



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Monterrey

Efectos de la radiación visible en la estructura del
ADN



Tesis que presenta

Elisa Villa Martínez

para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas

Directora de Tesis:

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Apodaca, Nuevo León

Agosto 2018

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi periodo de estudios de maestría.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) Unidad Monterrey que me dio la oportunidad de estudiar y aportar a mi vida un ambiente académico tan agradable, así como a los profesores que contribuyeron en mi formación académica.

A mi directora de tesis, la Dra. Hilda J. Mercado Uribe por brindarme la confianza y el apoyo para realizar este proyecto.

Al M. en C. David Orozco y la QFB. Amelia Ríos por instruirme y brindarme su apoyo y conocimiento en algunas técnicas y procedimientos del laboratorio.

Al Dr. Carlos Ruiz y al Dr. Bruno Escalante por facilitarme el uso de sus laboratorios y reactivos que contribuyeron en gran medida a este proyecto.

A mis sinodales, el Dr. Daniel Sánchez y el Dr. Carlos Ruiz por sus comentarios y aportaciones a este trabajo de tesis.

A mis amigos y compañeros de la maestría con quienes he compartido grandes momentos, especialmente a Daniel, por estar siempre a mi lado motivándome y brindándome su apoyo incondicional.

Finalmente, quisiera darle un especial agradecimiento a mi familia. A mis padres, que son mi fuente de motivación e inspiración para superarme cada día, no sólo en el ámbito profesional, sino en mi formación como persona.

Glosario

Siglas y Abreviaciones (por su orden de aparición)

ADN	Ácido desoxirribonucleico
LEDs	Diodos emisores de luz
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ct-DNA	ADN de timo de becerro
LB	Luria- Bertani
ARN	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TE	Tris- EDTA
SSB	Rompimientos de simple cadena
DSB	Rompimientos de doble cadena

Constantes

c	Velocidad de la luz en el vacío	3×10^8 m/s
h	Constante de Planck	6.623×10^{-34} J · s

Variables

E	Energía del fotón	ΔT	Diferencia de temperatura
λ	Longitud de onda	ε	Coefficiente de extinción molar
A	Absorbancia	C_p	Capacidad calorífica específica
I_0	Intensidad de luz incidente	ΔH	Entalpía
I	Intensidad de luz transmitida	T_m	Temperatura de transición
l	Longitud de camino óptico	i_0	Intensidad de fluorescencia control
C	Concentración	i_v	Intensidad de fluorescencia verde

Contenido

Agradecimientos	ii
Glosario	iii
Resumen	viii
Abstract	ix
Capítulo 1 Introducción	1
1.1. Ácido desoxirribonucleico.....	1
1.1.1. Estructura y función.....	1
1.2. Interacciones físicas del ADN.....	3
1.3. Radiación electromagnética.....	4
1.3.1. Radiación ultravioleta y visible.....	5
1.4. Efectos de la luz UV en ADN	6
1.5. Antecedentes.....	7
1.6. Planteamiento del problema	10
1.7. Hipótesis.....	10
1.8. Objetivos	11
Capítulo 2 Materiales y Métodos	12
2.1. Muestras de ADN en solución acuosa	12
2.2. Irradiaciones de ADN	15
2.3. Espectroscopía UV-Visible	17
2.4. Calorimetría diferencial de barrido.....	18
2.5. Electroforesis en gel	20
Capítulo 3 Resultados	22
3.1. Efecto de la sonicación en ct-DNA	22
3.2. Análisis de la respuesta calorimétrica.....	24
3.3. Electroforesis en gel	30
3.4. Espectro de absorción	32

Capítulo 4	Discusión	34
Capítulo 5	Conclusiones	38
Capítulo 6	Perspectivas	39
Referencias	40

Índice de Figuras

1.1. Proceso fundamental de la transferencia de información en las células.....	1
1.2 Estructura del ADN.....	2
1.3. Niveles estructurales del ADN.....	3
1.4. Interacciones físicas del ADN.....	4
1.5. Espectro electromagnético.....	5
1.6. Mecanismos para la inducción de modificaciones en ADN causados por radiación UV.....	6
1.7. Electroforesis en gel de muestras de ADN expuestas a radiación.....	8
1.8. Espectro de absorción UV de muestras de ADN sujetas a diferentes condiciones de irradiación.....	8
1.9. Perfiles calorimétricos de (a) β_L -cristalina y (b) ovoalbúmina expuestas a luz roja (RL) y verde (GL) con diferentes intervalos de tiempo.....	9
2.1. Proceso de extracción del plásmido.....	13
2.2. Arreglo experimental para la irradiación de la muestra.....	16
2.3. Arreglo experimental para la irradiación con luz ultravioleta.....	16
2.4. Principio de funcionamiento del espectrofotómetro.....	17
2.5. Principio de funcionamiento de la calorimetría de barrido.....	19
2.6. Curva típica de un experimento de calorimetría.....	19
2.7. Proceso de electroforesis en gel.....	20
3.1. (a) Perfil calorimétrico para muestra sonicada y no sonicada en diferentes medios. (b) Análisis electroforético en un gel de agarosa de ct-DNA sujeto a 0 y 20 min de sonicación.....	23

3.2. Perfil calorimétrico para muestras irradiadas con luz verde por diferentes periodos de tiempo.	24
3.3. Perfil calorimétrico para muestra irradiada con luz verde por 2 h.....	25
3.4. Peso inicial y final de muestras irradiadas con luz verde por diferentes periodos de tiempo.	26
3.5. Perfil calorimétrico para muestras a diferentes concentraciones	27
3.6. Temperatura de agua irradiada con luz verde.	28
3.7. Peso inicial y final de muestras irradiadas con luz verde a diferentes intervalos de tiempo.....	28
3.8. Perfil calorimétrico para muestras irradiadas a diferentes intervalos de tiempo	29
3.9. Análisis electroforético en un gel de agarosa de ADN plasmídico sujeto a 0, 30 min, 1 h y 1.5 h de radiación UV-C	30
3.10. Análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.85% de ADN plasmídico sujeto a 25 min, 50 min, 2 h y 4 h de radiación UV-C.....	31
3.11. Diferencia en intensidad de fluorescencia de muestras irradiadas por diferentes periodos de tiempo y sus respectivos controles.....	32
3.12. Espectro de absorción de ADN plasmídico antes y después de ser irradiada con UV-C a diferentes intervalos de tiempo.....	32
3.13. Espectro de absorción de ADN plasmídico antes y después de ser irradiada con luz verde a diferentes intervalos de tiempo.....	33
4.1. Micrografías de plásmidos de ADN de doble cadena	36

Resumen

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula dentro de la cual se codifica toda la información genética de los seres vivos, cuya función radica en transmitir dicha información y almacenarla para construir otros componentes celulares como las proteínas. Existen varios factores por los cuales la estabilidad de esta molécula puede verse alterada, por ejemplo, al aplicar radiación electromagnética de longitudes de onda específicas. El ADN es una molécula blanco para radiaciones muy energéticas, tales como la radiación ionizante o la luz ultravioleta, que se sabe que dañan su estructura. Sin embargo, los efectos producidos por luz visible, en la cual este tipo de biomoléculas no absorben, también han sido objeto de estudio recientemente.

En el presente proyecto se estudiaron los efectos en la estructura del ADN producidos por la exposición a luz verde. Para esta finalidad, soluciones de ADN fueron expuestas individualmente a un arreglo de LEDs verdes, para posteriormente ser analizadas mediante distintas técnicas experimentales.

Los resultados obtenidos indicaron que el ADN no se ve alterado por la luz visible, en contraste con algunos resultados previamente publicados por otro grupo de investigación.

Abstract

Deoxyribonucleic acid, or DNA, is a molecule that contains all the genetic information of living organisms, whose function lies in transmitting and storing it for the synthesis of other cellular components such as proteins. Several factors can disturb the stability of this molecule, for example, by applying electromagnetic radiation of specific wavelength. DNA is a target molecule of very energetic radiations, such as ionizing radiation or ultraviolet light, which is known to damage its structure. However, effects produced by visible light, where this type of biomolecules do not absorb, have also been recently studied.

In the present project, effects on DNA structure produced by the green light exposure were studied. For this purpose, DNA solutions were individually exposed to a set of green LEDs, and later analyzed by different experimental techniques.

The obtained results indicated that visible light does not affect DNA, in contrast to previously published results by other research group.

Esta página ha sido dejada intencionalmente en blanco.

Capítulo 1

Introducción

Este capítulo proporciona una visión general de la naturaleza física y química del ADN que se encuentra presente en la mayoría de las células; asimismo se describen factores por los cuales puede verse afectada su estructura, como lo es la radiación electromagnética.

1.1. Ácido desoxirribonucleico

1.1.1. Estructura y función

El ácido desoxirribonucleico, o ADN, es un tipo de ácido nucleico dentro del cual se codifica toda la información genética de los seres vivos, cuya función radica en transmitir la información biológica y almacenarla para construir otros componentes celulares como las proteínas; durante este proceso, la información codificada en la secuencia del ADN se transcribe mediante la síntesis de una molécula de ARN y ésta a su vez se traduce a la secuencia de aminoácidos de una proteína (ver figura 1.1) [1-3].

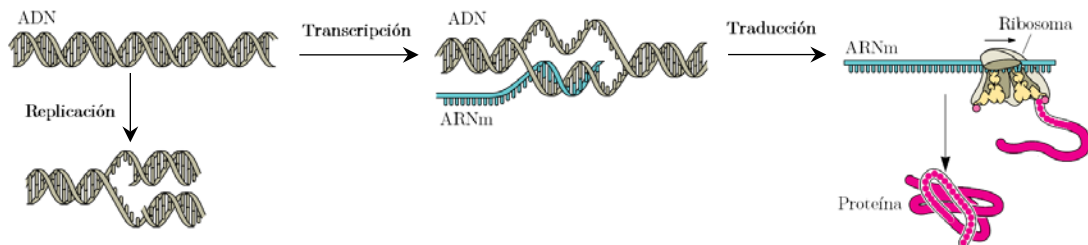


Figura 1.1: Proceso fundamental de la transferencia de información en las células [3].

Cuando una célula se divide, su doble cadena se separa en dos cadenas simples. Cada una de estas cadenas sirve de modelo para una nueva cadena complementaria de ADN; como resultado de este proceso conocido como replicación, cada célula tiene su propio genoma completo [3].

En la mayoría de las plantas y animales, el ADN se encuentra empaquetado con proteínas en estructuras compactas llamadas cromosomas que residen en el núcleo celular, mientras que en organismos procariontes como las bacterias, el ADN se encuentra en el citoplasma [4]. Algunos procariontes cuentan también con secuencias circulares más pequeñas denominadas plásmidos, que son distintos del ADN cromosomal y no son esenciales para su crecimiento normal. En el caso de las bacterias, cuando éstas se dividen, los plásmidos contenidos dentro de la célula se replican de manera que cada célula hija recibe una copia de cada plásmido. Frecuentemente, los genes transportados en los plásmidos proporcionan a las bacterias ventajas genéticas, como es el caso de la resistencia a antibióticos [5, 6].

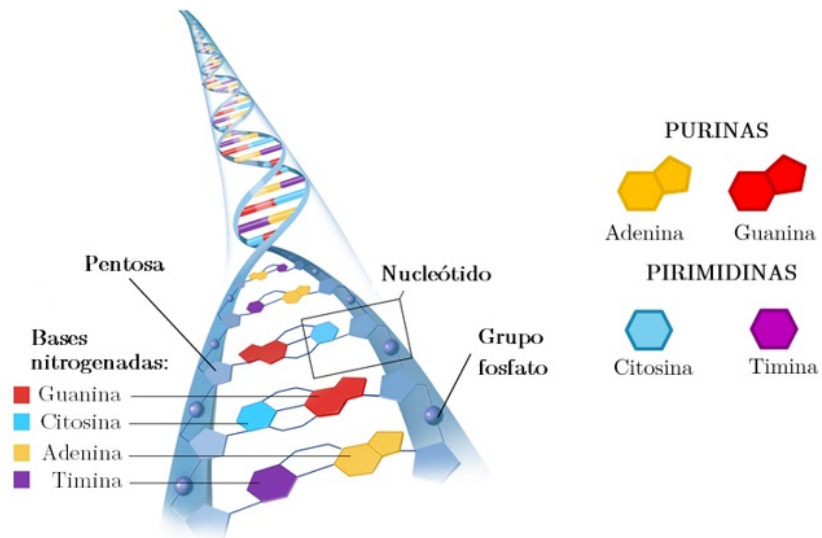


Figura 1.2: Estructura del ADN [7].

El ADN es una macromolécula de alto peso molecular, compuesto de subunidades denominadas nucleótidos. Cada nucleótido se encuentra conformado de una pentosa (desoxirribosa), un grupo fosfato, y una de las cuatro bases de carácter aromático: adenina (A) y guanina (G) que son bases púricas, y citosina (C) y timina (T) que son bases pirimídicas [8].

Este ácido nucleico consiste en dos hebras de polinucleótidos complementarios que giran alrededor de un eje común para formar una doble hélice. Las bases nitrogenadas ocupan el centro de la hélice, uniéndose mediante puentes de hidrógeno a las bases complementarias de la otra hebra (A con T y G con C). Las cadenas de azúcar y fosfato se enrollan sobre su periferia, lo que minimiza las repulsiones entre grupos fosfato cargados negativamente [9].

