



Universidad Autónoma de Guerrero

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental



Ensayo Cometa

Presenta:

Daniel Locia Morales

Chilpancingo Gro. 8 de Octubre de 2012

Antecedentes históricos

- ~ El ensayo cometa fue descrito en la década de los 80 como un nuevo método para la detección del daño al ADN.
- ~ En 1984 Östling y Johanson presentaron la idea de la utilización de microgeles de electroforesis, así las células embebidas en capas de agarosa fueron lisadas y sometidas luego a un campo eléctrico, lo que permitió la migración del material genético.

En este punto se realizaba una versión neutra del ensayo cometa, solo se evidenciaban DSB.

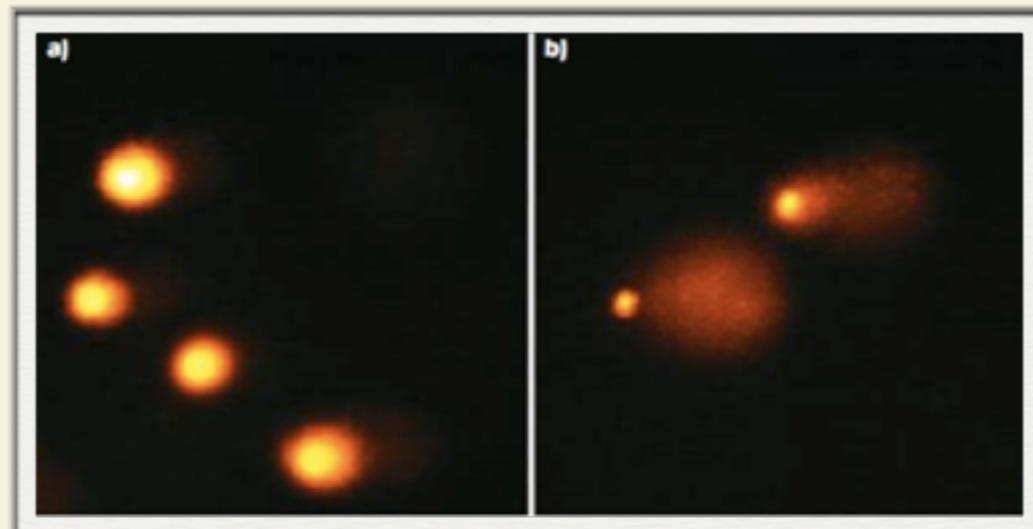
Fue hasta 1988 que Singh et al. (1988) modificaron la técnica para aumentar la sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad del ensayo.



pH 13

“Single Cell Gel Electrophoresis”

ENSAYO COMETA

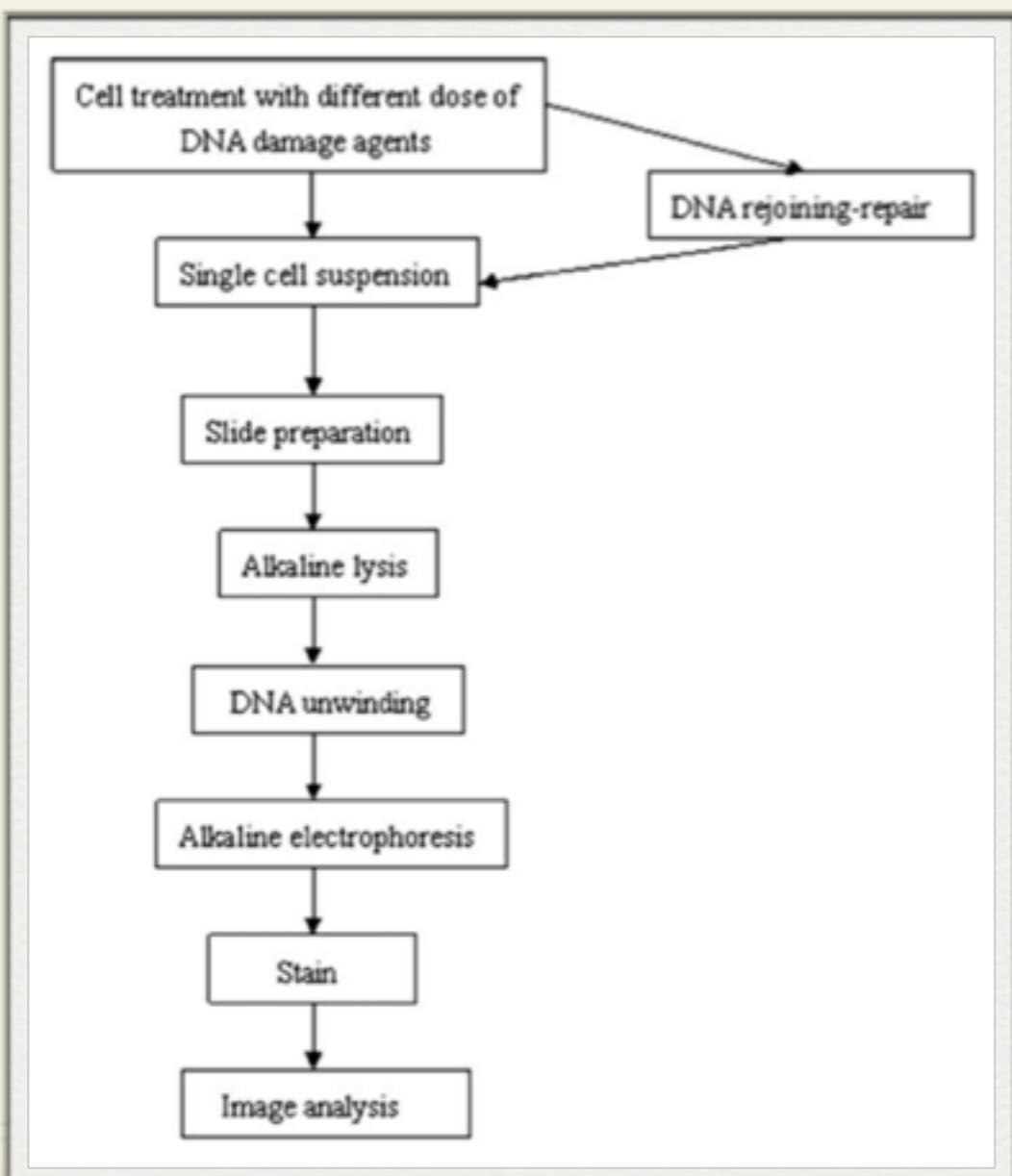


Imagenes de cometas obtenidos de linfocitos. a) controles, solo con daño basal b) linfocitos con daño en el ADN inducido por radiación gamma.

