
COMUNICACIÓN BREVE

Daño al ADN y capacidad de reparación en pacientes con von Hippel-Lindau.

DNA damage and repair capacity in patients with von Hippel-Lindau.

*Reinaldo Gutierrez Gutierrez,^I Judith Pupo Balboa,^{II} Gretel Riverón Forment,^{III}
Ana M. González Anta,^{IV} Anamarys Pandolfi Blanco,^V Aimara de Armas
Satiesteban,^{VI} Mildrey Cásido Rodríguez,^{VII} Iris Rojas Betancourt.^{VIII}*

Resumen

La enfermedad de von Hippel-Lindau es una enfermedad autosómica dominante que se caracteriza principalmente por el desarrollo de tumores en diversos tejidos y órganos. Esta enfermedad presenta una elevada inestabilidad genómica que podría explicar en parte, la alta variabilidad inter e intra-familiar en la expresión fenotípica que presentan estos pacientes. En este estudio, se utilizó el ensayo cometa para evaluar los niveles basales de roturas de simple cadena y el daño endógeno de guaninas oxidadas en el ADN de linfocitos de pacientes con la enfermedad. También se midió la capacidad de reparación del ADN nuclear frente al daño inducido por H₂O₂. No se observaron diferencias significativas en el daño basal del ADN entre los controles y los pacientes ($p > 0,05$), pero la capacidad de reparación del ADN fue menos eficiente en el grupo de pacientes ($p < 0,05$), que además presentó un incremento del daño oxidativo. Con la utilización de este ensayo se identificó una capacidad de reparación disminuida y un aumento de guaninas oxidadas en los pacientes estudiados.

Palabras clave: Reparación del ADN, linfocitos de sangre periférica, ensayo cometa, daño oxidativo, von Hippel-Lindau.

Abstract

Von Hippel-Lindau disease is an autosomal dominant disorder which displays considerable inter- and intra-familial variability in phenotypic expression. VHL is characterized mainly by the development of tumors in various tissues and organs. Comet assay was used in this study to evaluate the basal levels of single stranded breaks in DNA, DNA repair capacity against oxidation induced by H₂O₂ and endogenous oxidized guanines damage in lymphocyte DNA of VHL patients compared to healthy subjects. No significant differences in DNA damage were observed between controls and patients ($p > 0,05$), but the DNA repair capacity was less efficient in VHL patients ($p < 0.05$), and oxidative damage was increased. Using this assay we could identify poor repair capacity and increased oxidized guanine damage in VHL patients

Keywords: DNA repair; von Hippel-Lindau; peripheral blood lymphocytes; comet assay; oxidative damage.

^I Master en Genética Médica. Lic. en Farmacia. Investigador auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: rey@infomed.sld.cu

^{II} Doctora en Ciencias Biológicas. Especialista de Primer Grado en Bioquímica Clínica. Investigador auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{III} Master en Bioquímica. Licenciada en Bioquímica. Investigador auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{IV} Master en Ciencias en Atención Integral a la Mujer. Especialista de Primer Grado en MGI y Genética Clínica. Profesor Instructor. Centro Provincial de Genética de Holguín. Cuba.

^V Lic. en Microbiología por Tecnología de la Salud. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{VI, VII} Técnico de Laboratorio. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

^{VIII} Master en Bioética. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesora Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

Introducción

La Enfermedad de von Hippel Lindau (VHL) es un trastorno neoplásico hereditario autosómico dominante que afecta a 1 de cada 36000 individuos.¹ Esta enfermedad se caracteriza por la predisposición a desarrollar tumores en numerosas estructuras del organismo y es causado por la inactivación del gen supresor tumoral von Hippel-Lindau (*VHL*).² La VHL es clasificada como una enfermedad con un alto riesgo de desarrollar carcinoma de células renales (RCC) debido a una elevada inestabilidad genómica.³ La reparación del ADN es el principal mecanismo para mantener la integridad del genoma y prevenir las mutaciones.⁴ El objetivo de este trabajo fue comparar los niveles de daño basal o endógeno e inducido en el ADN, su capacidad de reparación y el daño endógeno de guaninas oxidadas, entre pacientes con VHL e individuos controles sanos. Se parte de la hipótesis de que los pacientes con esta enfermedad tienen niveles preexistentes más altos de roturas de cadena, más lesiones oxidativas en el ADN y una pobre capacidad de reparación del mismo.

Materiales y métodos

Siete pacientes fueron involucrados en el estudio (4 hombres y 3 mujeres; media \pm DE edad $42 \pm 2,16$ años). Todos los sujetos fueron diagnosticados con VHL en base a los criterios estándares de diagnóstico del Hospital Hermanos Ameijeiras ubicado en La Habana, Cuba. El grupo control constó de 30 sujetos saludables (20 hombres y 10 mujeres; media \pm DE edad $35,2 \pm 8,8$ años) residentes en La Habana. Se consideró para la inclusión de todos los sujetos que no estuvieran bajo tratamiento de quimioterapia o radioterapia, no presentaran infecciones, y no hubieran recibido transfusión de sangre en el mes previo a la toma de muestra. Todos los participantes fueron no fumadores.