Como en el caso de las proteínas, se puede describir la estructura de los ácidos nucleicos en términos de niveles de organización (figura 1.3). La estructura primaria de un ácido nucleico se refiere a su estructura covalente y su secuencia de nucleótidos a lo largo de la cadena polinucleotídica. La estructura secundaria describe la serie de interacciones entre las bases, y es responsable de la forma que asume el ácido nucleico. La estructura terciaria implica una organización de los ácidos nucleicos en la que interactúan con otras moléculas para un plegamiento más complejo, por ejemplo en organismos eucariontes la unión con histonas, que son proteínas sobre las cuales se enrolla el ADN para formar la cromatina, y posteriormente los cromosomas [2, 10].

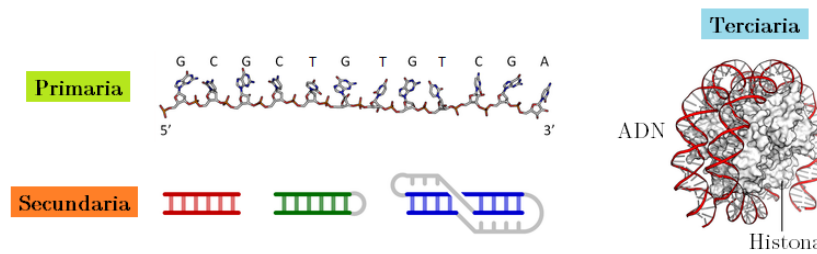


Figura 1.3: Niveles estructurales del ADN [11].

1.2. Interacciones físicas del ADN

La conformación del ADN en doble cadena con forma de hélice le proporciona estabilidad y al mismo tiempo, flexibilidad para cumplir su función biológica. Las bases púricas y pirimídicas son de carácter hidrofóbico, y son relativamente insolubles en agua al pH neutral de la célula. Para minimizar el contacto de las bases con el agua, existen dos modos de interacción de éstas en ácidos nucleicos. La primera involucra una combinación de interacciones dipolo-dipolo y van der Waals entre bases con los planos de sus anillos apilados de manera paralela. La

segunda involucra la formación de puentes de hidrógeno¹ entre las bases de las dos cadenas complementarias del ADN, en donde la adenina se une a la timina mediante un enlace doble, y la guanina a la citosina mediante un enlace triple como se observa en la figura 1.4. De esta manera, mientras mayor sea el número de pares G-C, mayor será la estabilidad de la molécula [2, 10].

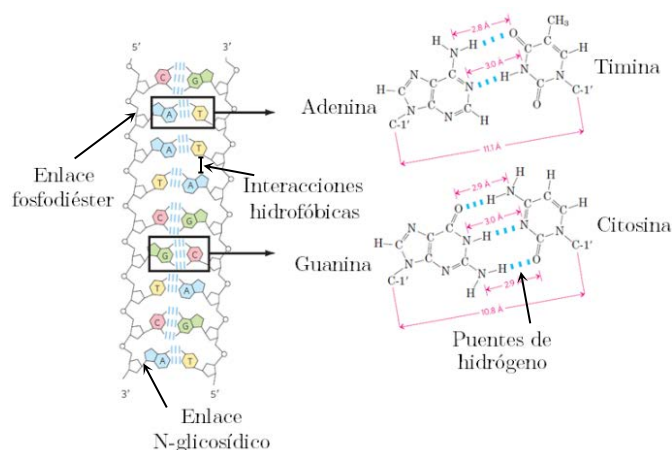


Figura 1.4: Interacciones físicas del ADN [2].

Las bases se unen a la pentosa mediante un enlace N-glicosídico (del tipo covalente), formando compuestos conocidos como nucleósidos. Éstos a su vez forman nucleótidos, donde el grupo fosfato se une a la pentosa a partir de un enlace fosfodiéster también de naturaleza covalente. Además de existir puentes de hidrógeno presentes entre las bases intercatenarias, también se forman entre el esqueleto azúcar-fosfato y las moléculas de agua circundantes, lo que proporciona mayor estabilidad a la estructura de la molécula [3].

1.3. Radiación electromagnética

La radiación electromagnética se encuentra formada por la combinación de campos eléctricos y magnéticos que se propagan a través del espacio en forma de ondas portadoras de energía.

¹ Interacciones entre un átomo de hidrógeno que está unido covalentemente a un átomo electronegativo (donador) con otro átomo electronegativo (aceptor) [12].

Cada longitud de onda tiene asociada una cierta energía determinada por la ecuación de Planck,

$$E = \frac{hc}{\lambda}, \quad (1.1)$$

donde E es la energía de los fotones con longitud de onda λ , c es la velocidad de la luz en el vacío y h la constante de Planck. De esta forma, mientras menor sea la longitud de onda, ésta tendrá asociada una mayor energía [13].

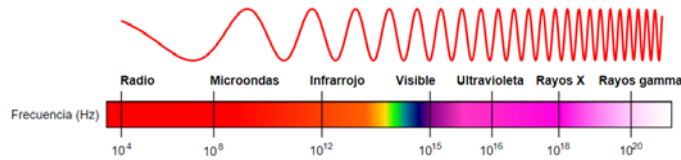


Figura 1.5: Espectro electromagnético [14].

El watt (W) es la unidad fundamental de la potencia de la radiación electromagnética, definida como el cambio en la energía por segundo. Cuando esta energía se propaga a través del espacio se le conoce como radiación y generalmente se mide en función de distribuciones espectrales, espaciales o temporales de la energía radiante, como por ejemplo la irradiancia, definida como el flujo radiante a través de una superficie por unidad de área perpendicular a una dirección específica, y se mide en W/m². Finalmente, la dosis (o fluencia), medida en función de la irradiancia, se define como la cantidad de energía radiante que llega por unidad de superficie, y generalmente se mide en J/m² [15].

1.3.1. Radiación ultravioleta y visible

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de radiación no ionizante que forma parte del espectro electromagnético y abarca la región entre 100 y 400 nm, y se divide en tres regiones: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (100-280 nm) [13, 16].

La fuente natural más importante de la radiación UV es el sol, pero debido a que la capa de ozono absorbe la mayor parte de la radiación UV-C, sólo la

radiación UV-A y UV-B son significantes. Además, la luz solar proporciona otros tipos de radiación, incluyendo infrarroja y visible.

La luz visible abarca todo el espectro que puede ser percibido por el ojo humano, y comprende longitudes de onda entre 400 y 700 nm siendo el menos energético el rojo, y el más energético, el azul.

1.4. Efectos de la luz UV en ADN

Es bien sabido que la radiación UV es capaz de producir efectos adversos en determinadas biomoléculas, tales como las proteínas y ácidos nucleicos [15]. Al igual que en el caso de radiación ionizante, el daño a la molécula del ADN puede deberse tanto a excitación directa, como a mecanismos indirectos que involucran la excitación de otros cromóforos celulares que generan especies reactivas de oxígeno (ROS). Como se puede observar en la figura 1.6, en la excitación directa predomina la formación de dímeros de bases pirimídicas, que surgen de la adición de dobles enlaces C=C entre dos bases de pirimidinas adyacentes; este tipo de modificaciones son causadas principalmente por radiaciones UV de alta energía (UV-B y UV-C).

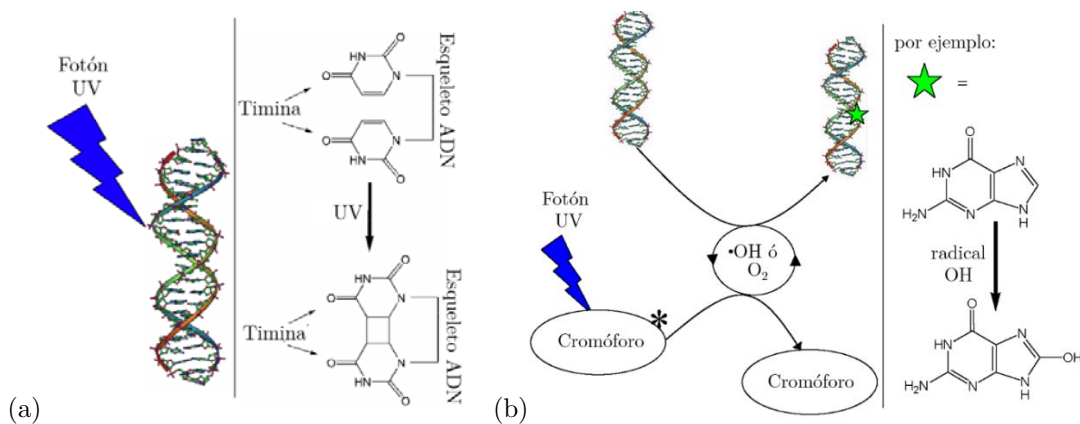


Figura 1.6: Mecanismos (a) directos y (b) indirectos para la inducción de modificaciones en ADN causados por UV [17].

Por otro lado, los mecanismos indirectos han sido observados más frecuentemente en radiaciones de menor energía. Cuando un fotón UV es absorbido por un cromóforo que no tiene la capacidad de convertir la energía muy rápidamente, aumenta su vida media de estado excitado, lo que conduce

a una alta probabilidad de reacciones con otras moléculas que pueden ocurrir ya sea entre el cromóforo excitado y el ADN, o el cromóforo y otras especies para producir radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) [18]. En un rango de radiaciones de menor energía como lo es la UV-A, la cual es absorbida en menor cantidad por el ADN, se han observado algunas modificaciones oxidativas causadas por la presencia de ROS tales como rupturas de cadena simples (SSB) y dobles (DSB), modificaciones en las bases, y uniones ADN-proteína [19, 20].

1.5. Antecedentes

Es bien conocido que la radiación UV daña estructuras biológicas. Sin embargo, los efectos producidos por luz visible, a la cual ciertas moléculas como las proteínas y el DNA no absorben, continúan siendo objeto de estudio.

Kielbassa *et al.* [19], analizaron los daños generados por radiación UV y visible en células de ovario de hámster. Cuantificaron las modificaciones al incubar el ADN celular irradiado a diferentes longitudes de onda de UV y visible en el rango del azul (290-500 nm), con distintas endonucleasas de reparación inmediatamente después de la lisis celular, mostrando en sus resultados que la luz azul tenía efectos dañinos en el material genético al existir un cambio de actividad de reparación presente a esa longitud de onda.

Incluso se ha demostrado que la radiación de menor energía en el rango del visible (roja y verde) tiene efectos en algunos organismos. Por ejemplo, Comorosan *et al.* [21] reportaron un posible mecanismo de neutralización de los efectos dañinos de la radiación UV en ADN y un efecto antioxidante en células expuestas a dosis letales de radiación UV, cuando era sometido a una irradiación simultánea con luz verde. Para ello realizaron experimentos que consistieron en estudiar grupos de muestras comerciales de ADN nativo (sin irradiar), ADN expuesto a radiación UV y luz verde simultáneamente, ADN expuesto a radiación UV, y ADN expuesto a luz verde. Con el fin de evaluar los posibles efectos, analizaron el ADN por medio de electroforesis en gel, cuyos resultados se muestran en la figura 1.7.



Figura 1.7: Electroforesis en gel de muestras de ADN expuestas a radiación bajo las siguientes condiciones: 1) control; 2) 40 min de UV simultáneamente con 40 min de luz verde; 3) 40 min de UV; 4) 50 min de UV; 5) 50 min de UV simultáneamente con 50 min de luz verde; 6) 50 min de luz verde [21].

En las muestras irradiadas con UV a diferentes tiempos de exposición (carriles 3 y 4), se observa que hay una degradación de las moléculas, mientras que las irradiaciones simultáneas con luz UV y verde (carriles 2 y 5) presentan una migración electroforética con un comportamiento similar al control (carril 1). Sin embargo, en la muestra de ADN expuesta solamente a luz verde (carril 6) se puede apreciar que existe una mayor intensidad que la banda de la muestra control, que los autores explican como un acoplamiento más fuerte con el marcador, sugiriendo modificaciones en el medio en el que se encuentran inmersas las moléculas de ADN. Para poder estudiar con mayor profundidad los resultados obtenidos, se realizaron análisis de absorbancia de las muestras sujetas a diferentes condiciones de irradiación, cuyos resultados presentados en la figura 1.8 muestran un aumento en la absorción cuando la muestra es sometida a luz verde (GL).

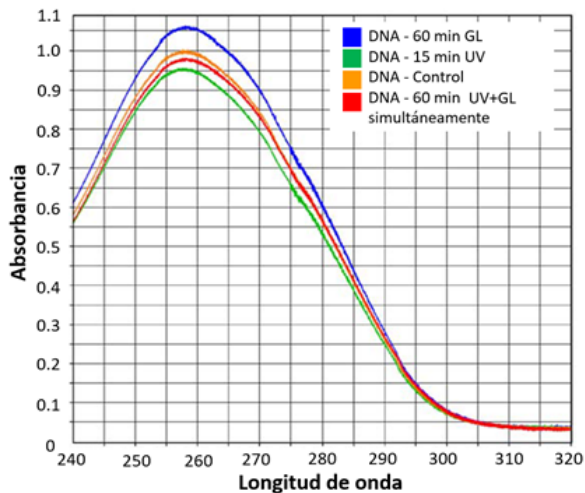


Figura 1.8: Espectro de absorción UV de muestras de ADN sujetas a diferentes condiciones de irradiación [21].

Los autores argumentan que la luz verde produce una alteración en la fluctuación de redes de clústers de agua, y que los radicales libres provocados por la radiación UV quedan aislados y fijos en la red, suponiendo así que los efectos protectores que atribuyen a la luz verde se deben a la dinámica del agua en la célula.

