

EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS PRODUCIDOS EN EL DNA DE LINFOCITOS HUMANOS POR LAS SUSTANCIAS: ACRILAMIDA, NONI, COCA COLA Y CAFEÍNA UTILIZANDO RAPDs-PCR

Ojeda A¹, Rojas J², Hernández J³ y Bernal J⁴

1. Estudiante 11°, Joven investigador Centro de Biología Molecular, Gimnasio Campestre; 2. Asistente de investigación CEBM; 3. Coordinador CEBM; 4. Director CEBM.* Autor para correspondencia: jhernandez@campestre.edu.co

Resumen

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de dos estudiantes de 11° del Gimnasio Campestre y se utilizaron para cultivo de linfocitos mediante técnicas convencionales. Se incubaron 12 muestras por 24 horas a 37°C. Seguidamente, se le agregó a las muestras las sustancias a evaluar: 500 ml al 30% de acrilamida, 0,1 g de cafeína pura, 1 ml de jugo concentrado de noni, 1 ml de Coca-Cola y 2 ml, (10 mg/ml) de bromuro de etidio. Dos muestras se utilizaron como control positivo. Luego, las muestras se incubaron nuevamente por 48 horas a 37°C. Luego se aisló el ADN y se utilizó en reacciones de RAPD-PCR (Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de DNA). El análisis molecular mostró que la acrilamida fue el producto que presentó un mayor cambio con un 80% en ambas muestras. El noni fue diferente para los dos individuos, presentando en uno de ellos 70% de variación y en el otro apenas un 20%. La Coca-Cola y la cafeína presentaron un patrón de bandas similar en los dos individuos con cambios apenas del 10% y el bromuro de etidio, control positivo del experimento, mostró una alta variación, aproximada del 50%. Los resultados muestran cambios en la secuencia del DNA, sin embargo, no se puede concluir que esta variación se deba a los productos por la baja cantidad de repeticiones utilizada. Además, la técnica de RAPDs puede tener influencia en la variabilidad obtenida.

Palabras Clave: Noni, Coca Cola, Cafeína, Acrilamida, RAPDs-PCR, perfiles electroforéticos.

Summary

Peripheral Blood samples were taken from two 11th grade students from Gimnasio Campestre, and were used to cultivate lymphocytes by conventional techniques. 12 samples were incubated for 24 hours at 37°C. Immediately the substances that were to be evaluated were added to the samples, 500 ml at 30% of acrilamida, 0,1 gr of caffeine, 1 ml of concentrated noni juice, 1 ml of Coca Cola and 2 ml (10 ng/ml) of etidium bromide. Two samples were used as positive control. The samples were then incubated again for 48 hours at a temperature of 37°C. After a period of 48 hours the DNA was separated and used in RAPD-PCR reactions (Random Amplification of Polymorphic Fragments of DNA). The molecular analysis showed that the acrilamida product that showed the greatest change with 80% in both samples. The noni concentrate was different for two persons, showing 70% variation in one and the other only 20%. The Coca Cola and Caffeine showed a pattern of bands similar in both individuals with only about a 10% change. The etidium bromide which was the positive control of the experiment showed a high variation, approximately 50%. The results show changes in the sequence of the DNA, but we cannot conclude that this variation is caused by the substances being evaluated because of the limited repetitions used. Also the technique of RAPDs could influence the variables achieved.

Key Words: Noni, Coca Cola, Caffeine, Acrilamida, RAPDs-PCR, electrophoretic profile.

Introducción

La mutagénesis en las especies se puede definir como una variación discontinua, (mutación) ya sea de carácter somática, germinal, genética o espontánea, la cual desde su aparición queda ligada a la herencia, de esta forma, modificando la carga hereditaria en uno o más individuos de una especie.

Existen dos tipos de mutagénesis, natural e inducida: La primera es cuando se produce un cambio "natural" en el material genético de un individuo de una especie; estos cambios

son los responsables del proceso evolutivo en las especies, los cuales a su vez surgen a través de varias generaciones y experimentan un proceso de prueba y error hasta lograr la mutación más adecuada según las necesidades de supervivencia de la especie.