¿Qué es?

El ensayo de cometa es un método simple para medir rupturas en el ADN en células eucariotas.

¿Cómo se realiza?



El ensayo cometa alcalino (pH 13) está siendo cada vez más utilizado en las pruebas de genotoxicidad de sustancias tales como:

**Productos químicos industriales
Biocidas
Agroquímicos
Aditivos alimentarios
Productos farmacéuticos.**

BIOMONITORIZACIÓN

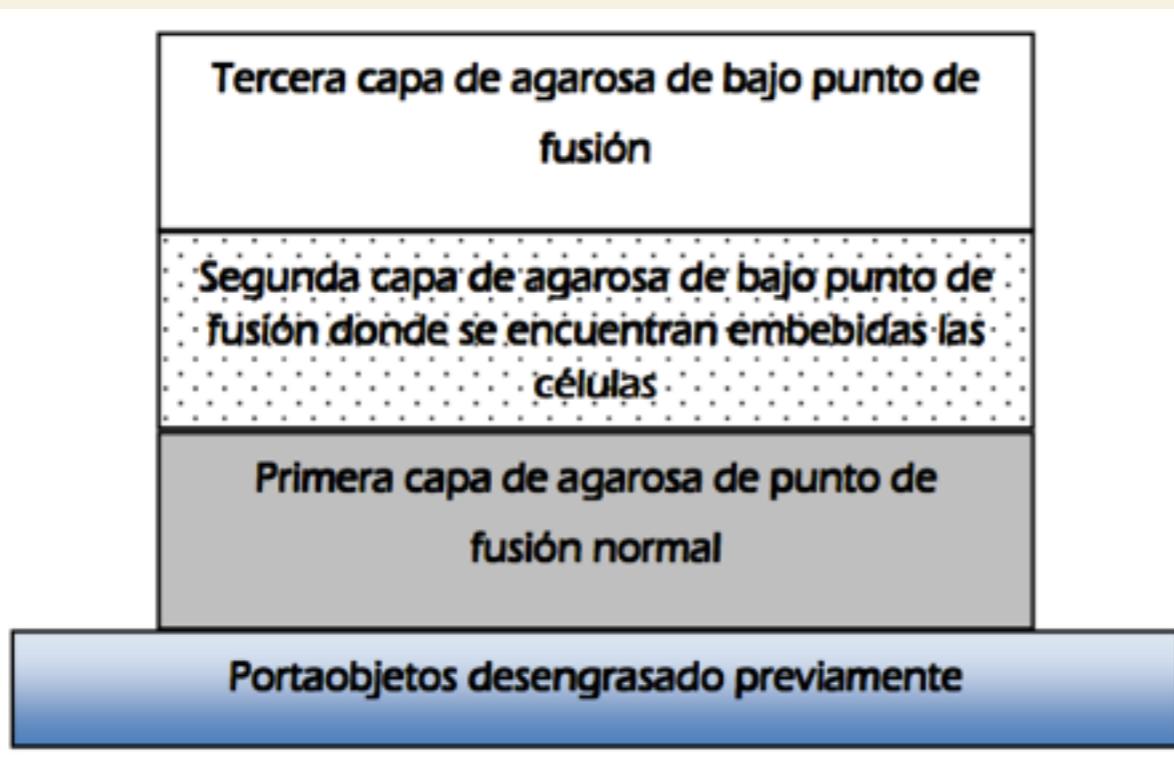
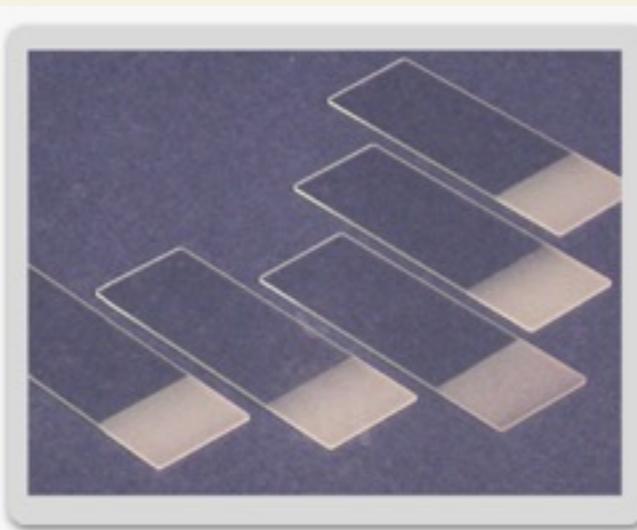
Variaciones del ensayo cometa

Versión	Descripción/características	Ventaja/aplicación	Referencia
Neutra	Lisis y electroforesis a pH 9,5; menos desnaturalización y colas menos pronunciadas; detecta SSB y DSB; límite de detección similar, pero menos sensible que la versión alcalina	Útil en situaciones donde es necesario no contar con tanta sensibilidad (e.g., cuando el daño basal o el inducido es alto)	Östling y Johanson, 1984; Angelis <i>et al.</i> , 1999; Collins, 2004.
Alcalina	Lisis/desnaturalización/ electroforesis en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 13$), los ALS son convertidos a roturas. Cambiando el pH entre 9,5 y 13 se puede cambiar la sensibilidad.	Imágenes más claras de los cometas; gran respuesta al daño comparada con la versión neutra; comúnmente llamado ensayo "estándar" del cometa, usualmente adoptado cuando se investiga protección frente a daño inducido e.g., H_2O_2 .	Singh, 1988; Angelis <i>et al.</i> , 1999; Tice <i>et al.</i> , 2000.
Con enzimas de reparación	Enzimas específicas usadas inmediatamente después de la lisis transforman los sitios susceptibles en SSB; las enzimas utilizadas incluyen EndoIII (revele pirimidinas oxidadas) FPG (revele purinas oxidadas); se ha incrementado la sensibilidad y reforzado la especificidad para distintos tipos de lesiones en el DNA.	Se pueden detectar distintos tipos de daño; se ha reforzado la sensibilidad; es útil por ejemplo, para detectar diferencias en daño basal después de alguna suplementación.	Collins <i>et al.</i> , 1993; Dusinská y Collins, 1996.

