídica en estos sitios.

Los linfocitos fijados en agarosa fueron tratados con la enzima utilizando como control una lámina del mismo paciente con linfocitos tratados con el buffer de trabajo sin enzima. Se realizó el ensayo cometa y se calculó el daño oxidativo (DO) como la diferencia entre las unidades arbitrarias en presencia y en ausencia de la enzima.

Determinación de la capacidad de reparación del ADN:

Los linfocitos aislados fueron sometidos a tratamiento con 200 μ mol/L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 5 minutos a 4 °C, después de lavados fueron incubados con medio de cultivo RPMI 1640 y 20 % de suero bovino fetal a 37 °C durante 90 minutos, con incubación posterior a 0 °C para la detención de los sistemas de reparación. Se realizó el ensayo cometa en iguales condiciones a las descritas, antes y después de la incubación con el medio de cultivo.

La capacidad de reparación (CR) del ADN se corresponde al porcentaje de ADN dañado por H_2O_2 después de transcurrido el período de incubación en condiciones apropiadas para la reparación en relación con el daño inducido por la exposición al H_2O_2 .¹²

Análisis estadístico:

Los valores se expresan en Unidades Arbitrarias (UA) y se representan como la media \pm SEM (Error Estándar de la Media). Se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney porque las variables no presentan una distribución normal. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

En el estudio fueron incluidos seis pacientes en edades comprendidas entre los 9 y los 51 años, tres del sexo masculino y tres del sexo femenino, cuatro de ellos con diagnóstico de HF y dos con hiperlipoproteinemia mixta.

En la tabla 1 se puede observar que no se encontraron diferencias en el daño basal al ADN entre el grupo de pacientes y controles, se aprecia un aumento del daño oxidativo al ADN en el grupo de pacientes con relación a los controles aunque no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Tabla 1. Valores de daño basal y oxidativo al ADN y capacidad de reparación en el grupo de pacientes y controles. Los resultados corresponden al valor de la media \pm Error Estándar de la Media (SEM) de las Unidades Arbitrarias (UA) de daño en las dos primeras filas y el valor de la media \pm SEM de la capacidad de reparación expresada en porcentaje.

	Pacientes	Controles	Valor de p
Daño basal (Daño pre-existente)	36,85 \pm 11,3	35,96 \pm 3,89	0,7501
Daño oxidativo (Daño como resultado de la acción de la hOGG1)	63,14 \pm 16,35	34,35 \pm 5,52	0,1669
Capacidad de reparación (Porcentaje de daño existente después del tiempo de reparación)	59,84 \pm 12,55	74,55 \pm 2,71	0,0001

Al comparar la capacidad de reparación del ADN entre ambos grupos de estudio se aprecia una disminución, estadísticamente significativa, en el grupo de pacientes.

Se calcularon los percentiles relacionados con la capacidad de reparación de los controles y se utilizó el valor del 25 percentil como punto de corte para clasificar a los pacientes. De esta forma se clasificaron como malos reparadores aquellos que sus porcentajes de reparación se ubicaron por debajo del 25 percentil, como buenos reparadores los que se encontraron por encima del 75 percentil y reparadores normales entre ambos valores.

El 75 % de los pacientes con diagnóstico de HF se encontró por debajo del 25 percentil, mientras que todos los pacientes con hiperlipoproteinemia mixta se consideran reparadores normales.

Discusión

Existen considerables evidencias en la literatura acerca de la participación del estrés oxidativo en las transformaciones celulares durante el proceso de aterogénesis, además de la implicación del daño al ADN en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis. Las modificaciones al ADN producidas por condiciones oxidativas en la célula involucra a regiones teloméricas y no teloméricas del ADN, al ADN nuclear y mitocondrial, y en todas las células implicadas en el desarrollo de la aterosclerosis y la respuesta inflamatoria que la acompaña.^{4,6,7,13}

Existen reportes además de la relación existente entre la afectación de los mecanismos de la reparación del ADN y la aparición de disfunciones en la vasculatura, relacionados de forma estrecha con la presencia de niveles elevados de colesterol plasmático.^{7,10} Se reporta que el tratamiento con estatinas acelera la reparación del ADN, disminuye el daño del material genético, el acortamiento de los telómeros, la senescencia vascular, promueve la estabilidad de la

placa aterosclerótica una vez formada y constituyen potentes protectores endoteliales.^{7,14}