La segunda, es cuando la mutación es provocada directamente o indirectamente, con intención o sin intención por el hombre, ya sea por sustancias químicas disueltas en el medio ambiente denominadas mutágenos o por acciones físicas como las radiaciones nucleares, como señala Juan Lacadena, "la mutagénesis se induce por la acción de agentes físicos

o químicos producidos y utilizados por la nueva tecnología y que resultan ser poderosos mutágenos y/o carcinógenos”.

Toda mutación va acompañada de ciertas consecuencias fenotípicas, las cuales pueden ser: Mutaciones morfológicas: Este tipo de mutaciones afectan las propiedades exteriormente visibles de un organismo como la forma, el color, o el tamaño; por ejemplo: “las alas rizadas en *Drosophila* y el enanismo en gusanos se consideran todas ellas mutaciones morfológicas”. Mutaciones letales: Este tipo de mutación se reconoce por sus efectos letales en el organismo. Por ejemplo, irregularidades en la sangre que pueden llegar a provocar la muerte del organismo mutante. Mutaciones condicionales: Este tipo de mutación se caracteriza porque el alelo mutante, expresa las condiciones mutantes bajo ciertas condiciones conocidas como condiciones restrictivas, pero bajo condiciones normales o permisivas expresa el fenotipo normal. Por ejemplo, la temperatura puede ser una condición restrictiva para un alelo mutante como nos lo muestra Suzuki. “En *Drosophila*, por ejemplo se conoce una clase concreta de mutaciones denominada letal dominante sensible al calor. Los heterocigotos (H+H) son normales a 20 °C (la temperatura permisiva), pero mueren si se eleva la temperatura a 30°C (la temperatura restrictiva)”. Mutaciones bioquímicas: En este tipo de mutación las funciones químicas de la célula se pierden o varían, generalmente en una incapacidad para crecer y proliferar nuevas generaciones. Mutaciones de resistencia: Este tipo de mutación se caracteriza porque el organismo o célula mutante adquiere la capacidad de crecer bajo la presencia de algún inhibidor específico, el cual no permitiría el desarrollo del organismo o célula si estos se encontraran en estado normal (estado silvestre).

Se consideran sustancias mutagénicas y carcinogénicas, aquellas que pueden producir defectos o cambios genéticos hereditarios, así como aumentar su frecuencia en una población. Aunque no todas las sustancias mutagénicas son carcinogénicas, éstas tienen un alto riesgo de generar anomalías a nivel somático y germinal, tales que pueden llegar a desencadenar diversos tipos de cáncer, como cáncer de piel, de mama y cáncer de aparato digestivo, etc .

Por esta razón, las sustancias mutagénicas se asocian con sustancias carcinogénicas. Además, estos tipos de cáncer llegan a manifestarse constantemente entre diversos miembros de una familia a lo largo de varias generaciones, ya que una vez generados, éstos quedan ligados a la herencia y son desencadenados por el uso o contacto frecuente con sustancias mutagénicas.

Actualmente en el mundo no existe un ícono que marque o que alerte sobre el riesgo de estas sustancias, las cuales

aumentan cada vez más, ya que día tras día los científicos descubren propiedades mutagénicas en sustancias que se creía que no poseían dichas características y riesgos. (Ver Tabla 1).