Metodología

Preparación de los portaobjetos

Para asegurar un soporte estable para la manipulación de las células a evaluar
Permitir una buena y fácil visualización con un mínimo ruido de fondo.



Concentración de la agarosa

0.5 - 1 %

Deshidratación de la primera capa de agarosa a 40 °C por unos pocos minutos

(Singh et al. 1988)

Montaje de las células y lisis celular



La solución de lisis debe ser refrigerada antes y durante su uso para lograr una máxima estabilidad de los geles de agarosa.

Solución de lisis

NaCl 2.5 M

Na₂EDTA 100 mM

Tris 10 mM

En este paso, la solución de lisis elimina todas las membranas celulares y deja solamente el ADN inmerso en la capa de agarosa de bajo punto de fusión. Las laminillas son estables hasta 15 días en la solución de lisis.

Desnaturalización y electroforesis



La desnaturalización o desenrollamiento se lleva a cabo por **20 minutos**, la electroforesis se lleva a cabo a **25V** y **300mA** constantes.

5 °C y 8 °C

Solución de desnaturación y electroforesis

NaOH 10M

Na₂EDTA 200 mM

Es recomendable que este proceso se lleve a cabo evitando la luz directa sobre la cámara de electroforesis

Neutralización y fijado de las laminillas

Tris pH 7.4 Etanol 96%

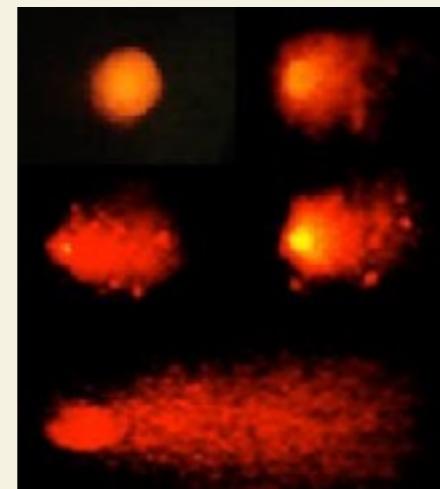
Tinción de las laminillas

Agentes Intercalantes

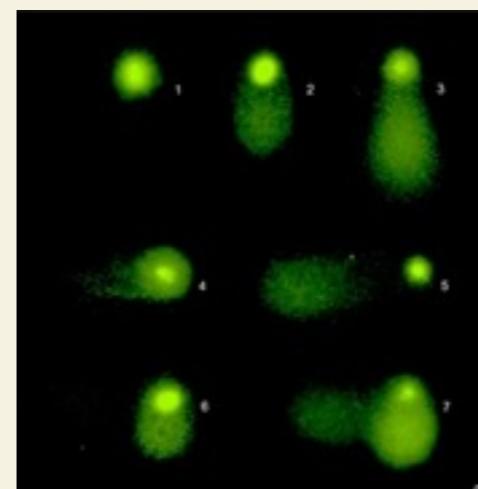
Bromuro de etidio (EB)

Yoduro de propidio (PI)

4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)

