

**INDUCCIÓN DE LA CICLOOXIGENASA 2 EN CÉLULAS
EXPUESTAS A GLIFOSATO Y LUZ ULTRAVIOLETA C**

ANDREA CAROLINA CORTES LARA

**Tesis de grado para optar al título de Maestría en Ciencias
Biológicas**

Director

Helena Groot de Restrepo

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ D.C.
2005**

**INDUCCIÓN DE LA CICLOOXIGENASA 2 EN CÉLULAS
EXPUESTAS A GLIFOSATO Y LUZ ULTRAVIOLETA C**

ANDREA CAROLINA CORTES LARA

**Tesis de grado para optar al título de Maestría en Ciencias
Biológicas**

**Co-Director
Diana Sicard**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ D. C.
2005**

Tabla de contenido

Justificación	4
Introducción	6
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
Referencias	11
ARTICULO 1. Aspectos generales del glifosato	18
Diagrama de flujo de la metodología utilizada en la evaluación del efecto del glifosato en la expresión del gen de la enzima ciclooxigenasa 2 en linfocitos humanos	42
ARTICULO 2. Inducción de la ciclooxigenasa 2 en linfocitos humanos expuestos a glifosato	43
Diagrama de flujo de la metodología utilizada en la inducción de la enzima ciclooxigenasa 2 en la línea celular de fibrosarcoma HT1080 expuesta a radiación ultravioleta	67
ARTICULO 3: Inducción de la enzima ciclooxigenasa 2 en la línea celular de fibrosarcoma HT1080 expuesta a radiación ultravioleta	68
Conclusiones generales	88
Anexos	89
Extracción de proteínas totales	90
Determinación de la concentración de proteínas totales	92
Protocolo de electroforesis de proteínas (sds page)	93
Protocolo de electrotransferencia de proteínas	98
Técnica western blot	98
Protocolo de detección de proteínas por quimioluminiscencia	99
Protocolo de revelado de proteínas (manual)	101
Protocolo de extracción de linfocitos	102
Extracción de arn total	103
Cuantificación de la expresión del gen de la ciclooxigenasa 2 mediante RT-PCR en tiempo real	104

JUSTIFICACIÓN

Los procesos industriales abarcan todas las actividades comprendidas en la fabricación de bienes, productos y energía. Estos incluyen desde operaciones de producción de alimentos hasta el refinamiento de petróleo y el procesamiento de productos químicos, metales y madera. Varios tipos de agentes químicos, como los herbicidas, son producidos para permitir el desarrollo de este tipo de actividades industriales.

Adicionalmente la generación de productos de desecho traen como consecuencia el deterioro del ecosistema terrestre, un ejemplo de esto es la reducción de la capa de ozono y como consecuencia el aumento de las radiaciones solares que día a día alcanzan la superficie terrestre.

Estos agentes químicos y físicos generados, a los cuales están expuestos frecuentemente las poblaciones humanas, pueden ser tóxicos para los individuos; ya que la exposición continua a estos agentes generados a raíz de los procesos industriales pueden interferir con procesos fisiológicos celulares normales como reacciones enzimáticas, metabolismo del oxígeno e incluso causar daños en el material genético.

En este proyecto se pretende evaluar los efectos de dos agentes que se derivan de los ya mencionados procesos industriales. El primer agente es el herbicida glifosato, cuya utilización se ha extendido ampliamente en procesos agrícolas en todo el planeta; este es un tipo de herbicida de amplio espectro, post emergente que ha cobrado gran interés en los últimos años debido a su

extensa utilización en nuestro país y en otros países de América Latina, además de su uso normal, por parte de agricultores en pequeña escala, este herbicida es empleado en el plan de erradicación de cultivos ilícitos en varias zonas de nuestro país.

El segundo agente que por la relevancia que ha adquirido en los últimos años merece ser tenido en cuenta es la radiación ultravioleta C (UVC). Este tipo de radiación es filtrada por la capa de ozono, sin embargo se ha estimado que la cantidad de radiación ultravioleta C que alcanza la superficie del planeta se ha incrementado en cerca del 5 % en los últimos años. Adicionalmente este tipo de radiación es utilizada en los laboratorios como germicida y frecuentemente, las personas que trabajan en este ambiente son expuestas accidentalmente a este tipo de radiación, haciendo de esta un importante riesgo ocupacional.

INTRODUCCIÓN

El glifosato (N-fosfonometil glicina) es el ingrediente activo de uno de los herbicidas más extensamente utilizados en el mundo, el Roundup (1). Las propiedades herbicidas del glifosato fueron descubiertas y utilizadas por primera vez por la compañía Monsanto en 1970 (2). Su utilización en agricultura esta en expansión continua y en años recientes una gran cantidad de diferentes formulaciones que contienen glifosato han sido registradas y vendidas (3), lo cual ha dado a este compuesto gran versatilidad.

Este es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas y plantas tanto perennes como anuales en ambientes agrícolas, forestales y domésticos (4). La acción herbicida corresponde a la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa, vía clave en la síntesis de proteínas que regulan el desarrollo en la mayoría de las plantas (5).

Gran cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro* han sido desarrollados para esclarecer el potencial toxico de este herbicida tan ampliamente utilizado a nivel mundial. En estudios realizados *in vivo* se encontró que el glifosato no es absorbido significativamente por el organismo y no se biotransforma ya que es eliminado casi en su totalidad por las heces fecales y la orina (6-9). En los estudios realizados para investigar el potencial teratogénico de este herbicida se presentan resultados contradictorios; La Organización Mundial de la Salud encontró que no hay efectos teratogénicos ni carcinogénicos (10). Sin embargo en otros estudios independientes (11, 12) los autores concluyen que el glifosato es altamente tóxico e induce un retardo en el desarrollo fetal del organismo en prueba.

Los estudios realizados con embriones de erizo de mar han sugerido que las formulaciones basadas en glifosato (Arega, Cargly, Cosmic y Roundup) muestran una interferencia con la regulación del ciclo celular, desde una desregulación de la división celular hasta la inhibición total del proceso. Adicionalmente se observó que la síntesis global de proteínas es muy baja en los gametos y se incrementa después de la fertilización. Sin embargo los resultados muestran que no se alcanzan los niveles normales de la síntesis de las mismas. (13 -15). Efectos tóxicos similares del glifosato a concentraciones subletales han sido demostrados en varias especies de peces y otros grupos taxonómicos como *Salmo gairdneri*, *Oncorhynchus tshawytsch* y *Oncorhynchus kisutch* (16-18).

Considerando la amplia variedad de efectos reportados para este herbicida sobre los diferentes modelos de estudio, y teniendo en cuenta que se ha reportado que varios tipos de herbicidas presentan efectos perjudiciales en la fisiología celular, llevando a cambios en los patrones de expresión génica normal o en última instancia a generar daños directos en el ADN de los individuos. Resulta interesante determinar como puede afectar este herbicida a enzimas que poseen diversas funciones celulares normales pero que en condiciones de estrés y en respuesta a estímulos tanto químicos como físicos, actúan como señales de alerta y pueden encender o apagar ciertas cascadas moleculares para defender a las células de las agresiones.

Uno de los patrones génicos más interesantes para analizar, debido a los múltiples procesos biológicos en los que participa, es el de la enzima

Ciclooxigenasa que cataliza el paso limitante del metabolismo de ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos (19 - 21).

Esta enzima presenta dos isoformas codificadas en diferentes genes que se conocen como Cicboxigenasa 1 (COX 1) y Ciclooxigenasa 2 (COX 2). La Ciclooxigenasa 1 se expresa constitutivamente en la mayor parte de tejidos y media en el control de funciones fisiológicas normales, como el flujo sanguíneo en el riñón y el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (22-25). En contraste, la Ciclooxigenasa 2 es indetectable en la mayoría de tejidos y órganos; sin embargo puede ser inducida por una gran gama de estímulos fisiológicos y ambientales (26 - 32).

Existe evidencia suficiente de la sobre expresión patológica de la COX 2 en mecanismos anormales de proliferación celular y disminución de la apoptosis en células transformadas (33). Adicionalmente esta enzima puede participar en procesos como: angiogenesis, apoptosis, función inmune, invasividad tumoral, procesos de envejecimiento y carcinogenesis inducida por radiación ultravioleta (34 - 37).

Reportes publicados han investigado los patrones de expresión de Cox-2 en respuesta a la radiación ultravioleta, UVA (320 ± 400 nM), así como UVB (280 ± 320 nM). Se ha observado que la cantidad de la enzima Cox-2 se incrementa después de la exposición a UVB tanto en piel humana como en keratinocitos humanos cultivados (38), y células HaCaT (39). Las radiaciones UVB y UVA-2 han mostrado una fuerte inducción del RNA mensajero de Cox-2 , incremento

en la cantidad de enzima, así como en el incremento en la producción de prostaglandinas E (2) después de la irradiación (40). En conclusión estos tipos de radiación sirven como medio para incrementar la expresión de Ciclooxigenasa 2 (Cox-2), en varios modelos *in vitro* e *in vivo*.