Por otra parte, Espinoza *et al.* [22] realizaron experimentos de irradiación con luz roja y verde a diferentes fluencias sobre dos proteínas diferentes (β_L -cristalina y ovoalbúmina), asociando los fenómenos observados a cambios estructurales y termodinámicos en las proteínas. Además, los autores observaron que al aumentar el tiempo de exposición a luz visible, ésta neutralizaba el efecto de la radiación UV-C al minimizar el cambio en la entalpía y, por lo tanto, el desplegamiento en proteínas globulares [23]. En la figura 1.9, se muestran los perfiles calorimétricos de las proteínas β_L cristalina y ovoalbúmina sometidas a diferentes condiciones de irradiación con luz roja (RL) y verde (GL).

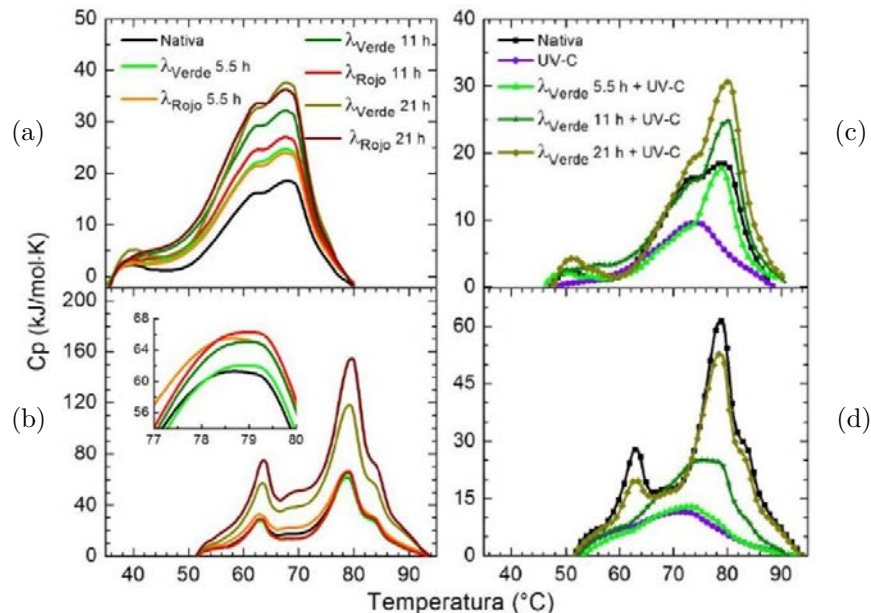


Figura 1.9: Perfiles calorimétricos de (a) β_L -cristalina y (b) ovoalbúmina expuestas a luz roja (RL) y verde (GL) con diferentes intervalos de tiempo. En la imagen derecha se muestran las proteínas β_L -cristalina (c) y ovoalbúmina (d) expuestas a luz verde previamente a la irradiación con UV [22, 23].

Es evidente de las figuras 1.9a y b que la irradiación a ambas longitudes de onda provoca un aumento en la entalpía (área bajo la curva) a medida que el tiempo de irradiación aumenta, indicando que es necesaria más energía térmica para cambiar la proteína al estado desplegado. En contraste con este efecto, se puede apreciar en las figuras 1.9c y d que cuando las muestras son irradiadas con ultravioleta, el área decrece notablemente. Sin embargo, cuando las proteínas se someten previamente a luz verde, se observa un posible efecto neutralizante del desplegamiento causado por la radiación ultravioleta.

A pesar de que existe una cantidad significativa de estudios experimentales sobre el efecto que tiene la radiación visible (particularmente verde) en algunos organismos y biomoléculas [21-28], no es claro el mecanismo responsable de los cambios observados con distintas técnicas experimentales, por lo que se han propuesto teorías. Teniendo como antecedentes los cambios conformacionales en proteínas globulares provocados por la luz visible, en este trabajo se planteó investigar el efecto que puede tener la luz verde en la estructura de la molécula portadora de la información genética necesaria para el funcionamiento y desarrollo de los seres vivos: el ADN.

1.6. Planteamiento del problema

Dado que el ADN es una molécula de vital importancia en la célula, cualquier alteración en su estructura implica un desorden en la función celular, por lo que se plantea estudiar si el efecto observado en los antecedentes mencionados es debido a una alteración en la estructura de la molécula en lugar de cambios en el medio en el que está inmersa.

1.7. Hipótesis

Nuestra hipótesis de trabajo es:

- La exposición a luz verde induce cambios en la estructura del ADN.

1.8. Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar el efecto en la estructura del ADN debido la exposición a luz verde.

Objetivos particulares:

- Evaluar la estructura del ADN a diferentes irradiancias y tiempos de exposición de luz verde y UV-C.
- Analizar la entalpía, absorbancia y tamaño del ADN cuando es sujeto a irradiación con luz verde.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

En este capítulo se describe el procedimiento detallado que se siguió para realizar los experimentos que consistieron en irradiar muestras de ADN bajo diferentes condiciones. También se dan a conocer las características de las técnicas y materiales que fueron utilizados.

2.1. Muestras de ADN en solución acuosa

Dos tipos de muestras de ADN fueron utilizadas en este estudio: ADN de timo de becerro (ct-DNA) de origen comercial (D1501, Sigma-Aldrich) de alto peso molecular y amplia distribución de tamaños, diluido en agua Mili-Q® a una concentración de 1.3 mg/mL y sonicado a un 50% de la potencia máxima del dispositivo durante 20 min, preparado en refrigeración mediante agitación suave por 18 h, y ADN plasmídico extraído de bacterias a partir de un kit de extracción (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN) basado en el método de extracción por columna, cuyo proceso se describe a continuación y puede observarse en la figura 2.1 [29].

Para comenzar, se crecieron 65 mL de cultivos bacterianos de *E. coli* de la cepa MG1655 K12 conteniendo el plásmido pUA66 con resistencia a kanamicina en un medio LB (Luria Bertani) con glucosa al 0.2% y 65 µL del antibiótico a 50 mg/mL durante 18 h a 37 °C con agitación a 200 rpm.

El cultivo bacteriano es sedimentado mediante centrifugación, se remueve el sobrenadante y las células son inmersas en el buffer de resuspensión, cuyos componentes desestabilizan las membranas lipídicas de las bacterias e inhiben la acción de las DNAsas, lo que previene la degradación del plásmido. Asimismo, la RNasa A contenida en el buffer degrada el ARN permitiendo aislar el ADN. Posteriormente el buffer de lisis es agregado a las células resuspendidas con el propósito de romper la membrana y liberar todo el contenido celular, incluyendo el plásmido de interés.

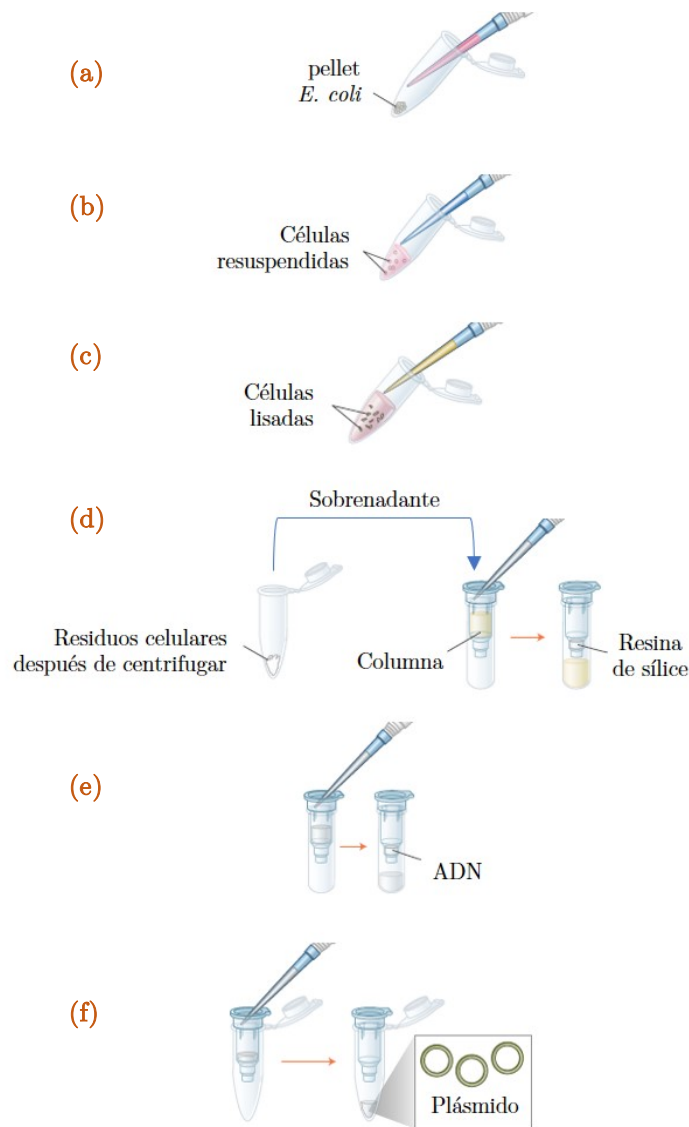


Figura 2.1: Proceso de extracción del plásmido: a) resuspensión de células, b) lisado celular, c) neutralización de lisado, d) unión del ADN del sobrenadante a la columna, e) lavado de columna y f) elución de ADN [30].

El SDS (Dodecilsulfato sódico) que contiene el buffer es un detergente que descompone la membrana lipídica, mientras que el NaOH ayuda a romper la pared celular bacteriana. La acción de estos productos químicos libera tanto el ADN genómico como el ADN plasmídico. Una vez que éste se encuentra en solución, el NaOH rompe los puentes de hidrógeno entre las bases del ADN, separándolo en cadenas simples.

Para neutralizar el pH y precipitar algunos contaminantes, se agregó el buffer de neutralización al tubo. Esta solución contiene una alta concentración de acetato de potasio y su función es, como su nombre lo indica, neutralizar las condiciones alcalinas creadas por el buffer de lisis, estableciendo un ambiente en el cual se pueden volver a formar los puentes de hidrógeno del ADN plasmídico y se disolverá fácilmente en solución, mientras que los tramos largos de ADN genómico bacteriano no podrán reasociarse ni disolverse. El acetato de potasio crea un entorno con alto contenido de sales, lo que precipita los restos celulares y el ADN genómico monocatenario. El ADN plasmídico permanecerá en el sobrenadante después de la centrifugación.

Posteriormente se hace pasar el sobrenadante a través de una columna con una membrana de sílice previamente tratada con isopropanol y guanidina HCl, lo que favorece la adhesión del plásmido a la sílice. El isopropanol disuelve sales y otros contaminantes.

Como siguiente paso, se lava la columna con un buffer a base de EtOH, el cual remueve las sales caotrópicas², más no interrumpe los enlaces entre el ADN plasmídico y la membrana de sílice. En este punto, el ADN se encuentra deshidratado y adherido a la columna, por lo que es necesaria la aplicación de un buffer acuoso para favorecer la elución del ADN plasmídico. Dependiendo del uso previsto, varios buffers acuosos pueden ser utilizados, ya sea agua Mili-Q®, TE o Tris-HCl; para nuestros fines fue utilizada agua Mili-Q®.

² Sustancia que influye en la organización de las moléculas de agua a través de sus enlaces de hidrógeno y la interacción de éstas con otros solutos como macromoléculas [31].

Para ambas muestras, la concentración de ácido nucleico fue determinada mediante absorbancia a 260 nm y la pureza a partir de la tasa A_{260}/A_{280} . Las muestras con una tasa de 1.8–2.0 fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.2. Irradiaciones de ADN

Las soluciones de ADN (1 mL de ct-DNA, y 50 μL de ADN plasmídico) fueron expuestas individualmente a las siguientes condiciones de irradiación, incluyendo un grupo control (sin irradiar):

- Irradiaciones con luz visible (verde)
- Irradiaciones con luz ultravioleta (UV-C)

Para el primer grupo, muestras independientes fueron irradiadas en el montaje experimental mostrado en la figura 2.2, que básicamente consiste en un arreglo de cuatro diodos emisores de luz (LEDs) de 10 W de potencia con longitudes de onda en el rango del verde (450-600 nm) conectados en paralelo a una fuente de voltaje DC (E3632A, Agilent) a 12 V y 1.42 A, montados sobre un disipador de aluminio y localizados a 2 cm de la muestra. El ventilador reduce la contribución de calor por parte los LEDs, y la temperatura es monitoreada con un termómetro digital con sonda. Adicionalmente se implementó un sistema de enfriamiento que consta de una celda Peltier unida a un disipador de calor con ventilador integrado. Fuera del alcance de los LEDs es colocada la muestra control.

La iluminancia emitida fue medida con un luxómetro Lutron LX-1108, registrando un valor de 2.19×10^5 lux. Asimismo, la irradiancia fue medida con un radiómetro digital (RM-21, Dr. Gröbel), registrando un valor de 165 W/m^2 . Las muestras fueron irradiadas por 0.42, 0.83, 2 y 4 h (equivalente a 247.5, 495, 1188 y 2376 kJ/m^2 , respectivamente). La temperatura de una muestra de agua fue monitoreada con un termopar NI USB-TC01 previamente a irradiar para observar posibles efectos por evaporación.