Tabla 1: Algunos alimentos mutagénicos, comprobados científicamente

- Cafeína.
- Edulcorantes que contienen Ciclamato y ciclohexilamina.
- Alimentos que contienen grasas y aceites, con ácido etileno-diamino-tetracético, como la mayonesa, margarina, salsas, etc.
- Isotiocianato de ajo: Producto natural que se deriva de la sinigrina, glucosinolato muy común en plantas del género Brassica (coles) y Sinapsis (rábano, etc.).
- La carne, el pescado y el queso que han sido tratados con nitritos y ácido nitroso.
- El vino y la cerveza, ya que contienen Bisulfito sódico.
- Hongos como *Aspergillus flavus* y *Penicillium puberulum* que pueden aparecer sobre algunos frutos secos como el maní, las almendras, etc.
- Alimentos ahumados como galletas, margarina y mayonesa.
- El 1,2,5,6-dibenzo-antraceno, que se encuentra en carne y pescados ahumados.
- Bromato de Potasio (KBrO₃), encontrado en el pan y alimentos similares.
- Yogurt.
- Colorantes.
- Aspartame: endulzante sintético.
- Gelatina.

Debido a que las sustancias mutagénicas son tan comunes en el medio, los seres vivos pueden entrar en contacto con ellas ya sea por inhalación, ingestión o penetración cutánea, aumentando así la frecuencia de cambios mutagénicos inducidos en seres vivos o poblaciones de estos.

Metodología

Muestra biológica: Se utilizaron linfocitos provenientes de dos estudiantes de 11° del Gimnasio Campestre. Las muestras se obtuvieron con jeringas de 10 ml (PLASTIPAKMR) y seguidamente se introdujeron en tubos VACUTAINER que contenían K3 EDTA.

Productos químicos: Se utilizaron los productos: Acrilamida, Cafeína, Noni, Coca-Cola y Bromuro de etidio. La acrilamida se obtuvo del Laboratorio de Biología

Molecular del Gimnasio Campestre, al igual que el Bromuro de etidio. La cafeína se consiguió en un laboratorio químico. El noni y la Coca-Cola se obtuvieron de un supermercado.

Cultivo celular: Las muestras de sangre periférica obtenidas de dos estudiantes de 11° del Gimnasio Campestre, Sebastián Mora y Daniel Bernal, se utilizaron para cultivo de linfocitos mediante técnicas convencionales. En frascos de vidrio transparente se cultivaron siete muestras de sangre de cada estudiante, c/u de 1 ml aproximadamente, en 5 ml de RPMI enriquecido con 1 ml de suero fetal bovino, 0,2 ml de fitohemaglutinina y 20 microlitros de antibiótico (Penicilina-Streptomocina). Las doce muestras se incubaron por un periodo de 24 horas a 37°C, figura 1.

Inoculación de las sustancias: Transcurrido el periodo de incubación, se le agregaron a las muestras las cinco sustancias experimentales en las siguientes cantidades: Acrilamida: 500 ml al 30%, Bromuro de Etidio (control positivo): 2 ml (10 mg/ml), Cafeína: 0.1 g, Noni: Se concentró por medio de calor y se utilizó 1 ml y Coca-Cola: 1 µl. Un humano promedio posee aproximadamente 5.000 ml de sangre en su cuerpo, los valores de las anteriores sustancias están dados sobre 1 ml, por lo tanto deben multiplicarse por 5000 para determinar una equivalencia aproximada, la cual es la cantidad de ese producto que una persona debe ingerir para que se produzcan cambios al mismo nivel de los cultivos celulares utilizados en el proyecto.

De esta forma, se realizó un cultivo de cada sustancia más un cultivo "control" por alumno y se le asignó un código correspondiente a cada uno así:

Alumno A (Sebastián Mora): A1 → Control; A2 → Acrilamida; A3 → Bromuro de Etidio (control +); A4 → Cafeína y A5 → Noni; A6 → Coca-Cola.

Alumno B (Daniel Bernal): B1 → Control; B2 → Acrilamida; B3 → Bromuro de Etidio (control +); B4 → Cafeína; B5 → Noni y B6 → Coca-Cola.

Aislamiento de DNA: Después del período de incubación con las sustancias experimentales, se aisló el DNA de todas las muestras de sangre, utilizando el método de Salting Out, con el cual logramos obtener alrededor de 1.000 ng de DNA lavado con etanol al 70% y resuspendido en TE 1X. Esta muestra obtenida se cuantificó por observación directa después de un corrido electroforético.