Los sujetos controles, los pacientes, y los padres de todos los niños, dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio, luego de explicarles exhaustivamente el propósito de la investigación. Este estudio se realizó de acuerdo a las normas que aparecen en La Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica. Todos los participantes donaron 5 mL de sangre venosa periférica.

El daño al ADN se cuantificó a través de la medición de roturas de simple cadena y la presencia de sitios abásicos en linfocitos de sangre periférica mediante el ensayo cometa alcalino.⁵ Cada punto evaluado (el daño basal, el daño inducido por H_2O_2 , la capacidad

de reparación y las guaninas oxidadas del ADN) se montó por duplicado en láminas portaobjetos. Para medir la capacidad de reparación del ADN se retaron los linfocitos con H_2O_2 200 μ M por 5 minutos en hielo; seguidamente se eliminó el inductor de daño mediante lavados con PBS (tampón fosfato salino pH7.4) y se incubó por 90 minutos a 37°C en medio de cultivo con suero fetal bovino al 10%. La diferencia relativa entre el daño al ADN a los 5 minutos y después a los 90 minutos se tomó como una medida de la eficiencia de la reparación del ADN y se expresó en porciento.⁶ Para examinar los niveles de guaninas oxidadas los ADNs fueron incubados con hOGG1 (glicosilasa 1 de 8-oxoguanina del ADN), una endonucleasa comercial que genera roturas adicionales en sitios que contienen 8-oxo-dGua (7,8-dihidro-8-oxoguanina).⁷ El daño oxidativo neto se determinó calculando la diferencia del daño al ADN entre las células tratadas con la enzima y las células sin tratar. Para cuantificar el daño al ADN, las células se tiñeron con nitrato de plata y se analizaron al microscopio óptico con un aumento de 400x. Se contaron doscientas células por cada punto que se evaluó, a través del sistema de conteo visual en unidades arbitrarias de acuerdo a la intensidad y longitud de la cola.⁵

Se aplicó la estadística descriptiva y se utilizó el estadígrafo U de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre los diferentes marcadores cuantificados. Se consideró un valor de $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Este estudio se realizó en el marco de una investigación multicéntrica de enfermedades genéticas con susceptibilidad al cáncer en La Habana. La mayoría de los pacientes con VHL, tuvieron antecedentes patológicos familiares de la enfermedad (86%). Todos los casos presentaron hemangioblastoma, mientras que solo tres (43%) desarrollaron carcinoma renal, quiste renal, y lesiones del páncreas.

En la tabla 1 se muestra que los pacientes con VHL presentaron niveles basales de daño al ADN nuclear de linfocitos semejantes a los del grupo de individuos controles ($P > 0,05$). De forma similar, se obtuvo para el daño inducido. Sin embargo, los niveles del daño en el ADN luego de la reparación del daño inducido por el H_2O_2 fueron muy relevantes al ser más altos en relación a los controles ($130 \pm 21,78$ versus $79,25 \pm 6,05$; $P < 0,05$). En correspondencia, los casos presentaron la capacidad muy disminuida con respecto a los controles ($37,13 \pm 15,26$ versus $74 \pm 0,27$; $P < 0,05$). Al evaluar el daño oxidativo se detectó mayor

daño de guaninas oxidadas en el grupo VHL, con respecto a los controles, lo que presentó significación estadística, al igual que la capacidad de reparación.

Tabla 1. Daño al ADN en casos VHL y controles según las características del estudio.

	Daño Basal ^a	Daño Inducido ^a	Reparación ^a	Capacidad de Reparación ^a	Daño Oxidativo ^a
Casos(n=7)	39,14 ± 2,35	195,57 ± 12,44	130 ± 21,78	37,13 ± 15,26	96,78 ± 21,55
Controles(n=30)	35,96 ± 3,88	203,18 ± 10,90	79,25 ± 6,05	74 ± 0,27	34,35 ± 5,52
Valores-P^b	0,286185	0,614158	0,022103	0,029878	0,004587

^a Media ± Error Estándar de la media en unidades arbitrarias (UA): representa grado de fragmentación del ADN.

^b P < 0.05, casos versus controles. (Prueba U-Mann-Whitney).

Los marcadores estudiados se dicotomizaron por cuartiles y se utilizaron como punto de corte el 25 % y el 75%, que demuestran diferencias entre los casos y controles. De acuerdo a lo anterior, los pacientes con VHL presentaron niveles bajos de DB, DI y CR deficiente con 6(< 46 UA), 7(<241.5 UA) y 4(< 64,7 UA) respectivamente, no así para el DO donde 4 casos mostraron valores altos (> 60,5).