En la revisión llevada a cabo hasta el momento, ningún estudio ha sido realizado con respecto a la respuesta de esta enzima a la radiación UVC. Además se estima que la cantidad de radiación ultravioleta que alcanza la superficie del planeta se ha incrementado en cerca de un 5% en los últimos años. Por lo tanto, y considerando la relevancia futura de este agente físico, consideramos importante establecer mediante este estudio la influencia que este agente tiene sobre la cantidad de enzima Ciclooxigenasa 2 en cultivos celulares expuestos a este tipo de radiación.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del glifosato y la radiación ultravioleta C en la expresión del gen de la enzima Ciclooxygenasa 2 en células humanas expuestas a dichos agentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el porcentaje de viabilidad celular en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato.
- Determinar la cantidad de la enzima COX 2 en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato.
- Cuantificar los niveles de ARN m de la COX 2 en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato.
- Establecer si la expresión del gen de Ciclooxygenasa 2 en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato, es dependiente de la concentración.

- Establecer las dosis de ultravioleta C necesarias para inducir la expresión de la COX 2 en células HT1080.
- Determinar los tiempos posteriores a la exposición (radiación ultravioleta) en los cuales se pueda observar una inducción detectable de la enzima.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de las células HT1080 después de las diferentes dosis de radiación ultravioleta C.
- Determinar por medio de la técnica de western blot, la expresión de la Ciclooxygenasa 2 en células expuestas a radiación ultravioleta C.

REFERENCIAS

1. Baerson S, Rodriguez D, Tran M, Feng Y, Biest N, Dill G. Glyphosate-Resistant Goosegrass. *Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Endopyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase*. Plant Physiol. (2002). Vol. 129, pp. 1265-1275
2. Baird D, Upchurch R, Hbmesley W. Franz J. *Proc. North Cent. Weed control*. (1971) conf. 26, pp 64–68.
3. Baylis A. *Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects*. Pest Manag Sci. (2000). 56 pp 299-308.
4. Bradshaw L, Padgett S, Kimball S, Wells B. *Perspectives on glyphosate resistance*. Weed Technol. (1997). vol. 11, pp 189-198
5. Gruys K, Sikorski J. *Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides*. Plant Amino Acids. (1999). pp 357-384
6. NTP. *Technical Report on Toxicity Studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice*, Toxicity Report Series Number 16, NIH Publication 92-3135, (1992). U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP), Research Triangle Park, NC.

7. Colvin L, Miller J. *Residue and Metabolism The Dynamics of Accumulation and Depletion of Orally Ingested N-Phosphonylmethylglycine-14C*. Unpublished report, Monsanto Company, St. Louis, MO. (1973a).
8. Ridley W, Mirly K. *The Metabolism of Glyphosate in Sprague-Dawley Rats. I. Excretion and Tissue Distribution of Glyphosate and Its Metabolites Following Intravenous and Oral Administration*. Unpublished report, Monsanto Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. (1988).
9. Howe R, Chott R, McClanahan R. *Metabolism of Glyphosate in Spague-Dawley Rats. II. Identification, Characterization, and Quantitation of Glyphosate and Its Metabolites Following Intravenous and Oral Administration*. Unpublished report, Monsanto Environmental Health Laboratory, St. Louis, MO. (1988).
10. WHO (World Health Organization). *Glyphosate*. Environmental Health Criteria. (1994). 159, pp. 1-177.
11. Dallegrove E, Mantese F, Coelho R, Pereira J, Dalsenter P, Langebh A. *The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats*. Toxicol Lett. (2003).142(1-2), pp. 45-52.
12. Daruich J, Zirulnik F, Gimenez S. *Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses*. Environmental Research. (2001). Section A 85, pp. 226-231.

13. Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R. *Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation*. Chem. Res. Toxicol. (2002). 15, pp. 326–331
14. Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, Bellé R. *Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level*. Environ. Chem Lett. (2003). 1, pp. 8–12.
15. Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. *Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation*. Biology of the Cell. (2004). 96, pp. 245–249
16. Mitchell D, Chapmann P, Long T. *Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook and coho salmon*. Bull Environ Contam Toxicol. (1987). 39, pp. 1028-1035
17. Jiraungkoorskul W, Upatham E, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grans S, Pokethityook P. *Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Environ. Toxicol. (2003).18, pp. 260–267.
18. Tsui M, Chu L. *Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors*. Chemosphere. (2003). 52, pp. 1189–1197

19. Samuelsson B. *An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes.* *Drugs.* (1987). 33, Suppl 1: pp. 2–9.
20. Weissmann G. *Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation.* *J Lipid Med.* (1993). 6. pp. 275–86.
21. Kraemer S, Meade E, DeWitt D. *Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences.* *Arch Biochem Biophys.* (1992). 293, pp. 391–400.
22. Smith W. *Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology.* *Annu. Rev. Biochem.* (2000). 69, pp. 145–182
23. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma.* *Cancer Res.* (1997). 57, pp. 1276–1280
24. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. *Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric carcinoma.* *J Surg Oncol.* (1998). 69, pp. 168–172
25. Pairet M, Engelhardt G. *Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications.* *Fundam. Clin. Pharmacol.* (1996). 10, pp. 1–17.

26. DuBois R, Abramson S, Croford L. *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB Journal. (1998). 12, pp. 1063-1073.
27. Tanabe T, Tohnai N. *Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression*. Prostaglandin Lipid Mediat. (2002). 68-9, pp. 95-114.
28. Niro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T. *Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils*. Blood. (1997). 89, pp. 1621-1628.
29. DuBois R, Awad J, Morrow J, Roberts L, Bishop P. *Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester*. J. Clin. Invest. (1994). 93, pp. 493-498.
30. Ledwith B, Pauley C, Wagner L, Rokos C, Alberts D, Manam S. *Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13- myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells*. J. Biol. Chem. (1997). 272, pp. 3707-3714.
31. Xie W, Herschman H. *v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor*. J. Biol. Chem. (1995). 270, pp. 27622-27628.

32. Sheng H, Williams C, Shao J, Liang P, DuBois R, Beauchamp R. *Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway*. J. Biol. Chem (1998^a). 273, pp. 22120-22127.
33. Plataras J, Guengerich F, Nebert D, Marnett L. *Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde*. J Biol Chem. (2000). 275, pp.11784–11790.
34. Smith W, Meade E, Dewitt D. *Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes -1 and -2*. Ann. New York Acad. Sci. (1994). 714, pp. 136-142.
35. Subbaramaiah K. *Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells*. Cancer Res. (1996). 56, pp. 4424–4429.
36. Wadleigh D. *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages*. J. Biol. Chem (2000). 275, pp. 6259–6266.
37. Fischer S, Conti C, Viner J, Aldaz M, Lubet A. *Celecoxib and difluoromethylornithine in combination have strong therapeutic activity against UV-induced skin tumors in mice*. Carcinogenesis. (2003). vol.24 no.5, pp. 945-952.

38. Buckman S, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland A. *COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer*. Carcinogenesis. (1998). vol.19 no.5, pp. 723–729.
39. Tang Q, Chen W, Gonzales M, Finch J, Inoue H, Bowden G. *Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes*. Oncogene. (2001). 20, pp. 5164 -5172.
40. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz L, Sies H. *Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis*. PhotochemPhotobiol Sci. (2004). 3, pp 257-62.

ASPECTOS GENERALES DEL GLIFOSATO

Andrea Cortés, Claudia Monroy, Juan Ruiz, Helena Groot
Laboratorio de Genética Humana, Universidad de Los Andes, Bogotá,
Colombia.

Introducción

El glifosato (N-fosfonometil glicina) es el ingrediente activo de uno de los herbicidas más extensamente utilizados en el mundo, el Roundup (1). Este es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas y plantas tanto perennes como anuales en ambientes agrícolas, forestales y domésticos (2).

El glifosato puro es un ácido débil, muy soluble en agua 12 g/L a 25° C, e insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Este compuesto generalmente es menos activo que las sales de glifosato que se consiguen comercialmente, probablemente por su baja absorción en las plantas (3). En el campo de la agricultura los productos más utilizados contienen sales de glifosato, especialmente la sal isopropilamina de glifosato, o sal isopropilamina de N-fosfonometil glicina. Adicionalmente las formulaciones más comunes contienen surfactantes, los cuales aceleran significativamente la penetración del herbicida dentro de las cutículas y al interior de la hoja (4, 5), incrementan la retención de la humedad en el follaje, reduciendo la tensión superficial de las soluciones del herbicida (6). El surfactante más utilizado en las diferentes formulaciones que contienen glifosato es el polioxietileno-amina POEA (7).

Las propiedades herbicidas del glifosato fueron descubiertas y utilizadas por primera vez por la compañía Monsanto en 1970 (8). Su utilización en agricultura esta en expansión continua y en años recientes una gran cantidad de diferentes formulaciones que contienen glifosato han sido registradas y vendidas (9), esto ha dado a este compuesto gran versatilidad. Dentro de sus aplicaciones mas recientes se encuentra la modificación por ingeniería genética de varios tipos de plantas que resisten altas concentraciones de formulaciones compuestas por glifosato y cuando es aplicado en bajas concentraciones se utiliza para regular el crecimiento de varias especies de plantas (10). Además de su uso como herbicida en la agricultura, se utiliza como desecante de granos antes de la cosecha, defoliante en plantas de algodón y en algunos países por vía aérea como madurante de la caña de azúcar.