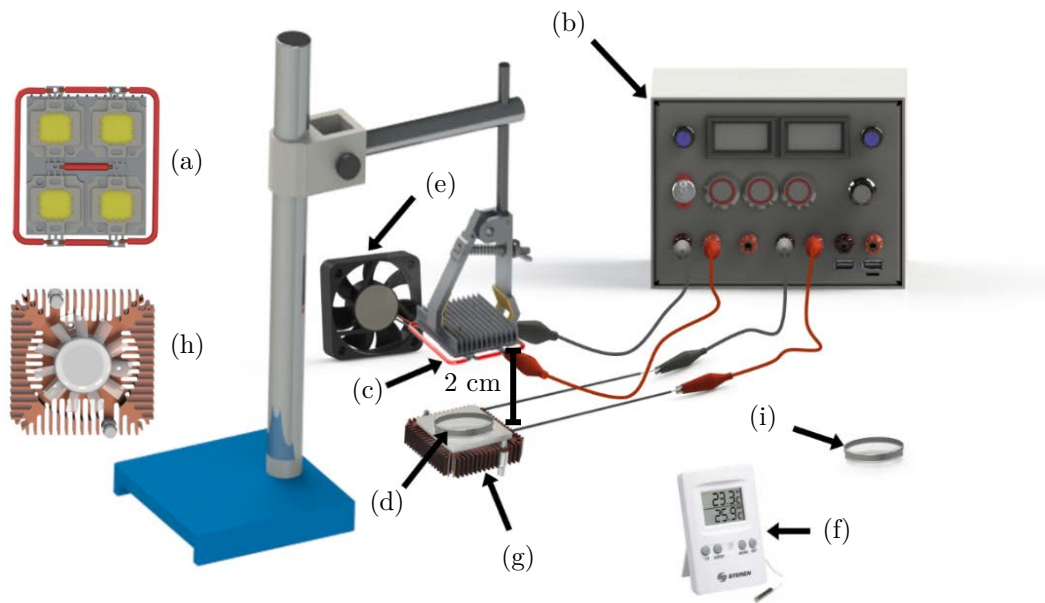


Figura 2.2: Arreglo experimental para la irradiación de la muestra con los siguientes componentes: (a) arreglo de LEDs, (b) fuente de voltaje, (c) disipador de aluminio, (d) muestra a irradiar, (e) ventilador, (f) termómetro digital con sonda, (g) celda peltier, (h) disipador de calor con ventilador integrado e (i) muestra control.

Debido a que los efectos de la luz UV en el ADN son ampliamente conocidos [19, 32-34], un segundo grupo de muestras fueron expuestas para evaluar su respuesta utilizando diferentes técnicas experimentales con el fin de confirmar y tener un control positivo. Para ello, una lámpara germicida de 30 W (G30T8, Sylvania) fue utilizada para irradiar con UV-C (254 nm) las soluciones de ADN colocadas a una distancia de 5 cm de la fuente de UV, a una irradiancia de 36 W/m^2 por 30 min, 1 y 1.5 h (equivalente a 64.8, 129.6 y 194.4 kJ/m^2 , respectivamente).

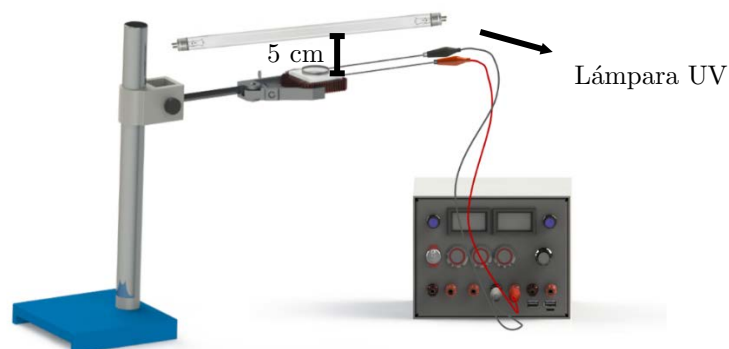


Figura 2.3: Arreglo experimental para la irradiación con luz ultravioleta.

Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (24 °C); posteriormente las muestras, controles e irradiadas, fueron almacenadas por 24 h a 4 °C previo a su análisis. Para cada experimento (verde y UV-C) se realizaron un total de 3 mediciones independientes, utilizando muestras de una misma solución stock bajo las mismas condiciones.

2.3. Espectroscopía UV-Visible

La espectroscopía de absorción relaciona la cantidad y el tipo de energía radiante absorbida por un material con su estructura o identidad, y es una de las herramientas más útiles en el estudio de la alteración estructural de ácidos nucleicos.

Un espectrofotómetro se utiliza para realizar mediciones de absorbancia. El instrumento produce luz de una longitud de onda deseada de acuerdo con la muestra a medir mediante un monocromador, hace pasar el haz a través de la muestra que se coloca en una celda de poliestireno, y mide la intensidad de la luz transmitida por la misma a través de un fotodetector, como es posible observar en la figura 2.4 [35].

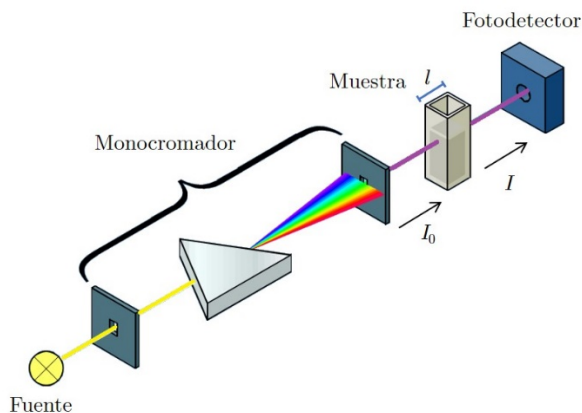


Figura 2.4: Principio de funcionamiento del espectrofotómetro [36].

De igual manera, es posible obtener la concentración de la muestra en función del valor de la absorbancia máxima a partir de la ley de Beer-Lambert

$$A_{\lambda} = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon Cl , \quad (2.1)$$

donde A es la absorbancia medida, I_0 es la intensidad del haz de luz incidente a una longitud de onda dada λ , I la intensidad de luz transmitida, l la longitud de camino óptico atravesada por la luz en el medio y C la concentración del absorbente en el medio. El término ε , definido como coeficiente de extinción molar, es una constante de proporcionalidad que define la eficiencia o el grado de absorción característico de cada material.

Los ácidos nucleicos absorben en la región del ultravioleta con una λ_{\max} de 260 nm principalmente debido a la presencia de anillos aromáticos en las bases púricas y pirimídicas. Medir la absorción ultravioleta de ácidos nucleicos en solución puede también proveer información adicional acerca de la pureza material a partir de la proporción A_{260}/A_{280} , donde un índice entre 1.8 y 2 indica un ADN puro libre o con baja presencia de proteínas [35, 37].

Con el propósito de proveer evidencia del posible efecto de la radiación en la estructura del ADN a diferentes irradiancias y tiempos de exposición, se midió el espectro UV-Vis de 2 μ L de una muestra de ADN nativa y de otras expuestas a luz visible y a radiación ultravioleta mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.4. Calorimetría diferencial de barrido

Cuando un material se calienta o enfría, sus propiedades físicas y químicas pueden sufrir cambios, que pueden ser medidos en función de la temperatura mediante análisis térmicos en condiciones experimentales controladas.

Un calorímetro diferencial de barrido mide la capacidad calorífica (C_p) y la entalpía (ΔH) en función de la temperatura. Durante el proceso de medición (figura 2.5), son utilizados calefactores individuales para inducir calor a una celda de referencia (solvente de la muestra) y a otra que contiene la muestra, de tal manera que si el sistema detecta una diferencia de temperatura (ΔT) entre ambas celdas, los calefactores individuales compensan la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas celdas; esta energía equivale a la cantidad de calor absorbido o liberado por la molécula en la muestra [38].

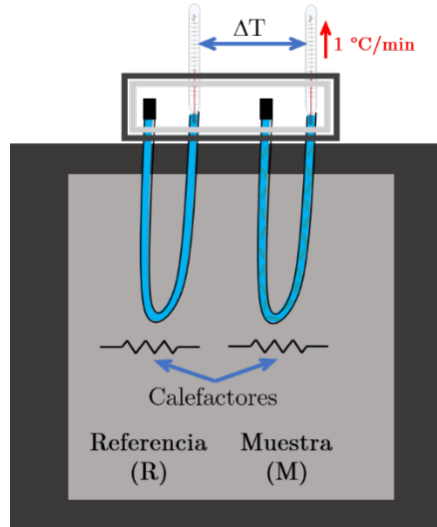


Figura 2.5: Principio de funcionamiento de la calorimetría diferencial de barrido [39].

Midiendo la C_p es posible obtener los cambios de fase en nuestro sistema tras ser perturbado; es decir, estimar la transición de desnaturalización de la molécula del ADN y analizar de qué manera cambia la estructura tras un proceso de irradiación [12].

El resultado es una curva como la que se puede observar en la figura 2.6, en la que se analizan tres parámetros de interés: la entalpía (ΔH) que corresponde al área bajo la curva, la temperatura de transición (T_m), y la capacidad calorífica máxima ($C_p^{\text{máx}}$).

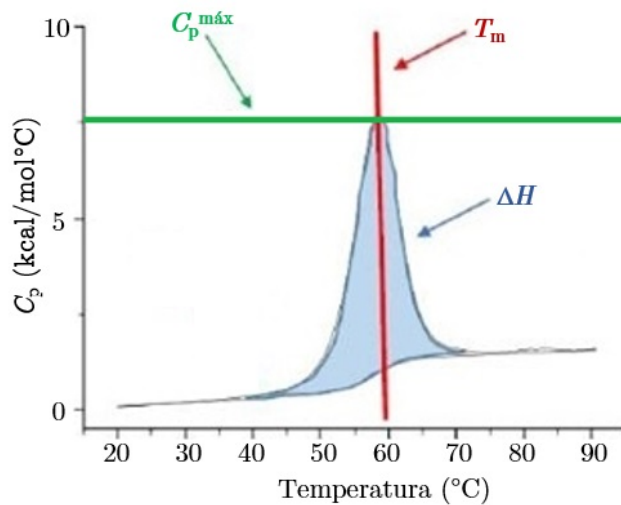


Figura 2.6: Curva típica de un experimento de calorimetría [40].

Con esta técnica, se obtuvieron los perfiles calorimétricos de las muestras control e irradiadas de ADN utilizando un microcalorímetro NanoDSC (TA Instruments). Las muestras fueron calentadas en un rango de temperaturas de 25 a 70 °C, con una presión constante de 3 atm y una tasa de calentamiento de 1 °C/min. Cabe destacar que las muestras no fueron desgasificadas para no comprometer la integridad de las mismas.

Los datos fueron analizados utilizando el software propio del calorímetro (NanoAnalyze, TA Instruments).

2.5. Electroforesis en gel

Los ensayos de electroforesis en gel son útiles para separar fragmentos ADN por su tamaño y evaluar la integridad de la muestra. Con base a su tamaño y carga, las moléculas se desplazarán por el gel a diferentes distancias (figura 2.7). Este método fue utilizado para analizar los resultados de las muestras irradiadas.

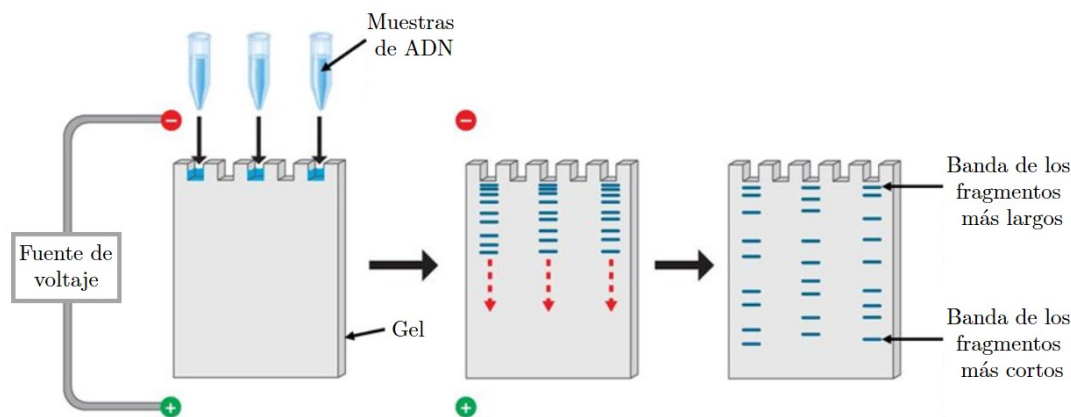


Figura 2.7: Proceso de electroforesis en gel [41].

El proceso consistió en lo siguiente: se preparó un gel de agarosa al 0.85% en un buffer de TBE. Un “peine” fue utilizado para hacer pozos dentro del gel durante su proceso de solidificación. Se mezclaron 20 μL de ADN a una concentración de 18 $\text{ng}/\mu\text{L}$ con 4 μL de colorante de carga (Blue/Orange Loading Dye 6x, Promega) y fueron cargados en los pozos del gel, que se corrió durante 50 min a 80 V. Posteriormente el gel fue colocado en una solución de

bromuro de etidio a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 10 min y se analizaron las bandas correspondientes del gel bajo luz ultravioleta. Los patrones fueron comparados un marcador de peso molecular comercial (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) con el fin de determinar el tamaño aproximado de las muestras.

Para analizar la intensidad de fluorescencia de las bandas observadas en el ensayo de electroforesis correspondientes a las muestras irradiadas con luz verde, se realizó un script en MATLAB[®] que básicamente binariza la imagen obtenida del gel y se utiliza como máscara para localizar los objetos distintos del fondo presentes en la imagen (en este caso las bandas). Posteriormente ubica los pixeles correspondientes a cada objeto y calcula el promedio de los mismos. De esta forma, es posible comparar la intensidad promedio de las bandas correspondientes a las muestras irradiadas con luz verde de cada tiempo de exposición con su respectivo control de cada imagen de manera independiente.