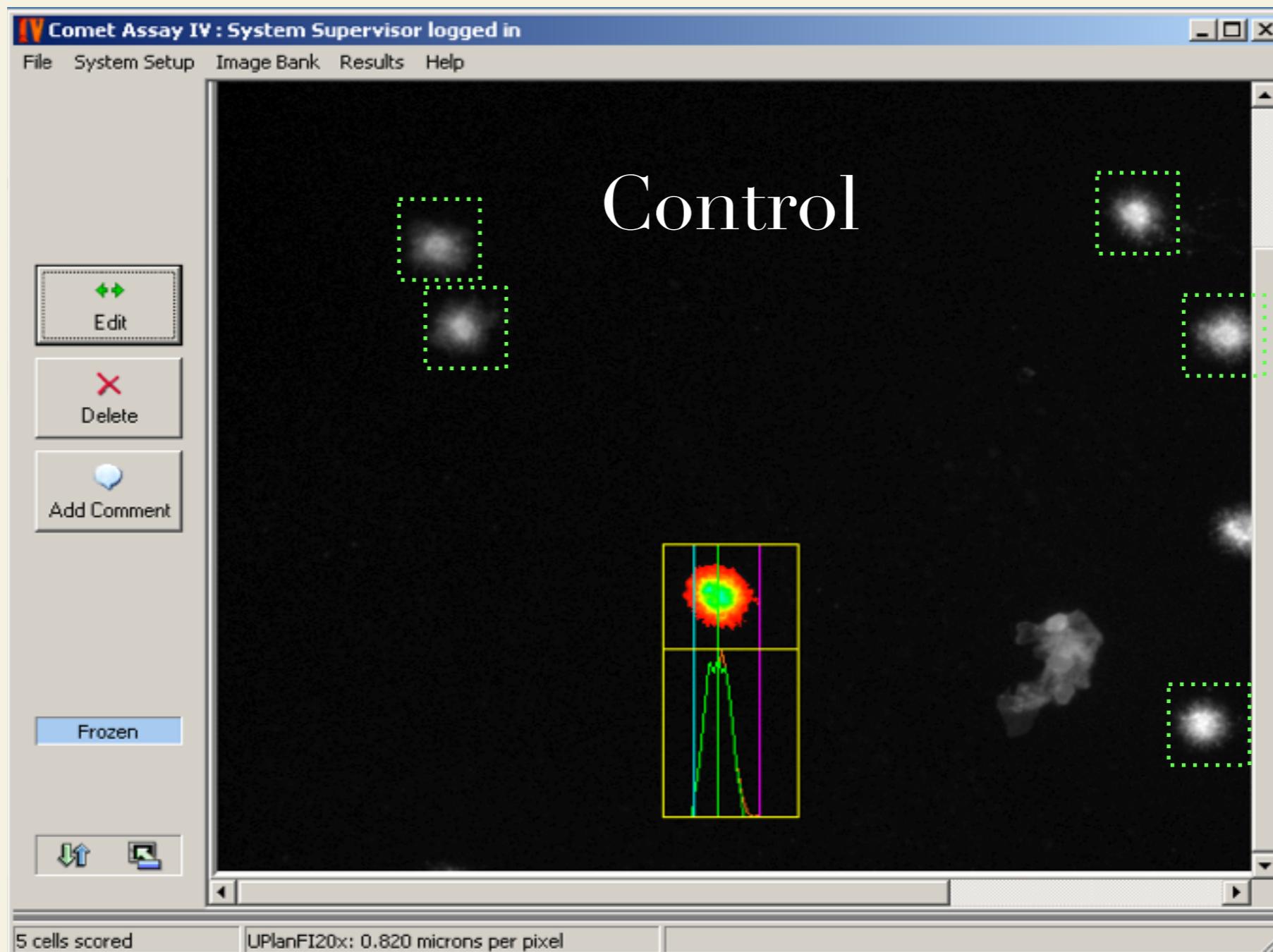


EB

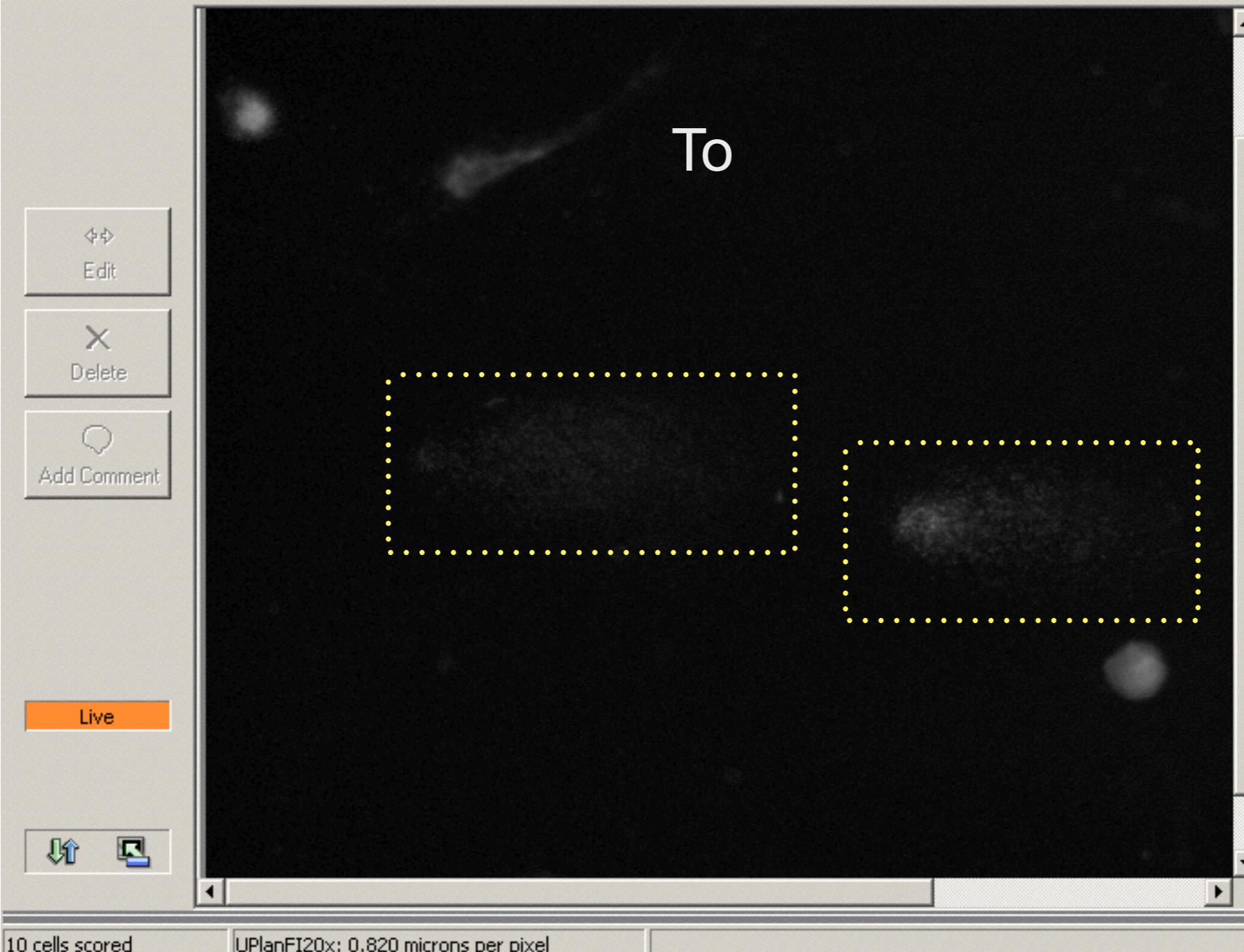


Sybr Green

Observacion de las laminillas

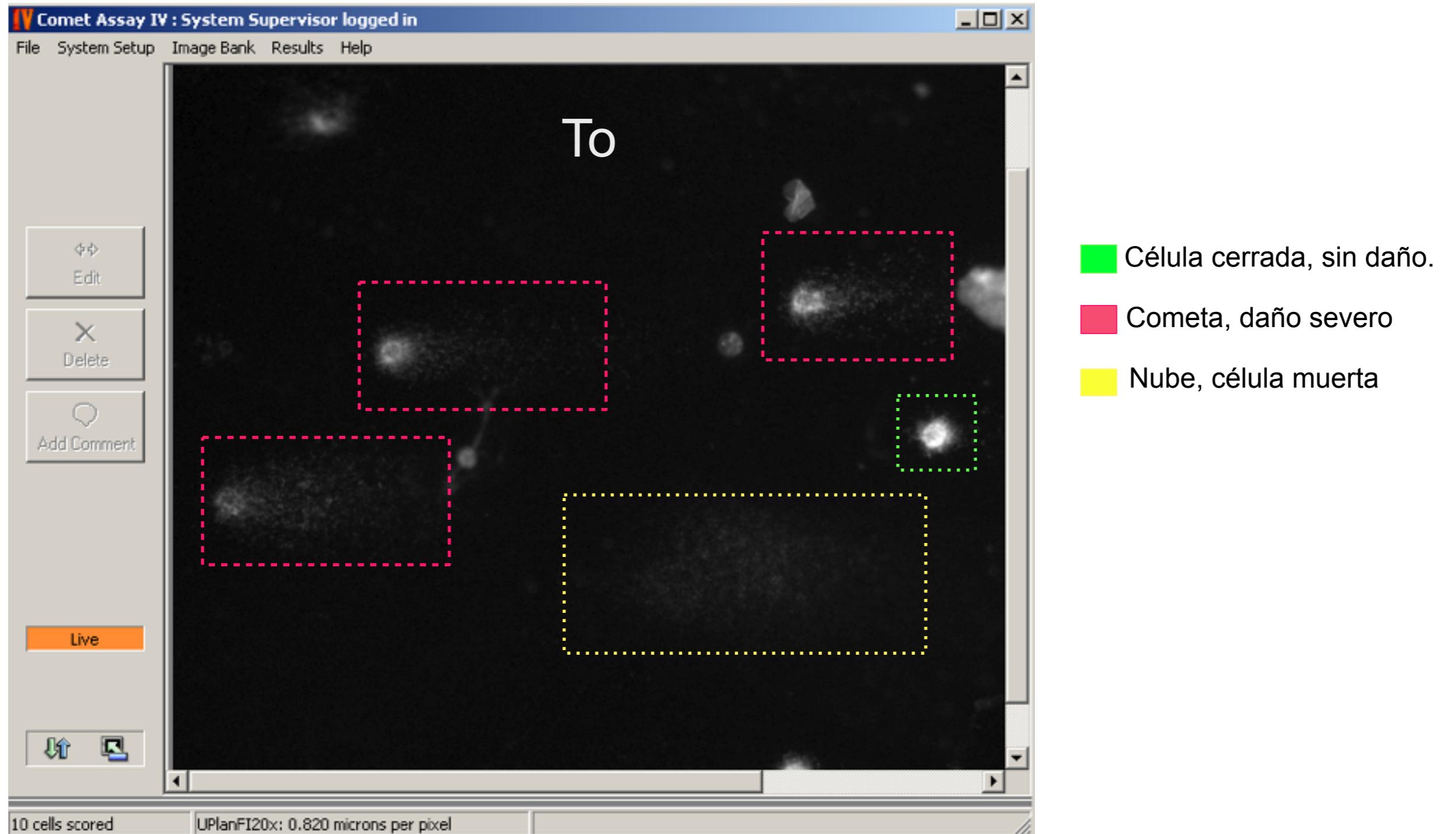


Comet Assay **IV**

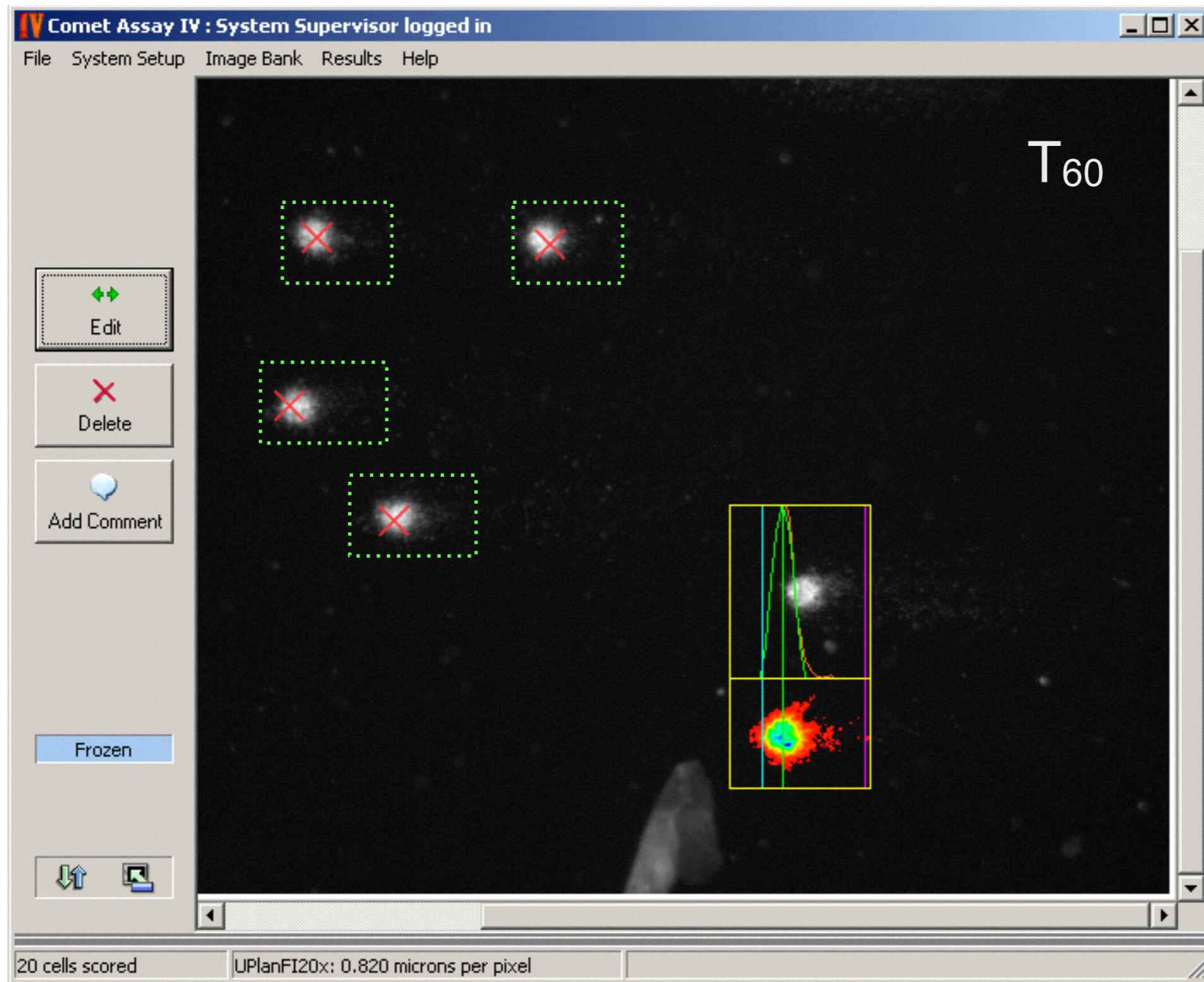