La acción herbicida corresponde a la inhibición de la enzima 5-endopiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa, localizada principalmente en los plastidios aunque puede encontrarse en algunas fracciones del citoplasma, esta enzima es importante en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano), empleados en la síntesis de proteínas que regulan el desarrollo en la mayoría de las plantas (11). El glifosato también puede inhibir o reprimir la acción de otras enzimas involucradas en otros pasos de la síntesis de los mismos aminoácidos, como la clorismato mutasa y prefrenato hidratasa (12) otros efectos relacionados son, la reducción en la fotosíntesis y degradación de la clorofila, inhibición del transporte de auxinas e incremento de la oxidación de las mismas (13, 14). Al ejercer el glifosato su acción en las plantas mediante un bloqueo en la síntesis del ácido shikimico, vía de biosíntesis encontrada únicamente en plantas, hongos y bacterias, no en

animales (15, 16) y debido a que este mecanismo no está presente en los humanos, es considerado como de bajo riesgo para la salud de los mismos.

Gracias a sus propiedades fisicoquímicas este pesticida actúa por vía foliar, translocándose posteriormente hacia el interior de la planta. La absorción radicular es prácticamente despreciable. Una vez en el ambiente, el glifosato es degradado por la acción de microorganismos del suelo y acuáticos, proceso que se acelera en condiciones aeróbicas (17). La principal ruta de biodegradación del glifosato parece ser el clivaje del enlace C-N para producir ácido aminometilfosfónico (AMPA) (7,18) y sarcocina, posteriormente se degrada a fosfatos inorgánicos, amonio y dióxido de carbono (19)

Por razones de solubilidad y biodegradación se espera que el glifosato no se bioacumule en los alimentos. Sin embargo varios residuos de glifosato fueron encontrados en peces, crustáceos y moluscos después de la exposición a glifosato disuelto en agua. Estos residuos disminuían rápidamente (50 al 90%) 14 a 28 días después de exponer los organismos nuevamente a aguas libres de glifosato (7).

Debido a la gran versatilidad de este compuesto, sus múltiples aplicaciones en el campo de la agricultura a nivel mundial y la gran preocupación sobre los efectos de este herbicida en la salud humana, es nuestro principal interés realizar una revisión exhaustiva de los efectos de este compuesto en modelos animales y celulares para ofrecer un panorama general de las investigaciones realizadas por varios grupos en los últimos años.

Toxicidad del glifosato en modelos animales

Los beneficios o riesgos de varios compuestos ocasionalmente pueden ser valorados directamente en humanos. Los análisis toxicológicos dependen entonces de la información obtenida indirectamente a partir de otras especies; aunque aun existen varias discrepancias en la manera en la cual los datos generados a partir de estos estudios pueden ser extrapolados en la evaluación del riesgo para la salud humana, estos modelos animales principalmente los desarrollados en ratas y ratones proporcionan una información valiosa acerca de la farmacocinética y la biotransformación de los compuestos.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se pretende compilar los resultados de las investigaciones que tienen como fin proveer información acerca del porcentaje de absorción, la distribución, biotransformación y excreción del glifosato y el AMPA; adicionalmente se resumen los resultados de las investigaciones realizadas para determinar el potencial de acumulación del compuesto en tejidos y/u órganos y la inducción potencial de biotransformación como resultado de la exposición al glifosato.

Absorción, distribución, biotransformación y eliminación

Estudios realizados por Ridley y Mirley (20), Howe y colaboradores (21), NTP (22) y Colvin y Miller (23) en ratas expuestas a diferentes dosis orales de glifosato suministradas en la dieta (10 a 1000 mg/Kg), muestran que el porcentaje de absorción del compuesto es del 15 al 36%. En los estudios mostrados en la tabla 1 se observa que la absorción aumenta a dosis bajas y

disminuye considerablemente en dosis de 1000 mg/kg de glifosato, probablemente por un efecto de saturación del organismo de prueba. Colvin y Miller (23) adicionalmente determinan el porcentaje de absorción del principal producto de degradación del glifosato (AMPA) y encuentran resultados similares a los reportados para el glifosato en estudios posteriores.

Las investigaciones mencionadas indican que el glifosato y el AMPA no se absorben significativamente; sin embargo es importante determinar si la fracción absorbida presenta una distribución uniforme en todos los tejidos o tiende a acumularse en un órgano específico. Varios estudios en ratas expuestas a diferentes dosis de glifosato y AMPA marcados radiactivamente (tabla 2), muestran que la acumulación no se presenta en un tejido específico, no obstante el tejido óseo es un blanco frecuente seguido por el hígado y el riñón en igual proporción.

El porcentaje de eliminación del glifosato es del 80 al 90% en ratas expuestas a diferentes dosis de toma única o múltiple de glifosato y AMPA (tabla 3). Adicionalmente los hallazgos de estas investigaciones muestran que la mayor fuente de eliminación es vía fecal (heces) y el porcentaje restante se elimina más tarde en la orina, indicando que el glifosato y el AMPA no se biotransforman en el organismo y que el hígado no está metabolizando completamente el glifosato, generando compuestos secundarios que no se producirían en el caso de la degradación de xenobióticos normales. Es importante resaltar que solo se encontró un estudio (22) donde se evalúa el tiempo necesario para que el organismo elimine el glifosato del cuerpo.

Posibles efectos teratogénicos

Es necesario considerar que los cambios fisiológicos propios de la gestación como el aumento de volumen plasmático, incremento del aclaramiento renal, etc. pueden afectar los parámetros farmacocinéticos de los medicamentos, alterando su eficacia y toxicidad, tanto para la madre como el feto. Por otro lado, aparecen otros compartimentos (placenta y órganos fetales) que también pueden modificar la respuesta farmacológica (24). La teratogénesis puede entonces definirse como aquella alteración morfológica, bioquímica o funcional, inducida durante el embarazo y detectada durante la gestación, el nacimiento o posteriormente a este (25).

El efecto de la reprivación de proteínas y la exposición a diferentes pesticidas han sido bien documentados en ratas preñadas, encontrando una disminución de enzimas como la glutatión peroxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (26) además de anomalías funcionales en su descendencia. (27).

Los reportes recopilados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en 1994 exponen que no hay efectos teratogénicos ni carcinogénicos en ratas preñadas expuestas a glifosato en rangos de 100 a 1060 mg/Kg (7). Sin embargo Dallegrave y colaboradores (28) encuentran resultados contradictorios a los de la OMS donde ratas con 6 a 15 días de embarazo (tratadas oralmente con glifosato disuelto en agua en concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/Kg) muestran un 50% de mortalidad cuando la dosis es de 1000 mg/Kg. Además se observan alteraciones en el esqueleto de los fetos de dichas ratas en proporciones de 15.4, 33.1, 42.0 y 57.3% respecto al control en todas las dosis suministradas (500, 750 y 1000

mg/Kg respectivamente). Los autores concluyen que el glifosato es altamente tóxico e induce un retardo en el desarrollo fetal (28)

Otros indicios de estos efectos los obtienen Daruich y colaboradores (29), donde ratas embarazadas fueron expuestas a dosis de 0.5 y 0.1 % peso/volumen de glifosato. Los resultados muestran una reducción significativa del consumo de agua y alimentos (organismos expuestos) y la reducción del peso corporal de los individuos a prueba durante el tiempo de exposición respecto al control negativo. Adicionalmente los órganos de estos individuos mostraron disminuciones significativas de tamaño siendo el corazón y el cerebro los menos afectados.

Cambios similares fueron observados por Daruich y colaboradores en el 2001 (29), la Organización Mundial de la Salud en 1994 (7). Estos efectos también se observan por la exposición al clorato de sodio (compuesto utilizado en la industria como agente de desinfección) en dosis de 3.0, 12.0, o 48.0 mM durante 90 días (30).

Daruich adicionalmente encuentra alteraciones en el hígado del NADPH, el isocitrato deshidrogenasa, la malato deshidrogenasa y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (asociada al estrés oxidativo) observado de forma dosis dependiente (31).

Otros efectos del Glifosato

El ciclo celular es el proceso universal por el cual las células se reproducen y controlan el crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivos. Las células eucariotas han desarrollado mecanismos de control conocidos como

“cell-cycle checkpoints” o puntos de control del ciclo celular (32). El ciclo se detiene en respuesta al stress para reparar daños en el ADN o dar lugar a la muerte celular programada (33)

La falla en los puntos de control del ciclo celular dan lugar a inestabilidad genómica, haciendo que cuando la célula se divida el DNA se replique incorrectamente o que los cromosomas sean segregados erróneamente a las células hijas, resultando en un incremento del daño genético, crucial en la generación de tumores y cáncer (34, 35).