La proteína von-Hippel Lindau (pVHL) elimina la tumorigénesis en parte a través de la regulación del factor α considerado inducible por hipoxia (HIF α).⁸ La pérdida funcional de pVHL resulta en una estabilización aberrante de HIF α independiente de la tensión de oxígeno.⁹ La subsecuente sobreexpresión de proteínas codificadas por genes regulados por HIF α contribuye a la creación de un microambiente favorable a la proliferación celular.¹⁰ Se ha propuesto p53 como un factor de transcripción que es regulado por distintos subtipos de pVHL en presencia de daño al ADN, capaz de regular la tumorigenicidad en la enfermedad de VHL.^{10,11} También se ha demostrado que la pérdida de pVHL o mutaciones en el gen VHL comprometen la ubiquitilación y atenúan la respuesta al daño del ADN.¹² Esto resulta en una disminución de la tasa de reparación de la recombinación homóloga y persistencia de roturas de doble cadena. Marten y colaboradores proveen evidencia de que la capacidad

de reparar el ADN está reducida en células HIF α estabilizadas. Los autores indican que la pérdida funcional de pVHL incrementa la carcinogéno-genotoxicidad en VHL.¹³

En este trabajo demostramos que los pacientes con VHL presentaron la capacidad de reparación disminuida y el daño oxidativo aumentado del ADN, significativamente. Estos hallazgos son consistentes con otros que muestran similares niveles de daño constitutivo y capacidad de reparación del ADN en cultivos de líneas celulares de RCC deficientes del gen *VHL*¹⁴ y de fibroblastos de ratón en condiciones de pH bajo e hipoxia.¹⁵ Sin embargo, se considera que este es el primer estudio de daño endógeno, inducido por oxidación, reparación de roturas simples del ADN y determinación de niveles basales de guaninas oxidadas, cuantificados mediante ensayo cometa en pacientes con VHL.

En este trabajo se demostró la aplicabilidad del ensayo cometa en el estudio de pacientes con VHL, a pesar del pequeño número de casos. Se recomienda continuar este estudio con un mayor número de casos y controles, buscar la asociación con el fenotipo clínico para conducir el seguimiento y asesoramiento del riesgo de carcinogénesis en pacientes con esta enfermedad, así como la potencial prevención en sus familiares.

Referencias bibliográficas

1. Kaelin WG Jr. Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* 2009; 115:2262-72.
2. Kaelin WG Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:673-82;
3. Köhn L, Svenson U, Ljungberg B, Roos G. Specific genomic aberrations predict survival, but low mutation rate in cancer hot spots, in clear cell renal cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015; 23(5): 334-342.
4. Yoshioka K, Atsumi Y, Nakagama H, Teraoka H. Development of cancer-initiating cells and immortalized cells with genomic instability. *World J Stem Cells* 2015; 26:7(2)

5. Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations *Mol Biotechnol*; 2004; 26(3):249-61.
6. Wang Y, Cheng J, Li D, Duan H, Yang H, Bin P et al. Modulation of DNA Repair Capacity by Ataxia Telangiectasia Mutated Gene Polymorphisms among Polycyclic Aromatic Hydrocarbons– Exposed Workers. *Toxicological Sciences* 2011; 124(1): 99-108
7. Smith CC, O'Donovan MR, Martin EA. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 2006;21(3):185-90
8. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumor suppressor protein VHL targets HIF for oxygen-dependant proteolysis. *Nature* 1999; 399:271-5
9. Baldewijns MM, Van Vlodrop IJ, Vermeulen PB, Soetekouw PM, Van Engeland M, De Bruine AP. VHL and HIF signaling in renal cell carcinogenesis. *J Pathol* 2010; 221:125–38
10. Semenza GL. VHL and p53: tumor suppressors team up to prevent cancer. *Mol Cell* 2006; 22:437-9
11. Metcalf JL, Bradshaw PS, Komosa M, Greer SN, Stephen Meyn M, Ohh M. K63-ubiquitylation of VHL by SOCS1 mediates DNA double-strand break repair. *Oncogene*; 2014 20;33(8):1055-65
12. Jae-Seok Roe, Hwa-Ryeon Kim, In-Young Hwang, Nam-Chul Ha, Seong-Tae Kim, Eun-Jung Cho & Hong-Duk Youn. Phosphorylation of von Hippel-Lindau protein by checkpoint kinase 2 regulates p53 transactivation. *Cell Cycle* 2011; 10:22, 3920-3928.
13. Schults MA, Sanen K, Godschalk RW, Theys J, van Schooten FJ, Chiu RK. Loss of VHL in RCC Reduces Repair and Alters Cellular Response to Benzo[a]pyrene. *Oncol* 2013; 3: 270.
14. Schults MA, Timmerman L, Godschalk RW, Theys J, Wouters BG, Van Schooten FJ, et al. Diminished carcinogen detoxification is a novel mechanism for hypoxia-inducible factor 1 mediated genetic instability. *J Biol Chem* 2010; 285:14558–64.
15. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer Res* 2000; 60:4372–6.