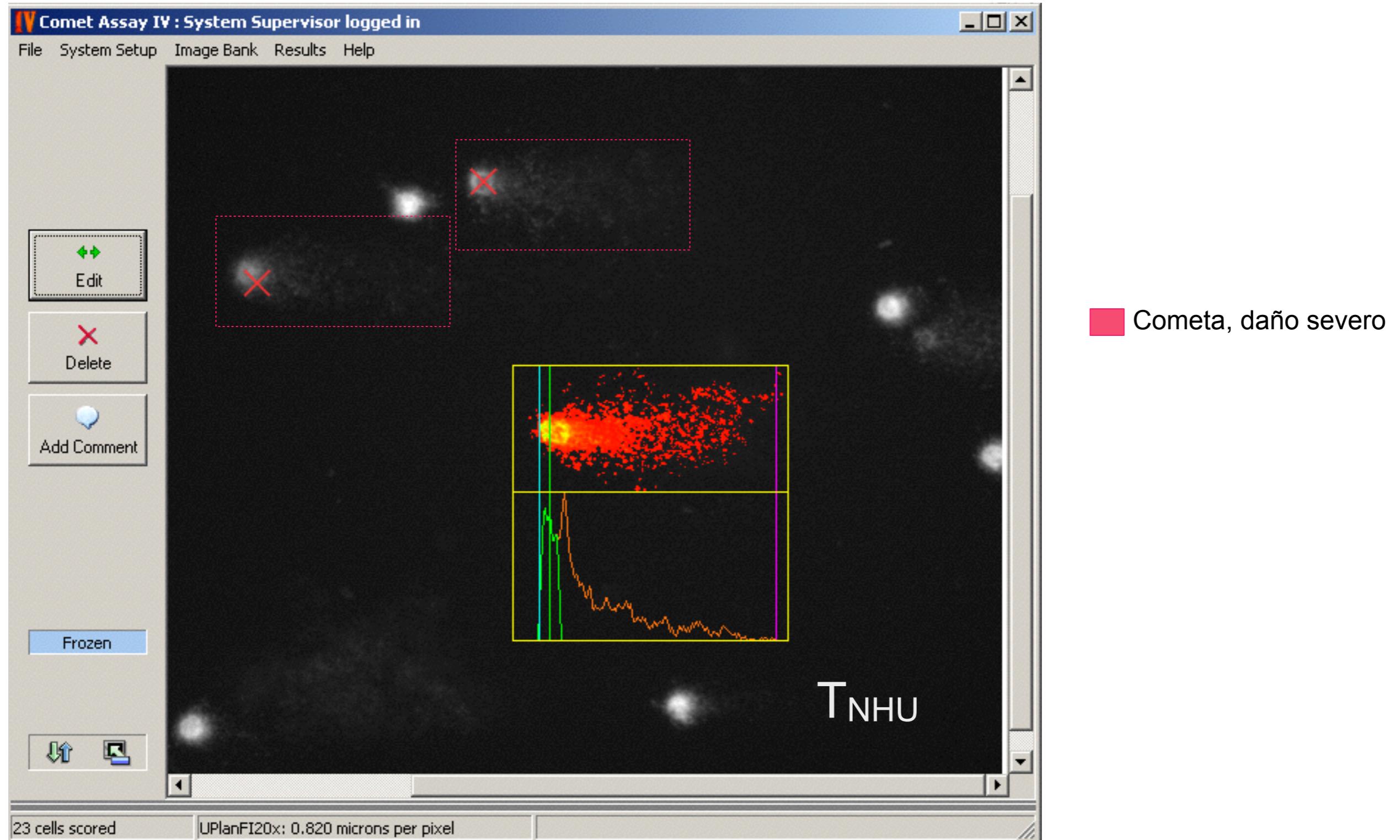
Nubes

Células muertas



To: tratamiento durante 10 minutos con 10 uL H₂O₂ al 30%

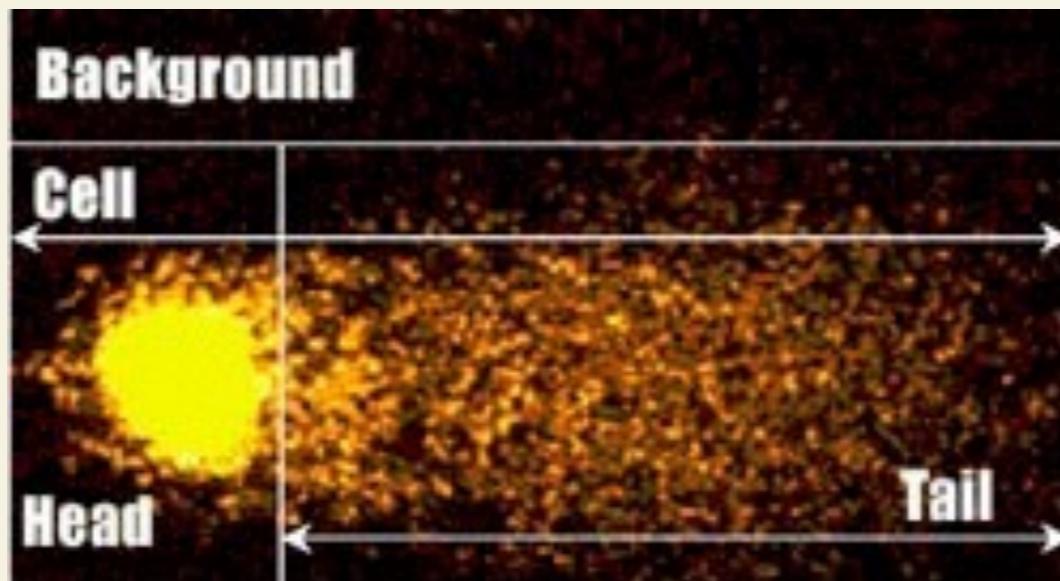




T_{NHU} : inhibicion de los mecanismos