Gametos y embriones de invertebrados marinos incluyendo los del erizo de mar se han convertido en poderosos modelos tanto para estudios toxicológicos (36) como para el entendimiento del ciclo celular y su regulación. El desarrollo temprano del erizo de mar ofrece la oportunidad de analizar las divisiones celulares sincrónicas del embrión durante los primeros clivajes después de la fertilización, en ausencia del control transcripcional (37, 38, 39).

Los estudios realizados con embriones de erizo de mar han sugerido que las formulaciones basadas en glifosato (Arega, Cargly, Cosmic y Roundup) muestran una interferencia con la regulación del ciclo celular (37). Las formulaciones antes mencionadas impiden el proceso de división, resultados descritos por Marc et al en el 2002, 2003 y 2004 (37, 40, 33)

Los efectos producidos por todos los productos analizados son dosis-dependientes y van desde una desregulación de la división celular hasta la inhibición total del proceso. La mitad del efecto máximo fue obtenido para el glifosato en concentraciones cercanas a 1 mM en Arega, Cosmic y Cargly,

comparadas con los productos de Roundup que muestran efectos en un rango de 8-12 mM

La cinética de la primera división celular fue afectada por cada uno de los productos, sin embargo no se observaron estructuras necróticas o apoptóticas, ni cromosomas aberrantes durante los primeros ciclos de la división, sino hasta alcanzar la cuarta etapa (33).

Las curvas dosis-respuesta de estas formulaciones indican una inducción de la disfunción del ciclo celular a una concentración mucho mas baja (< 500 a 4000 veces) que la concentración del producto presente en las micro gotas aspersadas del herbicida, sugiriendo un alto riesgo por inhalación para las personas que se encuentran en la vecindad de las aspersiones (33).

En otro estudio realizado por el mismo autor en el 2002 se observa que el Roundup inhibe la síntesis de proteínas asociadas con el desarrollo temprano del erizo de mar, sin afectar significativamente la acumulación de la ciclina B. La síntesis global de proteínas es muy baja en los gametos y se incrementa después de la fertilización. Sin embargo los resultados muestran que no se alcanzan los niveles normales de la síntesis de las mismas. No se ha identificado aun cual de estas proteínas es necesaria para la activación del complejo CDK1/ciclina B mediante la fosforilación y desfosforilación (37), necesaria para el control de la entrada a la fase M del ciclo celular. Adicionalmente se observaron cambios de la cromatina durante el desarrollo de los gametos y un retraso en el primer clivaje de 70 min aproximadamente.

Adicionalmente efectos tóxicos similares del glifosato a concentraciones subletales han sido demostrados en varias especies de peces (*Salmo gairdneri*, *Oncorhynchus tshawytsch* y *Oncorhynchus kisutch*) a diferentes concentraciones ambientales y fisicoquímicas (41, 42) y otros grupos taxonómicos (43).

En el estudio realizado por Neškovic y colaboradores en 1996 (44) en peces de la especie *Cyprinus carpio*, se analizó la toxicidad subaguda del glifosato, exponiendo a los organismos a concentraciones subletales (2.5, 5.0 and 10.0 mg/L). Los resultados indican incrementos en la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en el hígado, en las tres concentraciones analizadas ($P < 0.01$), igual que cambios morfológicos en los órganos de dichos peces ($P < 0.01$). También, se observaron incrementos en la actividad de la FA en el corazón de peces expuestos a 10.0 mg/L de glifosato y un efecto leve en la actividad de la enzima oxaloacético-glutámica (OG) y piruvica-glutámica (PG). Adicionalmente en los expuestos a 2.5 and 5.0 mg/L de glifosato se encontraron incrementos en la actividad del OG en el hígado, riñón y suero ($P < 0.05$) en relación con el control. Estos resultados coinciden con lo propuesto en otros estudios por Nemcsok y colaboradores (45), Sing y Reddy (46), Ferrando y Andreu-Moliner (47) y Neškovic y colaboradores (48) realizados en otras especies.

El análisis histopatológico de las branquias de los peces expuestos a una concentración intermedia de glifosato muestran hiperplasia epitelial y edema epitelial, cambios similares se encontraron en la concentración mas alta de glifosato, aunque mas pronunciados. Estos cambios fueron seguidos de la

infiltración de leucocitos y ruptura del epitelio respiratorio en algunas lamelas secundarias. En estos ensayos los organismos control no presentan ningún tipo de cambio histopatológico.

Cambios en la estructura del hígado aparecen solo en la más alta concentración de glifosato, la estructura del riñón parece no ser afectada por este compuesto en ninguna de las concentraciones probadas

El hígado es el órgano central del metabolismo de xenobióticos de organismos superiores (49). Cambios de algunos parámetros bioquímicos son alarmas tempranas de daño y de respuestas toxicológicas específicas. En varias ocasiones se han reportado daños estructurales en el metabolismo del hígado por efecto de diferentes compuestos. Adicionalmente las aminotransferasas plasmáticas pueden ser usadas como indicadores biológicos de daños en los tejidos causados por contaminantes bioquímicos (50).

Determinar el efecto subletal de los compuestos xenobioticos en la actividad enzimática e histopatológica es de gran importancia para entender los mecanismos tóxicos de un compuesto. Jiraungkoorskul y colaboradores en el 2003 (42), encontraron que la actividad de las enzimas séricas (aminotransferasa, alamina aminotransferasa y fosfatasa alcalina) se ve incrementada significativamente respecto al control ($P < 0.05$) en el modelo estudiado cuando este es expuesto a diferentes concentraciones de Roundup.

Análisis realizados por Jyothi y Narayan en 1999 (51) sugieren que el incremento de estas enzimas mitocondriales induce daños de tipo lipolítico, dando origen a la disolución de la membrana lisosomal y de otros organelos

celulares liberando diferentes sustancias al torrente sanguíneo y causando necrosis del hígado.

Neskovic y colaboradores en 1996 (44) realizaron estudios de toxicidad sub-aguda durante 14 días a concentraciones subletales de glifosato para determinar cambios histopatológicos en los órganos de carpas tales como branquias, hígado, y riñón. En las branquias se observó hiperplasia epitelial y edema subepitelial, fibrosis en el hígado y ningún cambio histopatológico observable en el riñón.

En Tilapias del Nilo expuestas a concentración de 5 a 15 ppm de Roundup, se observa un adelgazamiento del epitelio lamelar primario, edema y fusión de la segunda lamela. Estas alteraciones podrían repercutir en la función respiratoria afectando el intercambio gaseoso. El incremento en los adelgazamientos de las capas epiteliales ha sido reportado como consecuencia de la hiperplasia seguida a la exposición experimental a pesticidas (52), adicionalmente los organismos muestran infiltración de leucocitos, incremento del tamaño de los hepatocitos y presencia de vacuolas. Por otro lado se observa una dilatación del espacio de Bow man y acumulación de gotas hialinas en las células epiteliales tubulares del primer túbulo proximal del riñón (42).

Estudios realizados en el gasterópodo *Phyllocaulis soleiformis* demuestran que el glifosato a una concentración de 1 mM es capaz de inhibir la actividad de la ATPasa e incrementar la actividad de las colinesterasas (53).

En conclusión los diferentes estudios realizados con el fin de determinar los efectos del glifosato sobre los diferentes modelos de estudio presentan

resultados contradictorios, no existe aun un consenso sobre la no toxicidad de este herbicida en el ecosistema y mucho menos en la salud humana. La gran mayoría de reportes muestra un panorama prometedor con respecto a la inocuidad del glifosato, sin emanarlo los reportes que muestran efectos teratogenicos en ratas y su acción sobre el ciclo celular realizados en otro tipo de organismos hacen pensar que es necesario seguir estudiando este herbicida, ya que como se menciono anteriormente es el mas utilizado en el mundo en procesos agrícolas y cada día nuevos productos son diseñados basados en estas formulaciones

Compuesto	Dosis	% de Absorción	Referencia
Glifosato	10 mg/kg (Dosis única)	30 al 36%	Ridley y Mirley 1998 (20), Howe et al 1980 (21)
	5.6 mg/kg (Dosis única)	30%	NTP 1992 (22)
	1000 mg/kg (Dosis única)	19 al 23%	NTP 1992 (22)
AMPA	> 100 ppm (Dosis repetida 14 días)	15 %	Colvin y Miller (23)
	6.7 mg/kg (Dosis única)	20%	

Tabla 1. Porcentaje de absorción del glifosato en ratas expuestas a diferentes dosis.