Capítulo 3

Resultados

Esta sección está dedicada a analizar los efectos producidos por la luz verde y ultravioleta en dos muestras de ADN de diferentes características mediante su respuesta calorimétrica, absorbancia y distribución de tamaños.

3.1. Efecto de la sonicación en ct-DNA

Como fue mencionado en la sección anterior, se trabajó con una muestra de ct-DNA de alto peso molecular que presentaba una amplia distribución de tamaños, debido a que habitualmente son utilizadas en estudios de hibridación y unión de ADN a agentes que modifican su estructura y función.

Con el propósito de trabajar con una ventana más limitada de tamaños, la muestra fue fragmentada mediante sonicación. Para ello, se evaluó el perfil calorimétrico para la muestra sonicada y no sonicada en agua Mili-Q® (figura 3.1a).

Previamente, dado que no se encontraron reportes previos acerca de ct-DNA en un medio únicamente de agua Mili-Q®, fue evaluado el perfil calorimétrico de la muestra de ct-DNA sin fragmentar inmerso en un buffer TE (Tris-EDTA). Los resultados indican que tanto la temperatura de transición como la forma de la curva de la muestra nativa coincide con las reportadas en estudios previos [42 - 44]. Podemos observar que el perfil calorimétrico característico exhibe cuatro subtransiciones que se deben a la diversidad de secuencias de los

diferentes tamaños, y cubre diferentes áreas debido a la frecuencia de secuencias particulares repetitivas correspondientes a moléculas de ADN con diferente contenido de pares de bases GC [44-46].

Posteriormente fue analizada la curva de calorimetría de la misma muestra solamente en agua. Se puede observar que tanto la temperatura de transición como la entalpía se modifican de acuerdo al cambio de medio. Estudios previos reportan que el pH del medio tiene una fuerte influencia en la temperatura de transición (T_m) y entalpía (ΔH), pues mientras menor sea el pH, menores serán estos parámetros [12]. Asimismo, es posible apreciar una diferencia en la forma y altura de los picos de la muestra sonicada respecto de la no sonicada, pues al modificarse los tamaños, de igual manera se ve alterada la proporción de las secuencias por el proceso de fragmentación, los cuales tienen una fuerte influencia en el perfil como fue mencionado anteriormente [47].

Estos resultados fueron confirmados por medio de ensayos de electroforesis (figura 3.1b), dado que los patrones observados en el gel indican que el tamaño de la muestra sonicada en comparación con el de muestra control se ve reducido, pues la intensidad de fluorescencia de la muestra sonicada (carril 3) disminuye notablemente con respecto del control (carril 2) hasta un tamaño máximo que se encuentra aproximadamente en 15 kb.

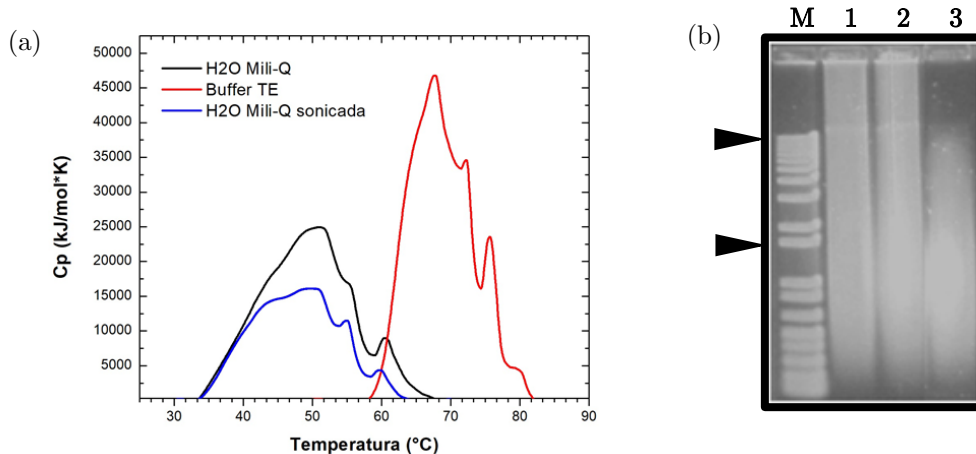


Figura 3.1: (a) Perfil calorimétrico para muestra sonicada y no sonicada en diferentes medios. (b) Electroforesis en un gel de agarosa al 0.85% de ct-DNA sujeto a 0 (carriles 1 y 2) y 20 min (carril 3) de sonicación. El carril M corresponde al marcador de peso molecular; las flechas indican las posiciones de los marcadores de 15 (superior) y 1.5 kb (inferior).

3.2. Análisis de la respuesta calorimétrica

En la figura 3.2a, se muestran los perfiles calorimétricos representativos para los experimentos de las muestras de ct-DNA expuestas a luz verde a dos intervalos de tiempo (25 y 50 min) llevados a cabo en ausencia del sistema de enfriamiento, así como de sus respectivos controles.

Es evidente que, en promedio, con 25 min de irradiación no se observan diferencias significativas en la entalpía entre la muestra irradiada y la control, en contraste con la muestra irradiada a 50 min, que presenta un notable aumento en la entalpía (figura 3.2b).

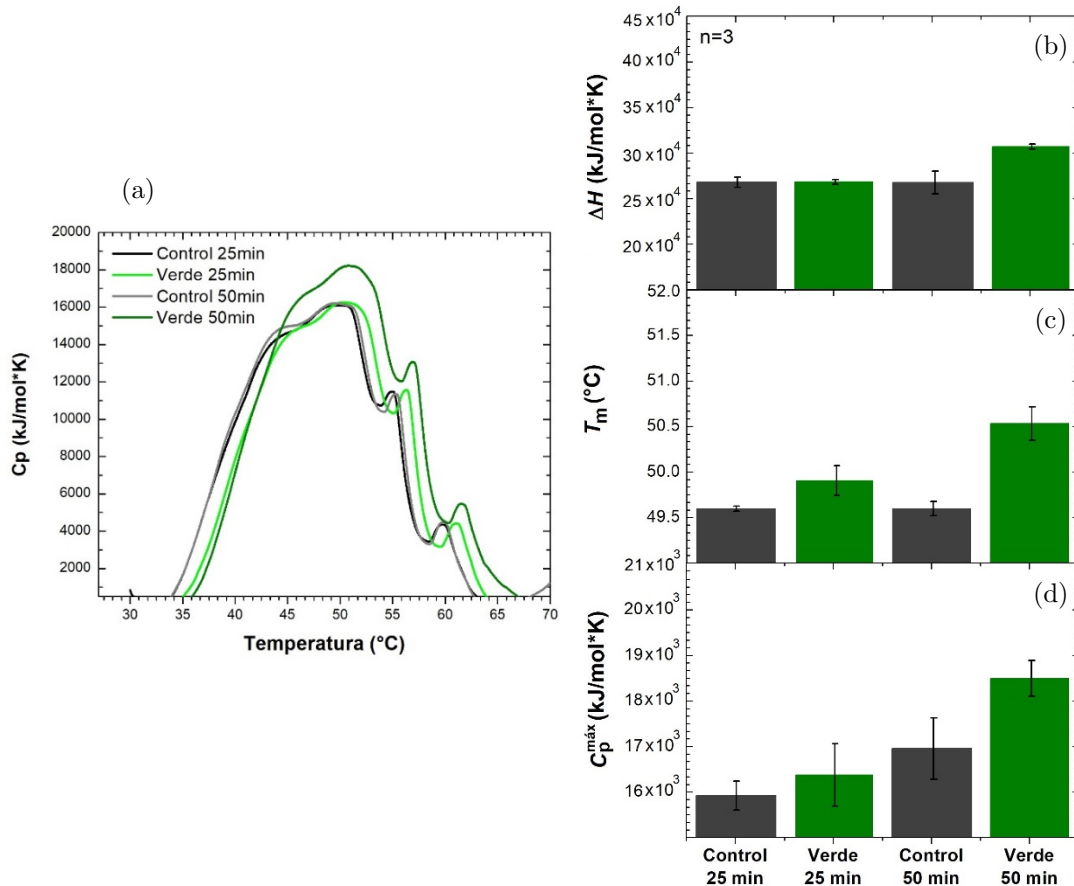


Figura 3.2: Perfil calorimétrico para muestras irradiadas con luz verde por diferentes periodos de tiempo. Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

Para el caso de la temperatura de transición, existen diferencias en ambos tiempos de irradiación respecto de su control y además existe un incremento en este parámetro que es proporcional al tiempo de irradiación (figura 3.2c). En el

caso de la capacidad calorífica máxima, no se observan diferencias entre la muestra irradiada a 25 min en comparación con su control, en contraste con la muestra irradiada a 50 min, que presenta un notable aumento respecto del control (figura 3.2d).

Estos resultados, en primera instancia ilustran que la luz verde induce cambios en las moléculas de ADN, con el consecuente aumento de la entalpía, temperatura de transición y capacidad calorífica máxima. Para evaluar si el efecto observado era más significativo cuando se aumenta el tiempo de exposición, éste incrementó a 2 h. Sin embargo, a este tiempo existían pérdidas importantes de volumen en la muestras irradiadas debido a la evaporación, por lo que se repuso este volumen con agua Mili-Q® hasta completar el faltante y el perfil calorimétrico fue analizado. En la figura 3.3 puede observarse que cuando se completa el volumen en la solución expuesta por 2 h, no se observan diferencias sustanciales entre la muestra irradiada respecto de su control en los parámetros que están siendo analizados. Esto nos hizo plantear la posibilidad de que existiera evaporación de las muestras en los otros dos tiempos de irradiación pese a que no eran perceptibles visiblemente.

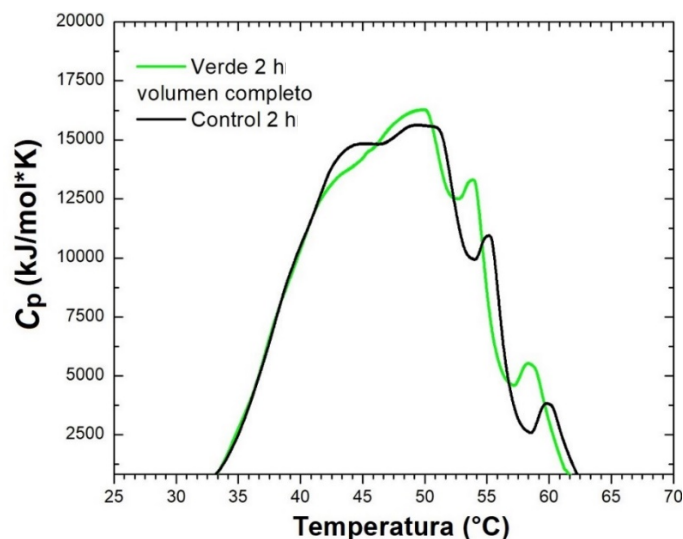


Figura 3.3: Perfil calorimétrico para muestra irradiada con luz verde por 2 h.

Con el propósito de evaluar posibles pérdidas de volumen de la muestra por evaporación, se analizó el peso para cada muestra antes y después de ser expuesta a luz verde. En la figura 3.4 se grafica el promedio del peso para un

total de tres muestras independientes en cada uno de los intervalos de tiempo de exposición. Puede observarse que entre los controles no existe una diferencia significativa entre el inicio y final de la irradiación, en comparación con las muestras irradiadas que presentan una pérdida en el peso, y que además esta disminución es proporcional al tiempo de irradiación.

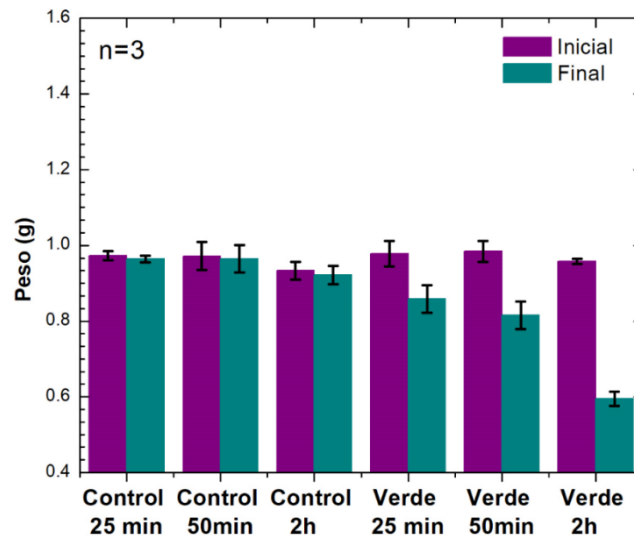


Figura 3.4: Peso inicial y final de muestras irradiadas por diferentes periodos de tiempo. Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

Para relacionar la contribución de modificaciones en la concentración por evaporación con los resultados previamente discutidos, fue analizado el comportamiento de los perfiles calorimétricos de soluciones de ct-DNA sin irradiar a cinco diferentes concentraciones, y es evidente que conforme aumenta la concentración comenzamos a ver diferencias sustanciales en la respuesta calorimétrica, pues aumenta la entalpía. Se puede apreciar una tendencia similar con la temperatura de transición y la capacidad calorífica específica; esto se ve reflejado en los promedios de estos parámetros (figuras 3.5b, c y d).

Por ello se buscó eliminar el factor de la evaporación para evaluar si el efecto aún era significativo, por lo que fue implementado el sistema de enfriamiento descrito en la sección anterior; esto permitió controlar la temperatura del sistema. Para evaluar su eficiencia, se midió la temperatura de 1 mL de agua en una caja Petri mientras era irradiada en nuestro arreglo de LEDs, por un periodo de aproximadamente 90 min.