de reparacion con 10 uL de Hidroxiurea 1M

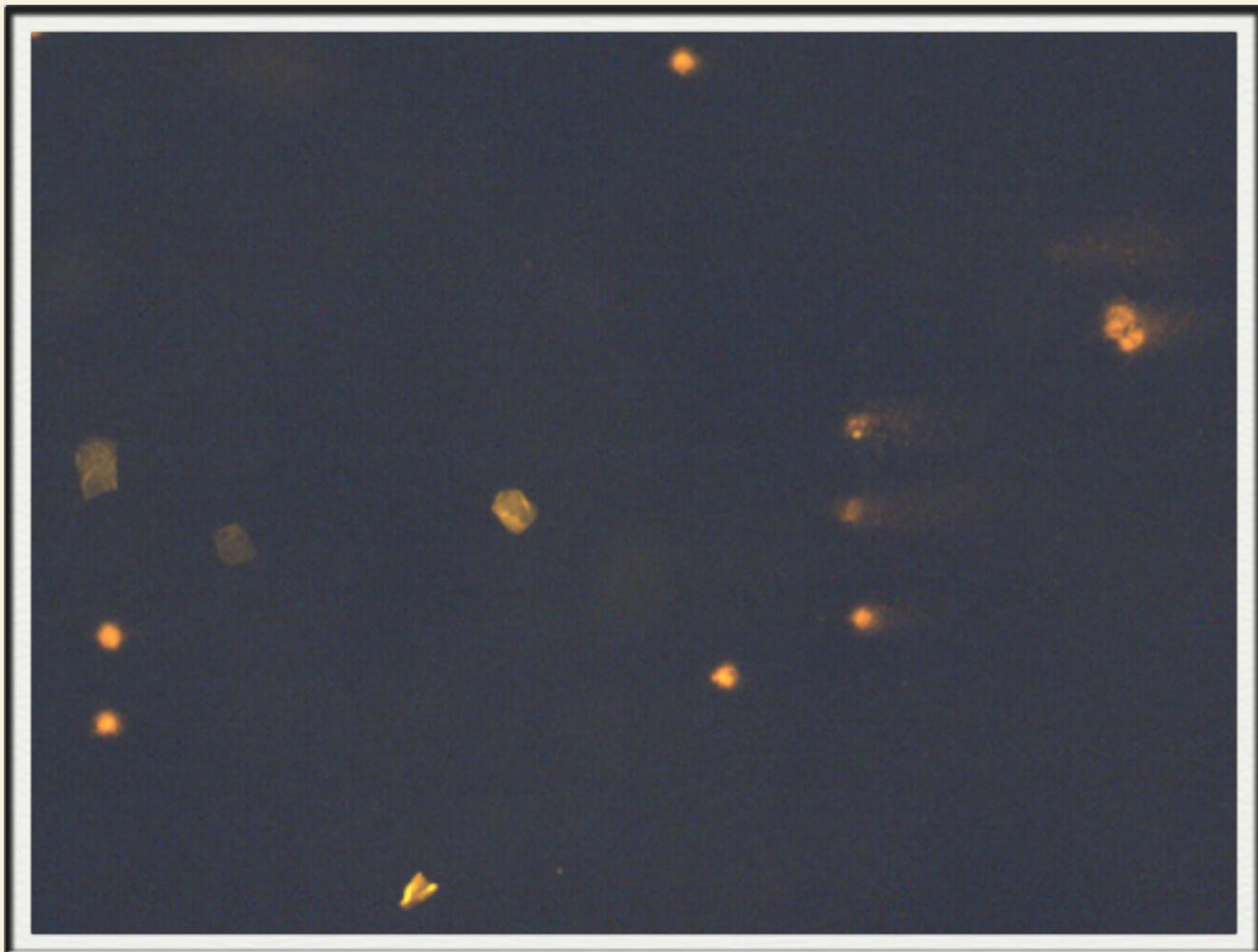
Parámetros a evaluar

- ~ **Tail length:** la longitud de cola es la distancia de la migración del ADN del nucleo y se utiliza para evaluar el grado de daño en el DNA.
- ~ **Olive tail:** se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción del total de ADN en la cola. Es una medida que considera el la cantidad de ADN que ha migrado en la cola del cometa