Compuesto	Concentración /Número de Dosis	Tiempo de medición (Después de la dosis)	Órganos blanco	Referencias
Glifosato	10 mg/kg /Única	2 horas	Intestino delgado y sangre	Brewster et al 1991 (54)
		6.3 horas	Colon, riñón y hueso	
	> 100 ppm/ Múltiple (14 días)	> a 6.3 horas	Hueso	Colvin y Miller 1973 ^a (23)
		6 días (durante la dosis)	Riñón, bazo, grasa e hígado	
AMPA	10 mg/kg / Múltiple	10 días	Bajos niveles (0.067-0.12 mg/Kg) en todos los órganos	Ridley y Mirley 1998 (20)
		5 días	No efecto notable en la distribución	
AMPA	6.7 mg/Kg Única	5 días	Bajos niveles (3-6 ppb) en hígado, riñón y músculo esquelético	Colvin y Miller 1973 (55)

Tabla 2. Organos blancos de la fracción absorbida del glifosato y AMPA en ratas expuestas a diferentes dosis

Com puesto	Dosis	Número de Dosis	% de Eliminación	Vía de Eliminación	Referencias
Glifosato	10 mg/kg	Única	90% de eliminación a las 72 h	Las heces fecales son la vía mas frecuente de eliminación (62-69 %), CO ₂ expirado (0.3 %)	NTP 1992 (22)
	> 100 ppm			Dosis repetida (14 días)	
AMPA	6.7 mg/kg	Dosis única	Eliminación del 80%	Las heces fecales son la vía mas frecuente de eliminación (80-90%), excreción urinaria (< 10 %)	Colvin y Miller 1973 (55)

Tabla 3. Biotransformación y eliminación del glifosato en ratas expuestas a varias dosis

REFERENCIAS

1. Baerson S, Rodriguez D, Tran M, Feng Y, Biest N, Dill G. *Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase*. Plant Physiol. (2002). Vol. 129, pp. 1265-1275.
2. Bradshaw L, Padgett S, Kirball S, Wells B. *Perspectives on glyphosate resistance*. Weed Technol. (1997). Vol. 11: pp189-198.
3. MacIsaac S, Paul R, Devine M. *A scanning electron microscope study of glyphosate deposits in relation to foliar uptake*. Pestic Sci. (1991). 31: pp.53-64.
4. Bukovac M, Petracek P. *Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles*. Pestic. Sci. (1993). 37, pp. 179–194.
5. Kirkwood R. *Use and mode of action of adjuvants for herbicides: a review of some current work*. Pestic. Sci. (1993). 38, pp. 93–102.
6. Stevens P, Kimberley M, Murphy D, Policello G. *Adhesion of spray droplets to foliage: the role of dynamic surface tension and advantages of organosilicone surfactants*. Pestic. Sci. (1993). 38, pp. 237–245.
7. WHO (World Health Organization). *Glyphosate*. Environmental Health Criteria. (1994).159, pp. 1-177.

8. Baird D, Upchurch R, Homesley W, Franz J. *Proc. North Cent. Weed control.* (1971). conf. 26, pp. 64-68.
9. Baylis A. *Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects.* *Pest Manag Sci* (2000). 56, pp. 299-308.
10. Smith E, Oehme F. *The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review.* *Veterinary Human Toxicology.* (1992). 34 (6), pp. 531-543
11. Gruys K, Sikorski J. *Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides.* *Plant Amino Acids.* (1999). Pp. 357-384.
12. Amrhein N, Deus B, Gerke P, Hllander H, Schab J, Schulz A, Steinrucken H. *Interference of glyphosate with the shikimate pathway.* *Proc. Plant Growth Regul.* (1981). vol 8, pp. 99-106.
13. Cole D. *Mode of action of glyphosate ± a literature analysis,* in *The Herbicide Glyphosate.* Ed por Grossbard E y Atkinson D. Butterworths, London. (1985). Pp. 48-74.
14. Singh B, Siehl D, Connelly J. *Shikimate pathway: why does it mean so much to so many?* *Oxford Surv. Plant Mbl Cell Biol.* (1991). 7, pp. 143-185.
15. Herrmann K, Weaver L. *The shikimate pathway.* *Annu Rev Plant Physiol Plant Mbl Biol.* (1999). 50, pp. 473-503.

16. Stallings W, Abdel-Meguid S, Lim L, Shieh H, Dayringer H, Leimgruber N, Stegeman R, Anderson K, Sikorski J, Padgett S, Kishore G. *Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold*. Proc Natl Acad Sci U S A. (1991). 88(11), pp. 5046-5050.
17. CCME. *Canadian water quality guidelines*. Ottawa, Ontario, Environment Canada. (1989). Canadian Council of Ministers of the Environment.
18. Zbigniew H, Dorota K, Jozef D, Jerzy L. *Novel approach for the simultaneous analysis of glyphosate and its metabolites*. Journal of Chromatography. (2002). 947, pp. 129–141.
19. Franz J, Mao M, Skorski J. *Glyphosate: A unique global herbicide*. American Chemical Society. (1997). Monograph 189, Washington DC.
20. Ridley W, Mirly K. *The Metabolism of Glyphosate in Sprague–Dawley Rats. I. Excretion and Tissue Distribution of Glyphosate and Its Metabolites Following Intravenous and Oral Administration*. Unpublished report, Monsanto Environmental Health Laboratory. (1988). St. Louis, MO.
21. Howe R, Chott R, McClanahan R. *Metabolism of Glyphosate in Spague–Dawley Rats. II. Identification, Characterization, and Quantitation of Glyphosate and Its Metabolites Following Intravenous and Oral*

- Administration*. Unpublished report, Monsanto Environmental Health Laboratory. (1988). St. Louis, MO.
22. NTP. *Technical Report on Toxicity Studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice*, Toxicity Report Series. (1992). Number 16, NIH Publication 92-3135. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP), Research Triangle Park, NC.
23. Colvin L, Miller J. *Residue and Metabolism. The Dynamics of Accumulation and Depletion of Orally Ingested N-Phosphonmethylglycine-14C*. Unpublished report, Monsanto Company. (1973a). St. Louis, MO.
24. Estivill I, Palleja E. *Tratamiento farmacológico en la mujer gestante*. *Farm Clin*. (1993). 10, pp. 206-214.
25. Strubbe J, Gorissen J. *Meal patterning in the lactating rat*. *Physiol. Behav.* (1973). 25, pp. 18-21.
26. Prabhakaran S, Shameem F, Devi K. *Influence of protein deficiency on hexachlorocyclohexane and malathion toxicity in pregnant rats*. *Vet. Toxicol.* (1993). 35, pp. 429-433.

27. Fujii T. *Transgenerational effects of maternal exposure to chemicals on the functional development of the brain in the offspring.* *Cancer Causes Control* (1997). 8, pp. 525-528.
28. Dalegrave E, Mantese F, Coelho R, Pereira J, Dalsenter P, Langebh A. *The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats.* *Toxicol Lett.* (2003). 30; 142 (1-2), pp. 45-52.
29. Daruich J, Zirulnik F, Gimenez S. *Effect of the Herbicide Glyphosate on Enzymatic Activity in Pregnant Rats and Their Fetuses.* *Environmental Research Section A.* (2001). 85, pp. 226-231.
30. Mc Cauley P, Robinson M, Daniel F, Olson G. *The effects of subchronic chlorate exposure in Sprague-Dawley rats.* *Drug Chem Toxicol.* (1995). 2-3, pp. 185-199.
31. Cramer C, Cooke S, Ginsberg L, Kletzien R, Stapleton S, Ulrich R. *Upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to hepatocellular oxidative stress: Studies with diquat.* *J. Biochem Toxicol.* (1995). 10, pp. 293-298.
32. Hartwell L, Weinert T. *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.* *Science.* (1989). 246, pp. 629-634.