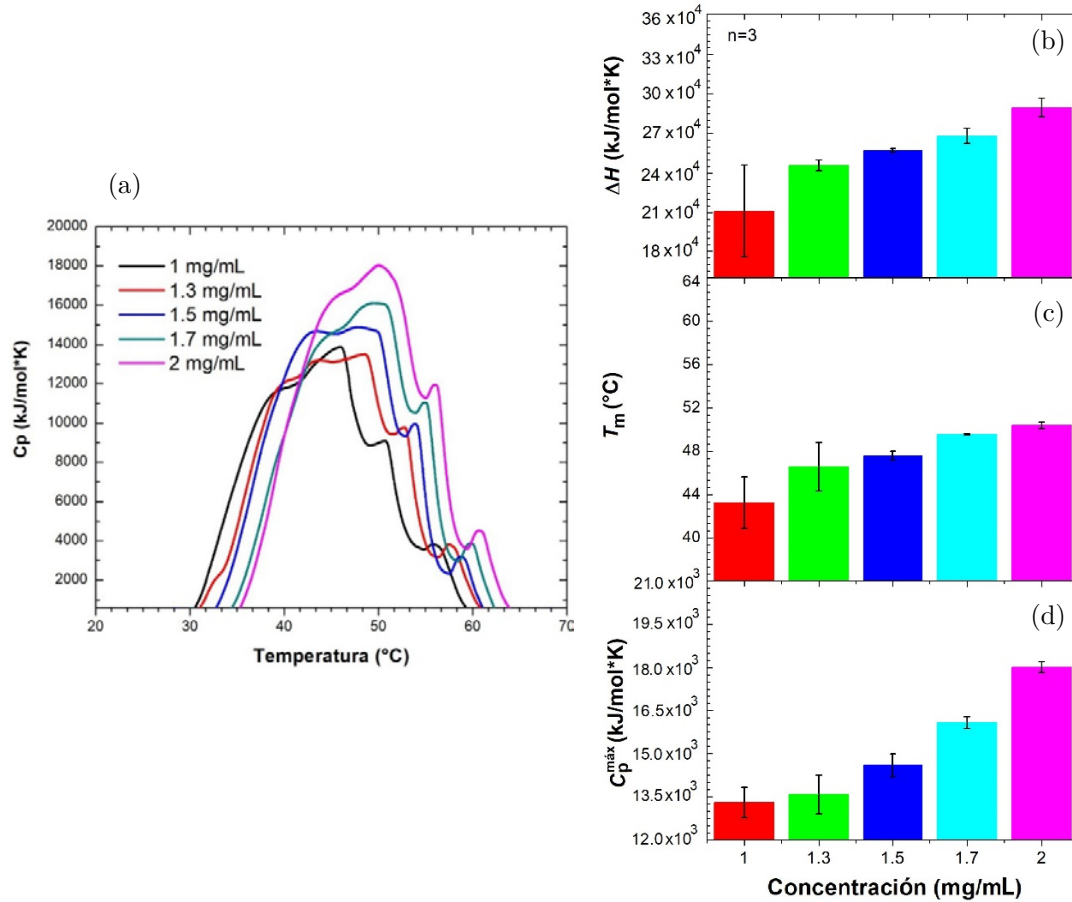


Figura 3.5: Perfil calorimétrico para muestras a diferentes concentraciones. Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

Se aprecia claramente en la figura 3.6 como la temperatura aumenta conforme pasa el tiempo en ausencia del sistema de enfriamiento, en contraste con la del sistema con celda Peltier, donde oscila entre 24 y 25 $^{\circ}$ C y se estabiliza pasado un tiempo de 6 min aproximadamente.

Posteriormente con el sistema de enfriamiento implementado, fueron irradiadas muestras de ct-DNA a diferentes intervalos de tiempo, e incluso fue posible aumentar el tiempo de irradiación hasta un periodo de 4 h. De igual manera que el procedimiento anterior, se evaluaron los pesos antes y después de irradiar cada una de las muestras (ver figura 3.7). De aquí se puede notar que las pérdidas de volumen se redujeron considerablemente, es decir, no existen diferencias significativas entre las muestras irradiadas a diferentes tiempos y sus respectivos controles.

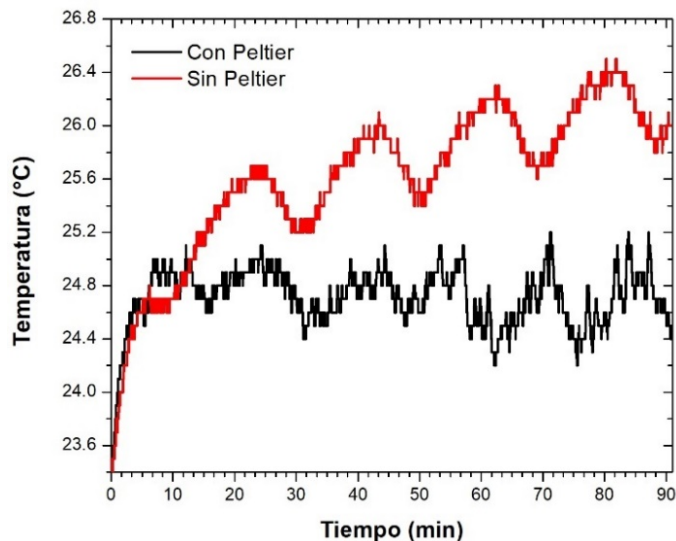


Figura 3.6: Temperatura de agua irradiada con luz verde.

A continuación, nos dimos a la tarea de examinar de nuevo la respuesta calorimétrica dejando de lado la contribución por parte de la evaporación. En promedio para la entalpía no se observaron diferencias sustanciales entre ninguno de los tiempos de irradiación y sus respectivos controles. De igual manera para la temperatura de transición, y la capacidad calorífica máxima (figuras 3.8b, c y d). Esto se puede apreciar mejor en las curvas representativas de la figura 3.8a; conforme el tiempo de irradiación es aumentado, no se observan cambios significativos en la respuesta.

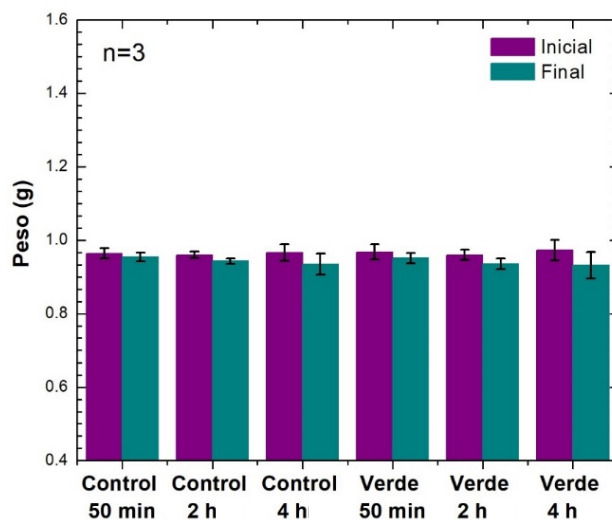


Figura 3.7: Peso inicial y final de muestras irradiadas a diferentes intervalos de tiempo.

Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

Cabe señalar que los resultados obtenidos contrastan con los encontrados por Comorosan *et al.* [21]; sin embargo, es importante mencionar que en sus estudios reportan indicios de evaporación. Por lo que en este trabajo se optó trabajar con una muestra de características lo más parecidas posible y en condiciones similares para discernir si los efectos observados por Comorosan *et al.* pudieran deberse o no a modificaciones en la concentración.

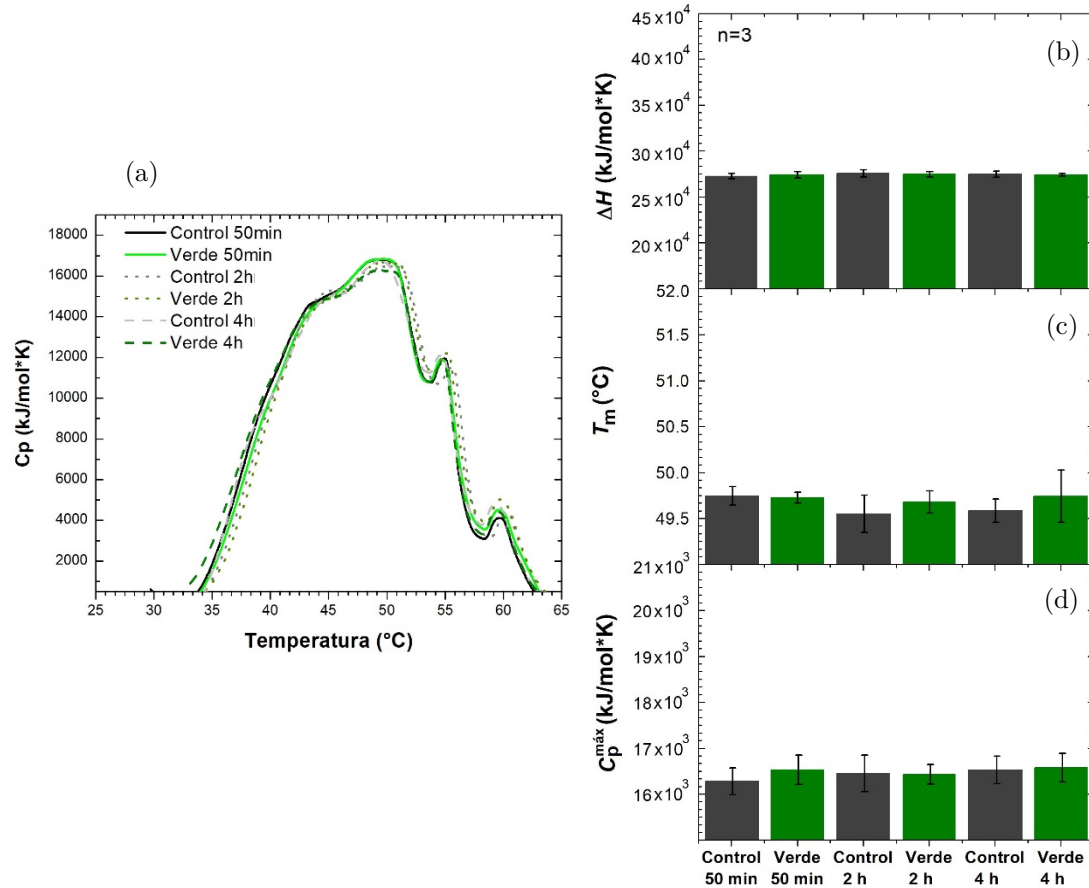


Figura 3.8: Perfil calorimétrico para muestras irradiadas a diferentes intervalos de tiempo.

Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

Finalmente, es preciso aclarar que no fue posible analizar muestras de ADN plasmídico mediante esta técnica debido a que las concentraciones para realizar este tipo de ensayo son muy elevadas en comparación a las que se pueden obtener por el método de extracción mencionado anteriormente.

3.3. Electroforesis en gel

El ADN plasmídico aislado de bacterias expuesto a tiempos de exposición de UV-C de 30 min, 1 h y 1.5 h (correspondiente a 64.8, 129.6 y 194.4 kJ/m², respectivamente) y luz verde de 0.42, 0.83, 2 y 4 h (correspondiente a 247.5, 495, 1188 y 2376 kJ/m², respectivamente), fue sometido a ensayos de electroforesis a través de un gel de agarosa.

En la figura 3.9 son mostrados los tratamientos con UV-C, que dieron como resultado una inducción dependiente del tiempo de rompimientos de ADN de doble cadena (DSB) para un tiempo de 1 h, que se manifestó como un barrido de intensidad de fluorescencia muy tenue (carril 4) a tamaños moleculares progresivamente inferiores a 1.5 kb que se desvanece completamente al aumentar el tiempo de exposición a 1.5 h (carril 5), en comparación con el control.

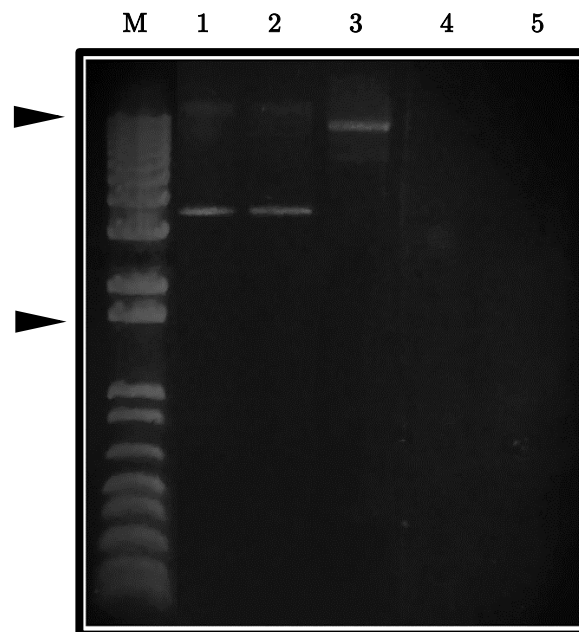


Figura 3.9: Análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.85% de ADN plasmídico sujeto a 0 (carriles 1 y 2), 30 min (carril 3), 1 h (carril 4) y 1.5 h (carril 5) de radiación UV-C. El carril M corresponde al marcador de peso molecular; las flechas indican las posiciones de los marcadores de 15 (superior) y 1.5 kb (inferior).

Sin embargo, un resultado diferente es obtenido al irradiar por 30 min (carril 3), pues la muestra control migra más rápido en el gel que las moléculas

de ADN irradiadas con UV-C posiblemente debido a modificaciones en su conformación, mismas que serán discutidas más adelante.