Reacción RAPDs-PCR: Las reacciones de RAPDs-PCR se basan en la amplificación de DNA genómico, el cual es expuesto a oligonucleótidos cortos de secuencia variable, que se unen a varias regiones del genoma simultáneamente,

produciendo la amplificación de varias bandas de tamaño variable típicas produciendo una huella dactilar.

La reacción consistió en un total de 50 ciclos, divididos en dos programas de 25, 1 min. a 96°C, 1,5 min. a 37°C y 2 min. a 68°C; en los que se utilizó en c/u 1 µl Taq polimerasa, 3,0 mM de MgCl₂, 1X PCR Buffer, 200 M dNTPs y 40 pM de iniciadores, en un volumen final de 25 µl el cual se completó con agua destilada estéril.

Revelado electroforético y lectura del gel: Los productos obtenidos por RAPDs-PCR se revelaron en un gel de agarosa al 2%, el cual está dividido en 13 celdas.

Antes de iniciar la electroforesis, sembramos en cada celda 8,5 ml de cada muestra y 3 ml de marcador de peso 100 bp DNA.

Finalmente, iniciamos el corrido electroforético a 120 V durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo sacamos el gel de la cámara y visualizamos las bandas de DNA de las 12 muestras en el transiluminador y tomamos dos fotos con una cámara Polaroid, Figura 3.

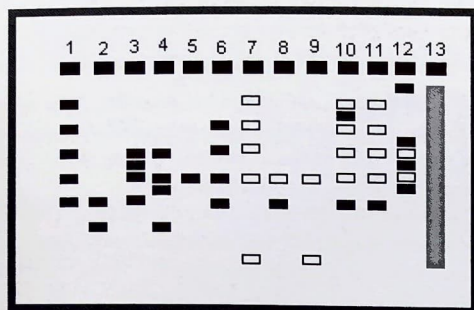
Resultados

El cultivo celular que produjo una mayor multiplicación de linfocitos fue el tratamiento con acrilamida, muy por encima de los controles. Los tratamientos con noni mostraron un índice de multiplicación apenas un poco mayor; en cambio, los cultivos con Coca-Cola y bromuro de etidio presentaron un índice similar, y la cafeína, un poco por debajo de los controles.

De este modo concluimos que la acrilamida induce a la mitosis, ya que se vio un significativo aumento de células en los tubos que contenían esta sustancia. El pellet de los tubos que contenían bromuro de etidio, era claramente visible y se lograban distinguir con facilidad los glóbulos rojos de los blancos, lo cual fue totalmente contrario en los tubos que contenían cafeína, ya que por la coloración marrón que presentaron las células, fue muy difícil obtener el DNA de estas muestras y distinguir los tipos de células que había en ellos.

Por otro lado, los tubos que contenían noni y Coca-Cola, no presentaron ninguna irregularidad en las células, así como tampoco tuvimos dificultades para extraer el DNA de estas muestras.

Después de realizar la Amplificación al Azar de Fragmentos



- Celdas del gel donde se sembraron las muestras y el marcador de peso.
- Bandas del control (A) y/o bandas de sustancias diferentes al control (A) pero que concuerdan con las del mismo.
- Bandas del control (B) y/o bandas de sustancias diferentes al control (B) pero que concuerdan con las del mismo.
- Bandas de sustancias diferentes a los controles y que no concuerdan con su respectivo control (A) o (B).

- | | | |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| 1.) Control (A) | 7.) Control (B) | 13.) Marcador de peso ■ |
| 2.) Acrilamida (A) | 8.) Acrilamida (B) | |
| 3.) Bromuro de Etidio (A) | 9.) Bromuro de Etidio (B) | |
| 4.) Cafeína (A) | 10.) Cafeína (B) | |
| 5.) Noni (A) | 11.) Noni (B) | |
| 6.) Coca-Cola (A) | 12.) Coca-Cola (B) | |

Figura 1. Interpretación de los cambios electroforéticos producidos por la acrilamida, noni, cafeína y Coca Cola sobre linfocitos humanos.