En el presente estudio se obtuvo un aumento del daño oxidativo al ADN en los pacientes con trastornos del metabolismo lipídico de causa genética en comparación con el grupo de controles, aunque no se encontró significación estadística en estos resultados. Existen reportes en la literatura que confirman este hecho.^{2,3,4,6} Consideramos que la cantidad de pacientes estudiados es limitada y es una de las razones para la ausencia de significación estadística, si se tiene en cuenta que el estudio utilizado, aunque de alta sensibilidad, está sujeto a las variaciones individuales y produce amplias diferencias en los datos.

La evaluación de la capacidad de reparación del ADN como respuesta al daño inducido se ha utilizado como bio-marcador de la integridad genómica y se asocia con la aparición de enfermedades y complicaciones.^{15,16}

El grupo de pacientes estudiados presentó disminución de la capacidad de reparación al ADN a expensas de los diagnosticados con HF, enfermedad que cursa con niveles muy elevados de colesterol plasmático, resultado este que concuerda con lo reportado por otros grupos de investigadores. Se reporta la asociación de deficiencia en los sistemas de reparación con trastornos de la función vascular.^{4,10}

Se ha reportado además la existencia de variaciones interindividuales de la capacidad o eficiencia de la reparación unida a la presencia de polimorfismos en genes de la reparación y el riesgo que esto puede ocasionar para la disfunción vascular, la aterosclerosis, el riesgo de enfermedad vascular coronaria y de daño cromosómico.⁷

Consideramos que este trabajo nos ofrece evidencias para relacionar la posible asociación entre la existencia de trastornos en los mecanismos de reparación del ADN y la existencia de mayor severidad de las complicaciones clínicas en los pacientes con hipercolesterolemia familiar.

Referencias bibliográficas

1. Mantilla Morató T, Alonso R, Mata P. Diagnóstico y tratamiento de las hiperlipemias familiares. *Aten Primaria*. 2004;34:557-64.
2. Wiegman A, Rodenburg J, de Jongh S, Defesche JC, Bakker HD, Kastelein JJP, Sijbrands EJG. Family History and Cardiovascular Risk in Familial Hypercholesterolemia. Data in More Than 1000 Children. *Circulation*. 2003;107:1473-8.
3. Nourooz-Zadeh J, Smith CCT, Betteridge DJ. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2001;156: 435-41.
4. Tonini CL, Campagnaro BP, Louro LPS, Pereira TMC, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of Aging and Hypercholesterolemia on Oxidative Stress and DNA Damage in Bone Marrow Mononuclear Cells in Apolipoprotein E-deficient Mice. *Int J Mol Sci*. 2013;14(2):3325-42.
5. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006;8:1865-79.
6. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in Atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*. 2009;50:402-9.
7. Cervelli T, Borghini A, Galli A, Andreassi MG. DNA Damage and Repair in Atherosclerosis: Current insights and Future Perspectives. *Int J Mol Sci*. 2012;13:16929-44.
8. Sigurdson AJ, Jones IM, Wei Q, Wu X, Spitz MR, Stram DA, et al. Prospective analysis of DNA damage and repair markers of lung cancer risk from the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Carcinogenesis*. 2011;32:69-73.
9. Delaney S, Jarem DA, Volle CB, Yennie CJ. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radic Res*. 2012;46:420-41.
10. Durik M, Kavousi M, van der Pluijm I, Isaacs A, Cheng C, Verdonk K, Loot AE, Oeseburg H, Bhaggoe UM, Leijten F, et al. Nucleotide excision DNA repair is associated with age-related vascular dysfunction. *Circulation*. 2012;126(4):468-78.
11. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification follow levels of DNA damage in individual cells, *Exp Cell Res*. 1988;175:184-91.
12. Forchhammer L, Brauner EV, Folkmann JK. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*. 2008;23:23-31.
13. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, Picano E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*. 2011;26:77-83.
14. Aydin S, Uzun H, Sozer V, Altug T. Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacol Res*. 2009;59(4):242-7.
15. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461:1071-8.
16. Collins AR, Azqueta A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay *Mutat Res*. 2012 Aug 1;736(1-2):122-9.