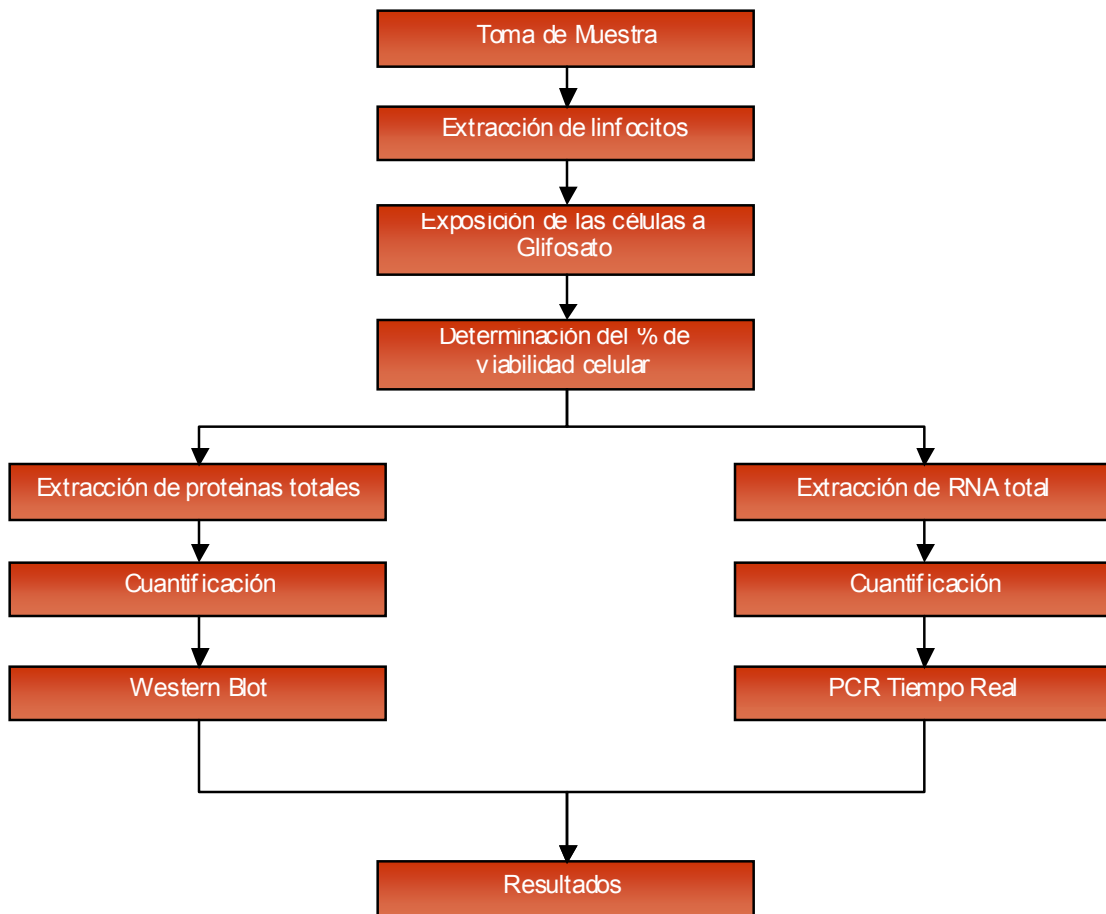
33. Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. *Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation*. *Biology of the Cell*. (2004). 96, pp. 245–249.
34. Molinari, M. *Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer*. *Cell Proliferation*. (2000). 33, pp. 261–274.
35. Stewart Z, Westfall M, Pieterpol J. *Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy*. *Trends Pharmacol. Sci*. (2003). 24, pp. 139–145.
36. Amouroux I, Pesando D, Noel H, Girard J. *Mechanisms of cytotoxicity by cosmetic ingredients in sea urchin eggs*. *Arch. Environ. Contam Toxicol*. (1999). 36, pp. 28–37.
37. Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Bellé R. *Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation*. *Chem. Res. Toxicol*. (2002). 15, pp. 326–331.
38. Nasmyth, K. *A prize for proliferation*. *Cell*. (2001). 107, pp. 689–701.
39. Dorée M. Prix Nobel de médecine 2001 Leland Hartwell, R Timothy Hunt, Paul M Nurse. *Le cycle cellulaire couronné*. *Med. Sci*. (2001). 17, pp. 1226–1229.

40. Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, Bellé R. *Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level*. Environ. Chem. Lett. (2003). 1, pp. 8–12.
41. Mitchell D, Chapman P, Long T. *Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook and coho salmon*. Bull Environ Contam Toxicol. (1987). 39: pp. 1028-1035.
42. Jiraungkoorskul W, Upatham E, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grans S, Pokethitiyook P. *Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. Environ. Toxicol. (2003). 18, pp. 260–267.
43. Tsui M, Chu L. *Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors*. Chemosphere. (2003). 52, pp. 1189–1197.
44. Nešković N, Poleksić V, Ezić I, Karan V, Budimir M. *Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, Cyprinus carpio L*. Bull Environ Contam Toxicol. (1996). 56, pp. 295–302.
45. Nemcsok J, Asztalos B, Vig E, Orban L. *The effect of an organophosphorus pesticide on the enzymes of carp (Cyprinus carpio L.)*. Acta Biol Hung. (1987). 38, pp. 77-85

46. Singh H, Reddy T. *Effect of copper sulphate on hematology, blood chemistry and hepatosomatic index of an indian catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch) and its recovery.* Ecotoxicol Environ Saf. (1990). 20, pp. 30-35.
47. Ferrando M, Andreu-Mbliner E. *Effects of lindane on fish carbohydrate metabolism.* Ecotoxicol Environ Saf. (1991). 22, pp. 17-23.
48. Neškovic N, Elezovic I, Karan V, Poleksic V, Budimir M. *Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (Cyprinus caprio L).* Ecotoxicol Environ Saf. (1993). 25, pp. 173-182.
49. Hodgson E, Goldstein J. *Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics.* In: Introduction to Biochemical Toxicology. 3rd Ed. (2001). Ed. Hodgson E y Smart C. Wiley-Interscience.
50. Gingerich W. *Hepatic toxicology of fishes.* In: Aquatic Toxicology. New York: Raven Press. (1982). Weber LJ, Editor. pp. 55–105.
51. Jyothi B, Narayan G. *Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish Clarias batrachus (Linn.).* Food Chem Toxicol. (1999). 37, pp. 417– 421.
52. Nowak B. *Histological changes in gills induced by residues of endosulfan.* Aquat Toxicol. (1992). 23, pp. 65–84.

53. Souza da Silva R, de Paula Cognato G, Vuaden F, Rezende M, Thiesen F, Fauth M da G, Bogo M, Bonan C, Dias R. *Different sensitivity of Ca²⁺-ATPase and cholinesterase to pure and 2q commercial pesticides in nervous ganglia of *Phyllocaulis sdeiformis* (Mollusca)*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. (2003). 135, pp. 215–220.
54. Brewster D, Warren J, Hopkins W. *Metabolism of glyphosate in Sprague–Dawley rats: Tissue distribution, identification, and quantification of glyphosate-derived materials following a single oral dose*. *Fundam. Appl. Toxicol.* (1991). 17, pp. 43–51.
55. Colvin L, Miller J. *Residue and Metabolism. The Gross Distribution of N-Phosphonylmethylglycine-14C in rabbits*. Unpublished report, Monsanto Company, (1973b). St. Louis, MO.
56. Williams G, Kroes R, Munro I. *Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans*. *Regul Toxicol Pharmacol.* (2000). pp. 117-165.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA UTILIZADA EN LA EVALUACION DEL EFECTO DEL GLIFOSATO EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA 2 EN LINFOCITOS HUMANOS.



**INDUCCIÓN DE LA CICLOXIGENASA 2 EN LINFOCITOS HUMANOS
EXPUESTOS A GLIFOSATO**

Andrea Carolina Cortés Lara, Claudia Milena Monroy Mejía, Helena Groot de Restrepo

Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, A. A. 4976, Bogotá, D.C., Colombia.

Resumen

El glifosato es un herbicida de amplio espectro empleado como ingrediente activo del Roundup. Este inhibe la vía del ácido shikímico encargada de la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales para las plantas. Algunos herbicidas presentan efectos en la fisiología celular, cambios en la expresión génica o daños en el ADN. Por esto, es interesante analizar cambios en los patrones de expresión de la Ciclooxygenasa, la cual cataliza el paso limitante del metabolismo de ácido araquidónico y presenta 2 isoformas, la primera conocida como COX 1 participa en la regulación de funciones fisiológicas normales y la segunda conocida como COX 2 se encuentra involucrada en procesos carcinogénicos. Gracias a las múltiples aplicaciones del glifosato en la agricultura mundial y al papel de esta enzima, el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión del gen de la Ciclooxygenasa 2 (COX 2) en linfocitos humanos expuestos a diferentes dosis de glifosato. El porcentaje de viabilidad celular de los linfocitos expuestos 4 horas a dosis de 0, 5.0, 5.5 y 6 mM de glifosato se determinó mediante el colorante de exclusión azul de Trypan y los niveles de expresión del gen, se determinaron mediante "western blot" y RT-PCR en tiempo real. Los análisis evidencian un efecto dosis dependiente entre la viabilidad y la dosis de glifosato. Por otra parte, no presentan diferencias significativas en la expresión del gen de Cox-2, tanto en la cantidad de enzima producida como en los niveles de ARNm en linfocitos expuestos a glifosato ($P > 0.05$). En conclusión el glifosato no induce la expresión de COX 2 en linfocitos humanos.

Palabras clave: Ciclooxygenasa 2, glifosato, expresión génica, citotoxicidad aguda, Western Blot, RT-PCR en tiempo real.

Introducción

El glifosato (N-fosfometil glicina) es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, empleado como ingrediente activo del Roundup, uno de los compuestos mas ampliamente utilizados en el mundo (1). En su forma pura es un ácido débil prácticamente insoluble en la mayoría de compuestos orgánicos. Las propiedades herbicidas del glifosato fueron descubiertas y utilizadas por primera vez por la compañía Monsanto en 1970 (2). Su utilización en agricultura está en continua expansión y cada año son desarrolladas y puestas en el mercado nuevas formulaciones que utilizan glifosato como ingrediente activo (3). Uno de los avances de la ingeniería genética en los últimos tiempos es el desarrollo de plantas resistentes a este herbicida y por tal razón se utiliza en la mayoría de países (4). Se ha propuesto que su acción herbicida se deriva de la inhibición de la vía del ácido shikimico, encargada de la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales para el desarrollo de la plantas (5). Varios autores proponen que al actuar únicamente en plantas, hongos y bacterias se considera de bajo riesgo para la salud de animales y humanos (6, 7). Sin embargo, se ha reportado que varios tipos de herbicidas presentan efectos perjudiciales en la fisiología celular, llevando a cambios en los patrones de expresión génica normal o en última instancia a generar daños directos en el ADN de los individuos.