Por otro lado, los resultados obtenidos con luz verde no arrojan diferencias entre la migración o forma de ninguna de las bandas de las muestras irradiadas y sus respectivos controles (ver figura 3.10).

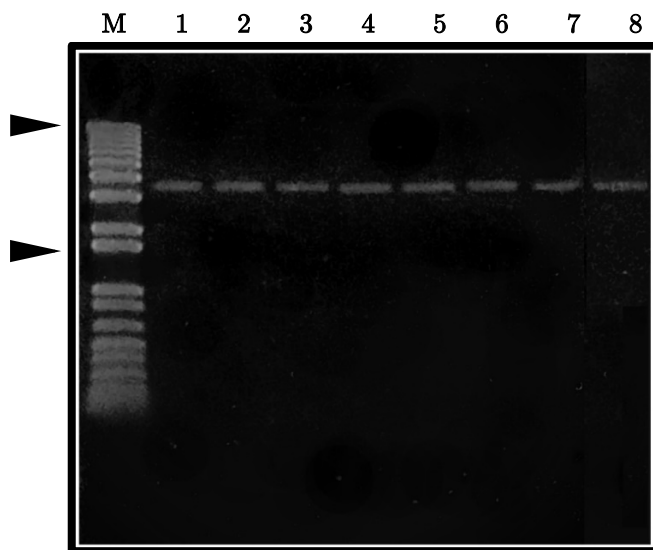


Figura 3.10: Análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.85% de ADN plasmídico sujeto, 25 min (control: carril 1, irradiado: carril 5), 50 min (control: carril 2, irradiado: carril 6), 2 h (control: carril 3, irradiado: carril 7), y 4 h (control: carril 4, irradiado: carril 8) de radiación UV-C. El carril M corresponde al marcador de peso molecular; las flechas indican las posiciones de los marcadores de 15 (superior) y 1.5 kb (inferior).

No obstante, se realizaron análisis adicionales de la intensidad de fluorescencia de las bandas del gel por medio del procesamiento de imágenes descrito en la sección anterior. La figura 3.11 muestra los valores de la diferencia entre la intensidad de fluorescencia de cada una de las muestras irradiadas con luz verde a diferentes periodos de tiempo y sus respectivos controles ($i_v - i_0$) para un promedio de tres imágenes de experimentos de electroforesis en gel; una barra con valor negativo implica que la intensidad de fluorescencia de la muestra control resultó ser mayor a la de la muestra irradiada. En promedio, los resultados indican que no existen diferencias entre ninguno de los tiempos de exposición, y estas diferencias son de menor magnitud en comparación a los resultados reportados por Comorosan *et al.* [21].

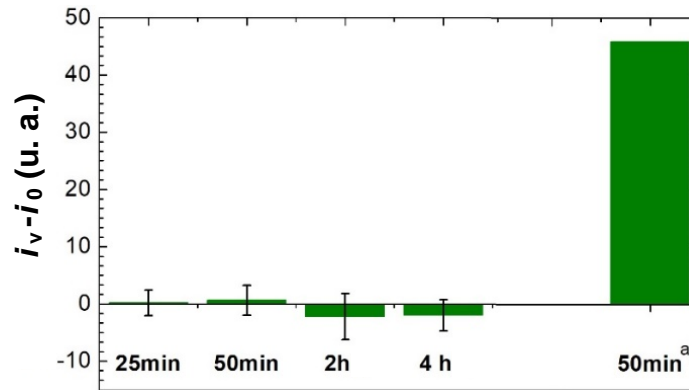


Figura 3.11: Diferencia en intensidad de fluorescencia de muestras irradiadas por diferentes periodos de tiempo y sus respectivos controles. Los datos representan el promedio \pm SD, $n=3$.

^a Análisis de imagen del gel obtenido por Comorosan *et al.* [21], $n=1$.

3.4. Espectro de absorción

Para obtener la absorbancia del ADN sujeto a diferentes condiciones de irradiación, realizamos espectroscopía UV-vis en el ADN plasmídico obtenido de bacterias *E. coli* antes y después de las exposiciones. La figura 3.12 muestra los espectros UV-vis de las muestras de ADN expuestas a 30 min, 1 h y 1.5 h de radiación UV-C y revela una clara modificación con un decrecimiento significativo de la absorbancia máxima a 260 nm, y además, esta disminución es proporcional al tiempo de irradiación.

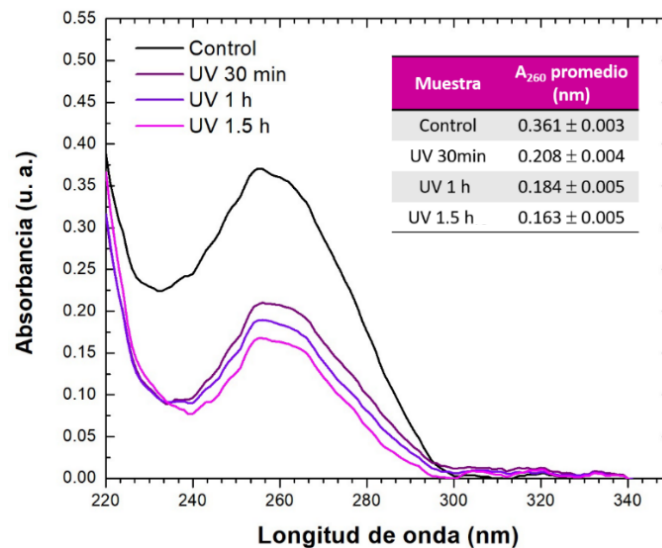


Figura 3.12: Espectro de absorción de ADN plasmídico antes y después de ser irradiado con UV-C a diferentes intervalos de tiempo.

Por el contrario, en todos los casos de los experimentos con luz verde se observaron espectros de absorción casi idénticos para las muestras irradiadas a diferentes intervalos de tiempo (figura 3.13). Las pequeñas cantidades de ADN disponibles de cada muestra requirieron la dilución de la solución stock disponible, dando como resultado señales de absorción relativamente bajas y con un poco de ruido. Asimismo, se puede observar que el valor de la absorbancia es proporcional al tiempo de exposición tanto para las muestras irradiadas como para los controles, como consecuencia de la evaporación (esto se ve mejor reflejado en los promedios).

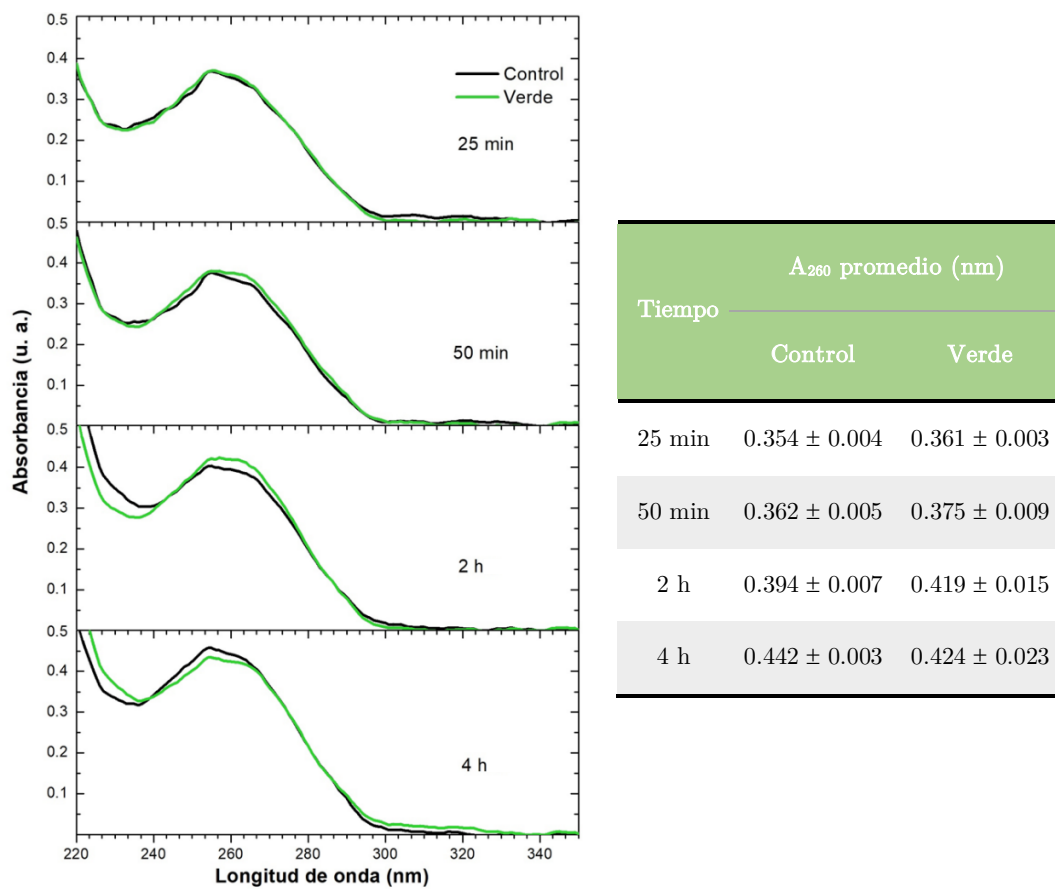


Figura 3.13: Espectro de absorción de ADN plasmídico antes y después de ser irradiado con luz verde a diferentes intervalos de tiempo.

Capítulo 4

Discusión

Esta sección está dedicada a analizar los resultados previamente presentados de este proyecto.

4.1. Discusión

En este proyecto se estudiaron los efectos de la luz verde en dos muestras de ADN estructuralmente diferentes. Los resultados obtenidos muestran que, bajo las condiciones trabajadas, este tipo de radiación no produce modificaciones de ninguna índole en ambas muestras, en contraste con estudios previamente reportados. No obstante, existen parámetros para los cuáles pueden verse alteradas las mediciones, en específico para este trabajo la concentración de la muestra.

De acuerdo con los experimentos de calorimetría, un aumento en la concentración por evaporación deriva en una modificación de los perfiles calorimétricos, presuntamente causado por la alteración de las concentraciones de sales en la solución debido a la presentación en sal sódica de la muestra. Según reportes previos, se ha visto que la concentración de Na^+ influye fuertemente en la posición y forma de la curva calorimétrica [48, 49]. La T_m disminuye con un decremento en la concentración de sales; parte de la energía necesaria para romper los puentes de hidrógeno y cualquier otra fuerza de

interacción entre las bases es proporcionada por la repulsión mutua de los grupos fosfato cargados negativamente a lo largo del esqueleto del ADN. Dado que las cargas de los fosfatos son más débilmente contrarrestadas por contraiones en menor concentración de sal, existe mayor energía repulsiva. Por lo tanto, se requiere menor energía térmica para separar la doble cadena. Por el contrario, si se tiene una mayor concentración de sales, se necesita mayor cantidad de energía para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas las cadenas del ADN, pues las cargas de los fosfatos se ven disminuidas por los contraiones y hay menor energía repulsiva [50].

Otra posible explicación a la alteración de la señal calorimétrica es debido a modificaciones en el pH dependientes de la concentración de moléculas de ADN. Adicionalmente, en la Tabla 4.1 se muestra la relación de proporcionalidad del pH medido con diferentes concentraciones de soluciones de ct-DNA, de manera que es posible establecer una relación directa entre el pH del ADN en solución con las modificaciones observadas tanto en la T_m como la ΔH , con una tendencia similar a la reportada teóricamente debido a la protonación-deprotonación de las moléculas de ADN [12].

Tabla 4.1: pH de las muestras de ADN a diferentes concentraciones.

C (mg/mL)	pH
1.0	6.07 ± 0.06
1.3	6.18 ± 0.07
1.5	6.30 ± 0.20
1.7	6.32 ± 0.05
2.0	6.47 ± 0.22

De cualquier modo, cabe destacar que sin la contribución del factor de la evaporación, no se observaron diferencias relevantes entre las muestras irradiadas y sus respectivos controles para ninguna de las técnicas de estudio.

Por otra parte, se encuentra bien establecido que la radiación UV-C produce alteraciones en la estructura del ADN, tales como rompimientos de simple (SSB) y doble (DSB) cadena y dímeros de pirimidinas, mismas que pueden observarse en los resultados obtenidos en ADN plasmídico. Los ensayos electroforéticos revelan que cuando la muestra es irradiada a bajas dosis (30 min), las moléculas de ADN migran más lento a través del gel en comparación a la muestra control como consecuencia de SSB causados por la radiación UV-C. Este fenómeno es posible de observar en el gel, debido a la característica de superenrollamiento del plásmido en solución (ver figura 4.1), dado que su estructura es muy sensible a condiciones ambientales.

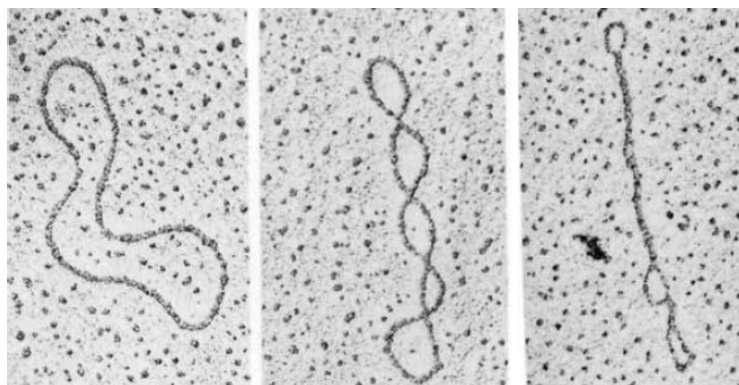


Figura 4.1: Micrografías de plásmidos de ADN de doble cadena. Su conformación varía desde ADN relajado (izquierda) hasta superenrollado (derecha) [9].