Polimórficos del DNA (RAPDs-PCR), efectuamos la lectura del gel con lo cual logramos observar el cambio en los perfiles electroforéticos producidos en el DNA de cada una de las muestras de linfocitos humanos, con relación a sus controles respectivos, como se muestra en la Figura 2. Como podemos ver en la Figura 1, las sustancias si produjeron cambios en la secuencia de DNA con respecto a sus controles:

Sustancias (A):

Acrilamida: mostró una banda similar a la del control, aproximadamente en los 2000 Pb, también mostró una segunda banda diferente a las del control aproximadamente de 2200 Pb.

Bromuro de Etidio: Produjo en total cuatro bandas de las cuales sólo tres son similares a las del control en los 1500 1800 2000 Pb aproximadamente. Y sólo una fue diferente a las del control, aproximadamente en los 1600 Pb.

Cafeína: Produjo cuatro bandas, de las cuales dos son similares al control aproximadamente en los 1500 y 1700 . Las otras dos bandas que son diferentes a las del control se encuentran aproximadamente en los 1800 y 2200 Pb.

Noni: El noni sólo produjo una banda similar a las del control, aproximadamente en los 1700 Pb.

Coca-Cola: Produjo cuatro bandas similares a las del control, aproximadamente en los 1300 , 1500 , 1700 y 2000 Pb.

Sustancias (B):

Acrilamida: Produjo dos bandas, una similar a las del control aproximadamente en los 1700 y una diferente a las del control aproximadamente a los 2000 Pb.

Bromuro de Etidio: Produjo una sola banda similar a las del control en los 1700 Pb aproximadamente.

Cafeína: Produjo seis bandas, de las cuales cuatro son similares a las del control, aproximadamente de 1000, 1400, 1500 y 1700 Pb; y dos diferentes al control en los 1300 y 2000 Pb aproximadamente.

Noni: El noni produjo cinco bandas, de las cuales cuatro son similares al control de 1000, 1400, 1500 y 1700 Pb; y sólo una diferente al control, aproximadamente de 2000 Pb.

Coca-Cola: Produjo seis bandas de las cuales dos son similares a las del control de 1000 y 1500 Pb aproximadamente; y cuatro diferentes al control de 900, 1450, 1600 y 1800 Pb.

Tras realizar el análisis molecular de las bandas amplificadas por RAPDs-PCR, pudimos observar que la acrilamida fue el producto que presentó un mayor cambio con un 80% en ambas muestras; luego el noni, el cual fue diferente para los dos individuos, presentando en uno de ellos un 70% de variación y en el otro apenas un 20%. La Coca-Cola y la cafeína presentaron un patrón de bandas similar en ambos individuos con cambios apenas del 10% y el bromuro de etidio, control positivo del experimento, mostró una alta variación aproximada del 50%.

Conclusiones

- 1) La evidencia permite afirmar la hipótesis alternativa (H1): El perfil electroforético del DNA amplificado mediante RAPDs-PCR de linfocitos humanos sometidos a estrés por los productos acrilamida, noni, cafeína y Coca-Cola presentan cambios con respecto al control (sin estrés).
- 2) En la etapa de cultivo celular, concluimos que la acrilamida induce a la mitosis, ya que se vio un significativo aumento de células en el pellet de los tubos que contenían esta sustancia, tanto en el individuo (A) como en el individuo (B).
- 3) Los resultados muestran que las sustancias acrilamida, noni, cafeína y Coca-Cola producen diferentes cambios en la secuencia del DNA de los linfocitos humanos analizados en dos individuos y que, por lo tanto, podrían llegar a ser sustancias mutagénicas.
- 4) Aunque los cambios en la secuencia del DNA son evidentes, la metodología utilizada presenta algunas limitaciones. La poca cantidad de repeticiones que se realizaron con cada una de las sustancias experimentales no permite generalizar los resultados obtenidos en este experimento. Además, la técnica de RAPDs-PCR puede tener influencia en la variabilidad obtenida.
- 5) Este trabajo sugiere la necesidad de una mayor investigación en el tema, utilizando diferentes metodologías, con el fin de analizar los efectos mutagénicos de estas sustancias y prestando especial atención a las implicaciones de su uso frecuente.