Uno de los patrones génicos más interesantes para analizar, debido a los múltiples procesos biológicos en los que participa, es el de la enzima Ciclooxygenasa que cataliza el paso limitante del metabolismo de ácido araquidónico a prostaglandinas y tromboxanos (8, 9, 10). Esta enzima presenta

dos isoformas codificadas en diferentes genes que se conocen como Ciclooxygenasa 1 (COX 1) y Ciclooxygenasa 2 (COX 2). La Ciclooxygenasa 1 se expresa constitutivamente en la mayor parte de tejidos e interviene en el control de funciones fisiológicas normales, como el flujo sanguíneo en el riñón y el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica (11- 14). En contraste, la Ciclooxygenasa 2 es indetectable en la mayoría de tejidos y órganos; sin embargo puede ser inducida por una gran gama de estímulos fisiológicos y ambientales tales como la interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF- α), lipopolisacáridos (LPS), factor de crecimiento transformante β (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (15-17), promotores de tumores (18, 19) y productos de oncogenes (20, 21). La Ciclooxygenasa 2 está involucrada en varios pasos de la carcinogénesis y recientes estudios muestran un incremento de su expresión en cáncer gástrico, esofágico y de colon (12, 22-24). Sin embargo, los mecanismos e implicaciones del incremento de la producción de prostaglandinas en tejidos malignos y premalignos aun no están claros (25).

Existe evidencia suficiente de la sobre expresión patológica de la COX 2 en mecanismos anormales de proliferación celular y disminución de la apoptosis en células transformadas. Esta sobre expresión, en los diferentes tejidos, esta acompañada por la generación de metabolitos secundarios como el malondialdehído y radicales libres involucrados en el estrés oxidativo del ADN (26). Así mismo, causa cambios fenotípicos de las células carcinogénicas por regulación parcial del ciclo celular (27) o interferencia con los puntos de control de la división celular llevando a las células a iniciar la fase S o la G2/M (28) inactivando el proceso de apoptosis (29). Adicionalmente, la enzima es de gran

importancia por su papel en la angiogenesis tumoral y en la supresión de funciones inmunes (30, 31).

Debido al importante papel de la Cicboxigenasa 2 en la regulación de las funciones fisiológicas normales de los individuos y las múltiples aplicaciones del glifosato en las actividades agrícolas y forestales a nivel mundial, el objetivo de este trabajo fue estudiar cambios en la expresión del gen de la Ciclooxygenasa 2 en linfocitos humanos expuestos a diferentes dosis de glifosato.

METODOLOGÍA

Glifosato

El Glifosato que se empleo en el estudio es de grado técnico (Sigma Chemical Co – CAS 1071836). La solución de trabajo tenia una concentración de 25mM (1g de glifosato / 236.4 mL de agua destilada estéril) y se mantuvo a una temperatura de 4° C.

Extracción y Cultivo de Linfocitos Humanos

En esta prueba se realizaron 5 ensayos. Para cada ensayo se obtuvieron 5 muestras de 8 ml de sangre de un donante voluntario sano, con el sistema venojet en tubos con EDTA como anticoagulante. Las extracciones de linfocitos se realizaron tomando 3 ml de Histopaque (Sigma) y adicionando 5 ml de sangre. Luego, se centrifugaron por 20 min a 1900 rpm e inmediatamente después se tomaron de 1- 2 ml del anillo formado en la interfase que fueron resuspendidos en 5 ml de buffer salino fosfato (PBS) y centrifugados por 5 min a 1900 rpm, siendo este ultimo proceso realizado dos veces.

Tratamiento de linfocitos con Glifosato y viabilidad celular

Una vez finalizada la extracción, los linfocitos nuevamente fueron disueltos en PBS y centrifugados a 900 rpm por 6 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 5ml de medio RPMI (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2.2% bicarbonato de sodio. Las muestras se centrifugaron durante 7 min a 900 rpm y el “pellet” celular fue resuspendido en medio RPMI y glifosato en concentraciones de 0, 5.0, 5.5 y 6.0 Mm para un

volumen final de 5 ml. Se incubaron por 4 horas a 37 ° C y 5% CO₂. Luego de las 4 horas de exposición, el porcentaje de viabilidad celular se determinó utilizando el colorante de exclusión azul de trypan en cámara de Newbauer. El tiempo de de exposición y las concentraciones seleccionadas para los ensayos se determinaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en células HT1080 expuestas a glifosato en un rango de 4-7 mM(32).

Western Blot

Después del conteo las células, la suspensión celular se ajusto a un rango de 1×10^6 células/ml en cada una de las 5 replicas. Posteriormente se resuspendió en buffer de lisis (Tris HCl 0.5 M pH 8.0, NaCl 13.15 mg, Triton X 100 0,1%, PMSF 17.4 mg/ml, aprotinina 1.5 mg/ml, leupeptina 10 mg/ml) a 0° C durante 30 min. Luego el lisado se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min.

La cantidad de proteínas totales fue cuantificada con el kit de Bio-Rad (protein assay kit). La electroforesis fue llevada a cabo con iguales cantidades de proteínas totales (50 µg/ muestra) en geles de poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE) al 12%. Se utilizaron albúmina serica bobina y gammaglobulina como estándares de peso molecular en cada electroforesis.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron electro transferidas a membranas de polivinildivinilfluoruro (Sequi-Bbt PVDF) (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia, los geles se tiñeron con azul de comasie (sigma) para asegurar el 100% de transferencia. Los “blots” se incubaron en una solución de bloqueo Tris buffer salino-Tween (TBST) (1 M Tris, pH7.5, 150 mM

NaCl, y 0.05% Tween 20) y 5 % de leche deshidratada baja en grasa, a temperatura ambiente por 1 hora en agitación constante. Para el análisis por Western blot de la enzima COX 2, se utilizó un anticuerpo monoclonal primario (Cayman Chemical), en una dilución de 1:1000 en TBST. Las membranas se dejaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante y luego se lavaron con TBST dos veces durante 5 min. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora adicional a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en una dilución de 1:5000 “anti-human IgG horseradish peroxidase-conjugated” (VECTOR) y se lavaron tres veces con TBST por 5 minutos. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado con 3 ml de la solución SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Finalmente, las membranas fueron expuestas a la película ECL-Hyper film (Amersham) por 1.5 min y para el revelado se utilizaron los productos y reactivos de Kodak.

Análisis de la expresión del gen de la Cicloxigenasa 1 y Cicloxigenasa 2 con PCR en tiempo real

La extracción del ARNm de los genes de la COX 1 y COX 2 se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit SV Total RNA Isolation System (Promega). La cantidad de ARN total de las muestras y el índice de pureza se determinaron mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Las muestras fueron almacenadas a -80 ° C.

La cuantificación del ARNm de la COX 1 y COX 2 se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). La secuencia de los “primers” utilizada fue COX 2 5'-TGCCAGCTOCTGGCCCGCGCTT-3' (sentido) y 5'-

GTGCATCAACACAGGCGCCTCTTC-3' (antisentido); y COX 1 5'-
TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3' (sentido) y 5'-
AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3' (antisentido) (32). Se realizaron
múltiples ensayos para optimizar las condiciones de la amplificación. En estos
ensayos se determinó la temperatura de anillaje para cada par de cebadores
evaluando un rango de temperaturas de 55-65 °C, seleccionando la
temperatura en la cual la reacción de amplificación es más específica. Así
mismo, se determinó la cantidad de la muestra (400 ngr), concentración de los
primers (0,5 uM) y el programa de termociclaje para asegurar la especificidad
de la reacción.

Las muestras se amplificaron en un volumen total de reacción de 20 µl,
utilizando el kit "Quantitect SYBR Green RT-PCR" (Promega) con el siguiente
programa de termociclaje: activación de la RT- polimerasa (50° C por 30 min),
temperatura inicial de denaturación (95° C por 15 min) en el primer ciclo. En
los siguientes 39 ciclos: denaturación (94° C por 15 seg), anillaje (55 – 60° C 30
seg), extensión (72° C 30 seg) y extensión final (72° C por 10 min). Para
determinar la especificidad del PCR, se realizó una curva de fusión de 50-95° C
con un incremento de 0.2° C en cada ensayo de amplificación.

Una vez finalizada la reacción de RT-PCR, se determinó el umbral de detección
o "threshold cycle" (CT) para el gen a prueba COX-2 y para el gen de
referencia COX-1, el cual ha sido ampliamente utilizado en varios estudios
como gen constitutivo. El CT es definido como el punto en el cual la emisión de
fluorescencia es detectable, por encima de la línea base la cual es
automáticamente definida por el equipo. Con esta información, se determinó la

expresión relativa del gen de la Cicloxigenasa 2 en los linfocitos humanos expuestos a glifosato mediante la siguiente relación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{CT gen a prueba} / \text{CT gen a prueba control}}{\text{CT gen referencia} / \text{CT gen a referencia control}}$$

Para calcular el CT de cada gen en cada concentración evaluada se determinaron los promedios y desviaciones estándar de cada uno de los 5 ensayos realizados.