Incluso, basta con la introducción de un SSB para que el plásmido superenrollado modifique inmediatamente su estructura y tome una forma topológicamente más relajada. Debido a su tamaño compacto, los plásmidos superenrollados migran más rápido que un plásmido relajado que genera más fricción al pasar a través de los poros del gel [2, 51, 52]. Estos resultados son consistentes con los observados mediante Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) por Jiang *et al.* [53].

Similarmente, un DSB abriría el plásmido para convertirlo a su forma lineal, de manera que si aumenta el número de DSBs, se producirá una fragmentación del plásmido generando moléculas de menor tamaño en comparación con la

longitud original, que es lo observado en nuestros resultados a dosis mayores con tiempos de 1 y 1.5 h en consistencia con lo reportado por Jiang *et al.* [53].

Para validar las alteraciones causadas por radiación UV-C observadas mediante electroforesis, fueron realizadas mediciones de absorbancia. Como fue posible observar en la sección de resultados (figura 3.12), se aprecia una clara disminución en la absorbancia máxima que es dependiente del tiempo de exposición en comparación con la muestra control. Esto concuerda con lo reportado en estudios previos [21, 54]; sin embargo, el mecanismo por el cual la absorbancia se ve reducida cuando se irradia con UV-C no es muy claro dado que no se encontraron reportes al respecto.

Finalmente, es preciso mencionar que los efectos producidos por dosis más bajas de UV-C como las trabajadas por Comorosan *et al.* [21], no fueron perceptibles en las técnicas de estudio, posiblemente por las diferencias entre las muestras y condiciones de trabajo, por lo que sería interesante establecer si existe alguna relación entre el tamaño de las moléculas de ADN, la concentración y las dosis utilizadas.

Capítulo 5

Conclusiones

En este capítulo se presentan las conclusiones sobre los resultados discutidos en el capítulo anterior.

5.1. Conclusiones

Nuestros resultados muestran que, bajo las condiciones trabajadas, en las muestras irradiadas con luz verde a diferentes dosis no se producen alteraciones en las moléculas de ADN. Estos resultados contrastan con lo observado en reportes previos [21], en donde el efecto obtenido fue explicado como una posible alteración del medio donde se encontraban inmersas las moléculas de ADN.

Por otro lado, los resultados obtenidos con radiación UV-C coinciden con lo reportado previamente en la literatura.

Capítulo 6

Perspectivas

En base a los resultados obtenidos en este proyecto de tesis, se exponen algunas perspectivas en esta sección.

6.1. Perspectivas

- Irradiar con diferentes concentraciones de ADN, para evaluar si la concentración influye en el efecto observado.
- Exponer las muestras por periodos de tiempo superiores a los usados en este trabajo, con el fin de indagar si existe una relación entre el efecto y la dosis.
- Irradiar con muestras de tamaño uniforme, diferentes a las estudiadas en este trabajo con el fin de valorar si el tamaño de la molécula influye en los resultados obtenidos.
- Irradiar las mismas muestras de ADN con luz azul bajo las mismas condiciones de emisión, para fines comparativos.

Referencias

- [1] Y. Maréchal, *The Hydrogen Bond and the Water Molecule*, Elsevier, 2007, pp. 41-47.
- [2] A. L. Lehninger, D. L. Nelson y M. M. Cox, *Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, 2008, pp. 281-308.
- [3] R. H. Garret, *Biochemistry*, pp. 327-373.
- [4] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, K. Roberts y P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 6° ed., New York: Garland Science, 2015.
- [5] «Scitable,» Nature Education, [En línea]. Available: <https://www.nature.com/scitable/definition/plasmid-plasmids-28>.
- [6] L. Bartee y W. Shiner, *Principles of Biology: Biology 211, 212 and 213*, Open Oregon Educational Resources.
- [7] N. C. Institute, «NCI Dictionary of Cancer Terms,» [En línea]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/dna>.
- [8] W. Kowalski, *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*, Springer, 2009, pp. 19-20.
- [9] D. Voet y J. G. Voet, *Biochemistry*, 4 ed., John Wiley & Sons, Inc., 2011, pp. 88-93.
- [10] L. Cardellá y R. Hernández, *Bioquímica Médica: Tomo I, Biomoléculas*, 2013, pp. 162-170.

-
- [11] «Worldwide Protein Data Bank,» [En línea]. Available: <http://www wwpdb.org/>.
- [12] P. L. Privalov, *Microcalorimetry of Macromolecules*, Wiley, 2012, pp. 5-8, 353-378.
- [13] A. Ryer, *The Light Measurement Handbook*, International Light Technologies, 1997, pp. 6-7, 9-10.
- [14] Escolares.net, «Espectro electromagnético,» [En línea]. Available: <http://www.escolares.net/fisica/espectro-elecromagnetico/>.
- [15] K. Wladyslaw, *Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook*, Springer, 2009, p. 6.
- [16] G. O. Vijayalaxmi, *Chomosomal Alterations*, Springer, 2007, pp. 39-52.
- [17] G. Fabbrocini, M. Triassi, M. C. Mauriello, G. Torre, M. C. Annunziata , V. De Vita, F. Pastor, V. D'Arco y G. Monfrecola, «Epidemiology of Skin Cancer: Role of Some,» *Cancers*, vol. 2, pp. 1980-1989, 2010.
- [18] A. Cantrell, D. J. McGarvey y G. Truscott, «Photochemical and photophysical properties of sunscreens,» de *Comprehensive Series in Photosciences: Sun Protection in Man*, vol. 3, New York, Elsevier, pp. 497-516.
- [19] C. Kielbassa, L. Roza y B. Epe, «Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light,» *Carcinogenesis*, vol. 18, n^o 4, pp. 811-816, 1997.
- [20] X. Zhang, B. Rosenstein, Y. Wang, M. Lebwohi y H. Wei, «Identification of Possible Reactive Oxygen Species involved in

- Ultraviolet Radiation-Induced Oxidative DNA Damage,» *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 23, n° 7, pp. 980-985, 1996.
- [21] S. Comorosan , W. Kappel, I. Constantinescu, M. Gheorghe, E. Ionescu, C. Pirvu, S. Cinca y L. Cristache, «Green light effects on biological systems: a new biophysical phenomenon,» *Journal of Biological Physics*, vol. 35, n° 3, pp. 265-277, 2009.
- [22] J. H. Espinoza, E. Reynaga-Hernández, J. Ruiz-García, G. Montero-Morán, M. Sánchez-Domínguez y H. Mercado-Uribe, «Effects of green and red light in β L-crystallin and ovalbumin,» *Scientific Reports*, vol. 5, 2015.
- [23] J. H. Espinoza y H. Mercado-Uribe, «Visible light neutralizes the effect produced by ultraviolet radiation in proteins,» *Journal of Photochemistry & Photobiology*, vol. 167, pp. 15-19, 2016.
- [24] N. Y. Lee, M. -J. Lee, Y. -K. Kim, J. -C. Park, H. -K. Park, J. -S. Choi, J. -N. Hyun, K. -J. Kim, K. -H. Park, J. -K. Ko y J. -G. Kim, «Effect of light emitting diode radiation on antioxidant activity of barley leaf,» *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, vol. 53, n° 6, pp. 685-690, 2010.
- [25] R. M. Klein y P. C. Edsall, «Interference by near ultraviolet and green light with growth of animal and plant cell cultures,» *Photochemistry and Photobiology*, vol. 6, n° 11, pp. 841-850, 1967.
- [26] D. T. Organisciak y D. K. Vaughan, «Retinal light damage: Mechanisms and protection,» *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 29, n° 2, pp. 113-134, 2010.
- [27] C. Lin, M. Ahmad, D. Gordon y A. R. Cashmore, «Expression of an Arabidopsis cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A and green light,» *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, n° 18, pp. 8423-8427, 1995.
- [28] R. M. Klein, «Effects of green light on biological systems,» *Biological Reviews*, vol. 67, n° 2, pp. 199-284, 1992.
- [29] L. Koontz, «Explanatory Chapter: How Plasmid Preparation Kits Work,» *Methods in Enzymology*, vol. 529, pp. 23-28, 2013.
- [30] N. E. B. Inc., *Nucleic acid purification: Monarch Plasmid Miniprep Kit*, New England, 2016.
- [31] G. Salvi, P. De Los Rios y M. Vendruscolo, «Effective Interactions Between Chaotropic Agents and Proteins,» *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 61, pp. 492-499, 2005.
- [32] J. Yong, K. Changhong, P. A. Mieczkowski y P. E. Marszalek, «Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy,» *Biophysical Journal*, vol. 93, pp. 1758-1767, 2007.
- [33] T. A. Slieman y W. L. Nicholson, «Artificial and Solar UV Radiation Induces Strand Breaks and Cyclobutane Pyrimidine Dimers in *Bacillus subtilis* Spore DNA,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n° 1, pp. 199-205, 2000.
- [34] A. Besaratinia, J.-i. Yoon, C. Schoeder, S. E. Bradforth, M. Cockburn y G. P. Pfeifer, «Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight,» *The FASEB Journal*, vol. 25, pp. 3079-3091, 2011.
- [35] R. Boyer, *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*, 2° ed., New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2012.

-
- [36] F. Omega Garces, «UV Visible Absorption Spectroscopy,» [En línea]. Available:
http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/labmatters/instruments/uv_viss/cary50.htm.
- [37] D. F. Swinehart, «The Beer-Lambert Law,» *Journal of Chemical Education*, vol. 39, n° 7, pp. 333-335, 1962.
- [38] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera y M. T. Clavaguera-Mora, «La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales,» *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 31, n° 1, pp. 11-17, 1992.
- [39] P. Gill, T. Tohidi y B. Ranjbar, «Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience,» *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 21, n° 4, pp. 167-193, 2010.
- [40] «News Medical Life Sciences,» 2017. [En línea]. Available:
<https://www.news-medical.net/whitepaper/20170421/Using-Differential-Scanning-Calorimetry-for-Biosimilarity-and-Batch-to-Batch-Comparability.aspx>.
- [41] S. Knight Jasper, «School of Biological Sciences, The University of Texas at Austin,» [En línea]. Available:
<http://www.zo.utexas.edu/faculty/sjasper/images/20.8.gif>.
- [42] P. Del Vecchio, D. Esposito, L. Ricchi y G. Barone, «The effects of polyols on the thermal stability of calf thymus DNA,» *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 24, pp. 361-369, 1999.
- [43] J. G. Duguid, V. A. Bloomfield, J. M. Benevides y G. J. Thomas, «DNA Melting Investigated by Differential Scanning Calorimetry and

-
- Raman Spectroscopy,» *Biophysical Journal*, vol. 71, pp. 3350-3360, 1996.
- [44] S. Marchetti, G. Onori y C. Cametti, «Calorimetric and Dynamic Light-Scattering Investigation of Cationic Surfactant-DNA Complexes,» *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 110, pp. 24761-24765, 2006.
- [45] G. M. Mrevlishvili, B. I. Kankia, T. J. Mdzinarashvili, T. I. Brelidze, M. M. Khvedelidze, N. O. Metreveli y G. Z. Razmadze, «Liposome-DNA interaction: microcalorimetric study,» *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 94, pp. 139-143, 1998.
- [46] H. H. Klump, J. Völker, D. L. Maeder, T. Niermann y C. H. M. Sobolewski, «Conformational changes in nucleic acids/chomatin structure,» *Thermochimica Acta*, vol. 193, pp. 391-415, 1991.
- [47] P. L. Privalov, «Calorimetry of DNA,» de *Biocalorimetry: Foundations and Contemporary Approaches*, New York, CRC Press, 2016, pp. 209-221.
- [48] D. Y. Lando, A. S. Fridman, C.-L. Chang, I. E. Grigoryan, E. N. Galyuk, O. N. Murashko, C.-C. Chen y C.-K. Hu, «Determination of melting temperature and temperature melting range for DNA with multi-peak differential melting curves,» *Analytical Biochemistry*, vol. 479, pp. 28-36, 2015.
- [49] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke y J. A. Walder, «Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures,» *Biochemistry*, vol. 43, pp. 3537-3554, 2004.

-
- [50] C. Schildkraut y S. Lifson, «Dependence of the Melting Temperature of DNA on Salt Concentration,» *Biopolymers*, vol. 3, pp. 195-208, 1965.
- [51] P. Janscak, M. P. MacWilliams, U. Sanmeier, V. Nagaraja y T. A. Bickle, «DNA translocation blockage, a general mechanism of cleavage site selection by type I restriction enzymes,» *The EMBO Journal*, vol. 18, n^o 9, pp. 2638-2647, 1999.
- [52] V. University, «Jean and Alexander Heard Library,» 2018. [En línea]. Available:
<http://researchguides.library.vanderbilt.edu/c.php?g=69346&p=818456>.
- [53] Y. Jiang, C. Ke, P. A. Mieczkowski y P. E. Marszalek, «Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Force Microscopy,» *Biophysical Journal*, vol. 93, pp. 1758-1767, 2007.
- [54] C. M. Lovett, T. N. Fitzgibbon y R. Chang, «Effect of UV irradiation on DNA as studied by its thermal denaturation,» *Journal of Chemical Education*, vol. 66, n^o 6, pp. 526-528, 1989.
- [55] S. Yetgin y D. Balkose, «Calf thymus DNA characterization and its adsorption on different silica surfaces,» *RSC Advances*, vol. 5, pp. 57950-57959, 2015.