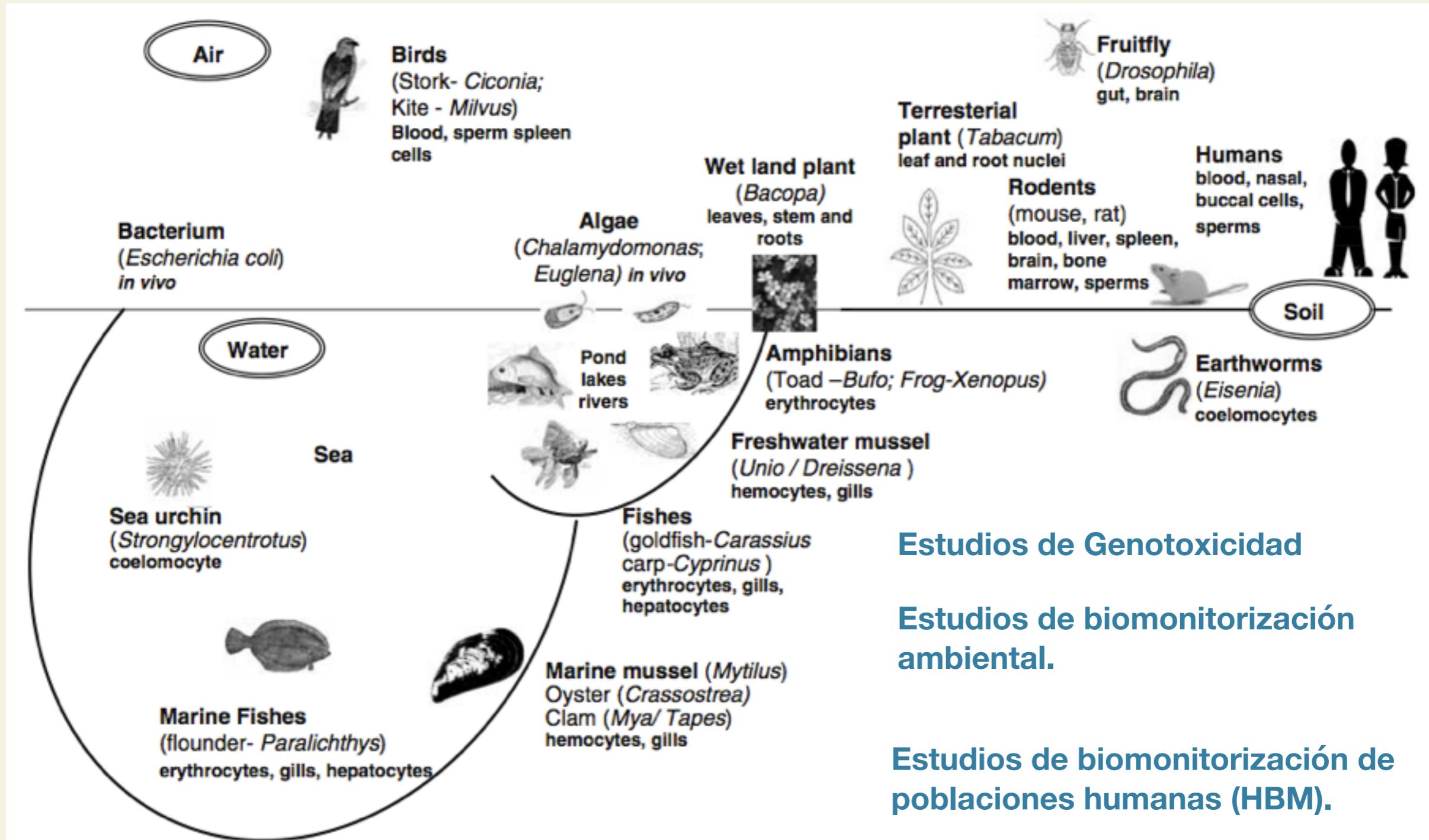
Las mediciones son en micras

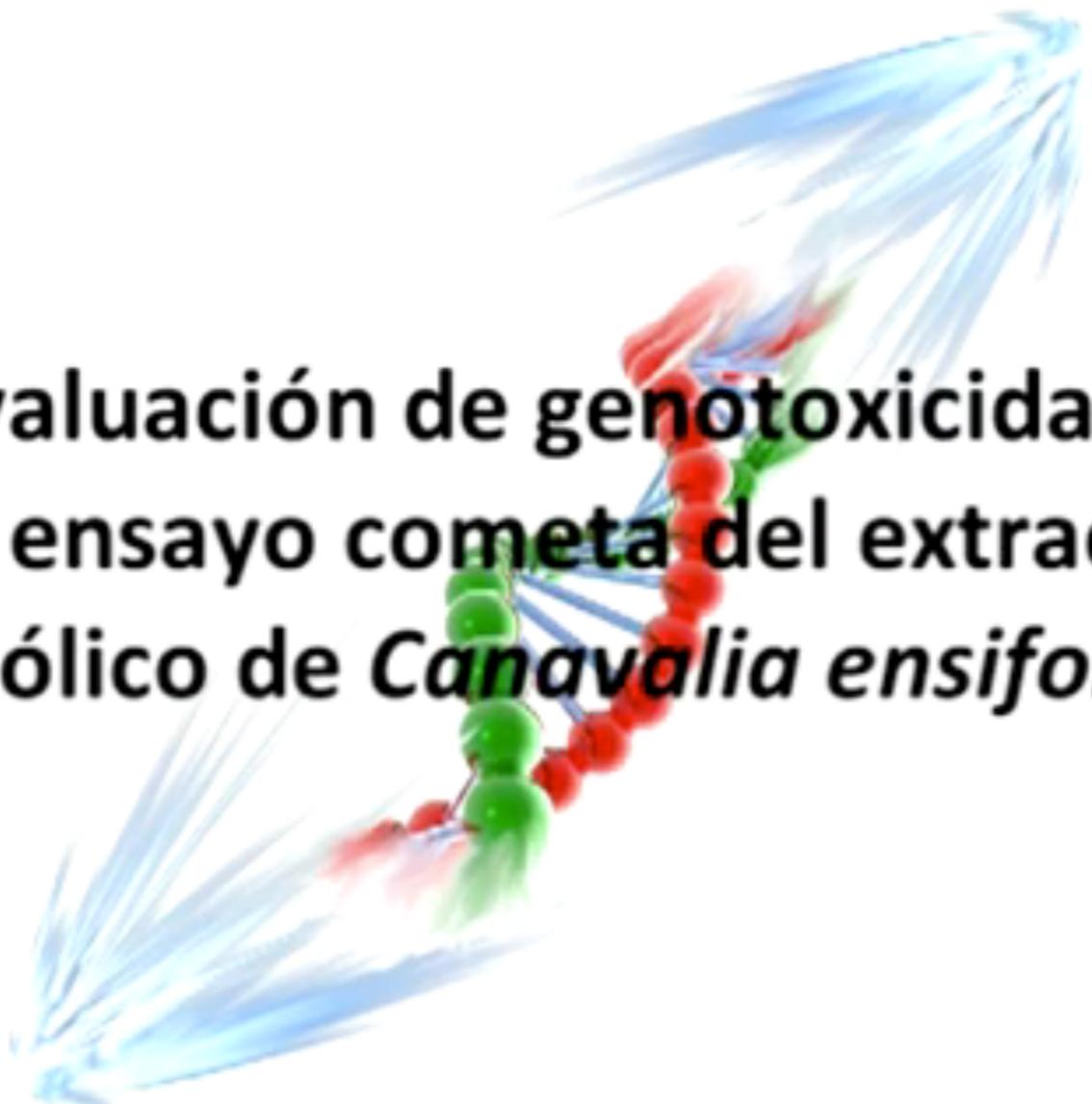
Tinción con Bromuro de etidio



Valores de referencia:
0-20 micras - sin daño-leve
21-40 daño medio
>40 - daño severo

Aplicaciones del ensayo cometa





Evaluación de genotoxicidad por ensayo cometa del extracto etanólico de *Canavalia ensiformis*