Bibliografía

BARAHONA, Ana y Daniel Piñero. *Genética: La continuidad de la vida*. Ciudad de México: Fondo de cultura económica, 1994.

BARBADILLA, Antonio. *Bellaterra Enero 1998. Definición de Genética*. Disponible en internet: <<http://genmic41.uab.es/genetica/Curso/definicion.htm>>

BLANCO, Arturo. *Antroposmoderno – biografías*. Aristóteles. Marzo 2000.

LACADENA, Juan Ramón. *Mutagénesis y Sociedad*. Disponible en internet: <www.cnice.mecd.es/tematicas/genetica/2000_07/mutage_00.html>.

SUZUKI, David T. et al. *Genética*. Madrid: McGraw-Hill, Interamericana 1989.

GODNIC, Mariano. *Acrilamida en los alimentos*. Disponible en internet: <<http://www.nutrinfo.com.ar/pagina/info/acrilam.html>>
Jugo de noni, El noni en Norte América. Disponible en internet: <<http://naturales.freeyellow.com/farmacia.htm>>

ROMERO, Andreina, *La Coca Cola es perjudicial*. Disponible en internet: <www.jasdimor.com/spa/natural/natu02.html>
Cafeína en la dieta, 2001, adam.com, Inc. Disponible en internet: <<http://pcs.adam.com/ency/article/002445.htm>>

Gran Enciclopedia ilustrada Circulo: Plaza & Janés, Barcelona 1984; 12 volúmenes.

Enciclopedia Microsoft Encarta [CD. ROM] Microsoft Corporation, 1993 - 2002. Requerimientos del sistema: IBM PC o compatible.

Nueva Enciclopedia Larousse: Editorial Planeta, Barcelona 1980; 10 tomos.

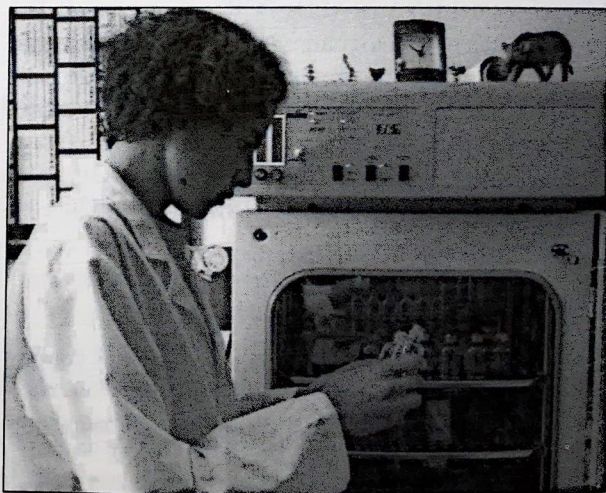


Figura 2. Análisis de las muestras realizadas por el estudiante Antonio Ojeda.

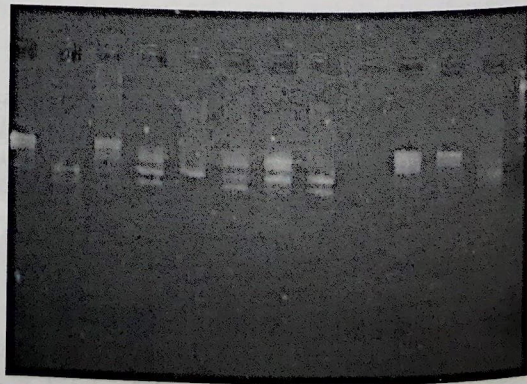


Figura 3. Productos de amplificación de las 14 muestras realizadas por RAPDs-PCR y reveladas por electroforesis de agarosa al 3%.