Análisis estadístico

Se realizó una correlación de Pearson con un α de 0.05 ($P > 0.05$), para evaluar el efecto dosis respuesta cuando los linfocitos fueron expuestos a glifosato. Los resultados de RT-PCR en tiempo real se analizaron estadísticamente mediante una prueba t-Student paramétrica con un α de 0.05 ($P > 0.05$).

Resultados

Viabilidad celular

Los linfocitos expuestos durante 4 horas a glifosato a concentraciones de 5,0, 5,5 y 6 mM presentaron una disminución en la viabilidad celular con respecto al control negativo (linfocitos no expuestos) de 80, 61 y 58 % respectivamente.

El análisis de Correlación de Pearson ($r = -0,87$ $P < 0,05$) evidencia un efecto dosis dependiente negativo entre la viabilidad celular y la concentración de glifosato, que indica un claro efecto dosis dependiente, ya que a medida que aumenta la dosis disminuye la viabilidad. En la figura 1 se muestra la curva de correlación entre de la viabilidad celular y las concentraciones de glifosato.

Western blot

Los resultados muestran que los linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato (5,0, 5,5 y 6 mM) no muestran una inducción significativa de la expresión del gen. Es decir, no hay un incremento de la enzima con respecto al control negativo en las cinco replicas analizadas para cada concentración, lo que evidencia que no existe una relación entre las concentraciones evaluadas de glifosato y el incremento de la síntesis de la enzima. En la figura 2 se muestra los resultados de un ensayo representativo.

Análisis por PCR en tiempo real

Los resultados en cada uno de los cinco experimentos muestran que la expresión relativa representada como la relación entre los CT del gen a prueba y los CT del gen a referencia, para COX-2 es de 0.86 en linfocitos expuestos a

una concentración de 5.0 mM de glifosato, de 1,25 a una concentración de 5.5 mM de glifosato y de 1,12 para la concentración más alta de dicho compuesto (6.0 mM). Así mismo, la prueba t- student paramétrica ($P > 0.05$) muestra que no existen diferencias significativas entre las cantidades relativas de ARNm del gen de la Cicloxigenasa 2 producidas en las diferentes concentraciones de glifosato.

Discusión de resultados

La acción herbicida del glifosato, se debe principalmente a la acción de este compuesto sobre varias enzimas que participan en el proceso de síntesis de aminoácidos esenciales para el desarrollo de las plantas. Al no ser este mecanismo compartido por animales y humanos se sugiere que no es capaz de causar efectos adversos sobre ningún proceso biológico de los mismos (1-6,33). No obstante existen varios reportes en los que se propone la acción de este compuesto en otros mecanismos relacionados con el control del ciclo celular en diferentes tipos de especies animales (35-34). Los resultados de uno de estos estudios demuestran la conexión entre los productos que utilizan glifosato como ingrediente activo y un cambio en la regulación de los puntos de control del ciclo celular (35); evento, que ha sido propuesto como una de las principales causas de inestabilidad genómica, procesos tumorales y el desarrollo de varios tipos de cáncer (35). Así mismo, en otro reporte se relaciona la acción de este compuesto con la inhibición de la síntesis global de proteínas en el organismo acuático estudiado (34).

Sin embargo, no se han realizado estudios que relacionen el efecto con la expresión de genes involucrados en los mecanismos de respuesta celular en

humanos. La ciclooxigenasa 2 es uno de los genes involucrados en estos mecanismos ya que su inducción ha sido relacionada con procesos de proliferación celular anormales (27), angiogenesis tumoral (30), proinflamatorios (15-17) y en la supresión de funciones inmunes (31) entre otros. Teniendo en cuenta la importancia de este gen y el impacto del glifosato en la agricultura, fue de particular interés relacionar los efectos de este herbicida y la expresión de la Ciclooxigenasa 2 representada en la cantidad de enzima y ARNm de COX 2 en linfocitos humanos.

Al evaluarse la viabilidad celular del glifosato se evidencia una disminución significativa (20- 42 %) en el porcentaje de linfocitos total que fue expuesto al glifosato con respecto al control negativo. En la dosis mínima (5.0 mM) la viabilidad disminuyó en un 20 % y en la más alta (6mM) en un 58%, lo que indica que el glifosato actúa en algunos procesos estructurales o químicos que afectan la integridad celular, representada en la disminución del número de linfocitos ya sea por procesos de apoptosis o necrosis; sin embargo estudios adicionales que involucren marcadores moleculares específicos para estos mecanismos deben ser llevados a cabo para confirmar esta hipótesis. Estudios paralelos realizados en nuestro laboratorio muestran que otras líneas celulares (células humanas normales - GM38, células humanas de fibrosarcoma - HT1080 y células de ovario de Hamster Chino - CHO) presentan menor sensibilidad al compuesto (viabilidad > 58% en concentraciones de 6 mM) luego de ser expuestas a las mismas concentraciones y tiempo de exposición lo que evidencia que el efecto citotóxico del glifosato es dependiente de la línea celular (32,39).

Los resultados al realizar la cuantificación de la enzima de COX 2 no mostraron cambios significativos en los niveles de la enzima al exponer las células a las concentraciones de glifosato evaluadas, ya que de ser así se evidenciaría una diferencia cualitativa tomando en cuenta parámetros como intensidad y tamaño de la banda entre las células no tratadas (control negativo) y las células con tratamiento. Estos resultados pueden indicar que el glifosato en las concentraciones seleccionadas no altera la cantidad de enzima sintetizada a partir de ARNm. Puesto que este compuesto no genera cambios en la cantidad de enzima sintetizada, a futuro, se podrían realizar ensayos con el fin de determinar si la enzima producida es catalíticamente activa o si por el contrario este agente químico puede producir alteraciones en el sitio activo de esta reduciendo la capacidad de metabolizar el sustrato (ácido araquidónico).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se realizó la cuantificación del ARNm producido a partir de este gen, bajo la hipótesis de que algún mecanismo de regulación transcripcional pudiera ser afectado por el glifosato, alterando los complejos protéicos de unión al mensajero o ser inducido por factores como la IL6 o el factor de necrosis tumoral y en consecuencia, se observarían cambios en los niveles del ARNm de este gen y no sobre la cantidad de enzima producida. Esta hipótesis se basa en los diferentes reportes que han propuesto que las diferencias en cantidad de ARNm que se traduce a proteína esta modulada por mecanismos que incluyen, el tamaño de la región no traducida (UTR) (40) y el número de sitios de unión a proteínas reguladoras (38,40) ya que el último exon del mensajero de COX 2, contiene 23 copias de la secuencia 'ATTTA' la cual es un elemento muy importante en su estabilidad. Estudios recientes demuestran que esta región contiene

múltiples elementos de regulación de la transcripción, incluyendo la caja TATA, el sitio de unión a NF-IL6, 2 sitios AP-2, tres sitios Sp1, dos sitios de unión al factor de necrosis tumoral β y una caja E indispensables en la regulación postranscripcional (16).

Los análisis estadísticos muestran que no existen diferencias significativas en las cantidades relativas de ARN mensajero sintetizadas en los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de glifosato ($P > 0.05$). Esto significa que no hay un incremento de la cantidad del ARNm de gen blanco con respecto al ARNm del gen de referencia (41). Los resultados indican adicionalmente que aunque no se observen diferencias significativas en las diferentes concentraciones analizadas, si puede haber una tendencia de incremento relativo de la cantidad del ARNm al incrementarse la concentración del herbicida.

En conclusión el glifosato no induce un incremento tanto en la síntesis de proteína como ARNm en los linfocitos expuestos a las diferentes concentraciones de glifosato evaluadas, por consiguiente las funciones de este gen sobre la cadena inflamatoria y en la vía del ácido araquidónico, vía muy importante en la producción de prostanoides, mediadores lipídicos básicos en la modulación de funciones homeostáticas normales.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas"

(COLCENCIAS) Contrato Nb. 163-2002. Al Fondo de investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes. Los autores agradecen adicionalmente a todas las personas que participaron en la realización de este proyecto.

Referencias

1. Baerson S, Rodriguez D, Tran M, Feng Y, Biest N, and Dill G. *Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Endopyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase*. Plant Physiol. (2002). Vol. 129, pp. 1265-1275.
2. Baird D, Upchurch R, Homesley W. Franz J. *Introduction of a new broad spectrum postemergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control*. Proc. North Cent. Weed control (1971). conf. 26, pp 64–68.
3. Baylis A. *Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects*. Pest Manag Sci (2000). 56 pp 299-308
4. Smith E, Oehme F. *The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review*. Veterinary Human Toxicology (1992) 34 (6), pp 531-543.
5. Gruys K, Skorski J. *Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides*. Plant Amino Acids. (1999), pp 357-384
6. Herrmann K, Weaver L. *The shikimate pathway*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mbl Biol. (1999) 50, pp 473-503.

7. Stallings W, Abdel-Meguid S, Lim L, Shieh H, Dayringer H, Leimgruber N, Stegeman R, Anderson K, Sikorski J, Padgett S, Kishore G. *Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold.* Proc Natl Acad Sci U S A. (1991). 1,88, (11) pp 5046-50

8. Samuelsson B. *An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes.* Drugs (1987). 33, Suppl 1, pp 2–9,

9. Weissmann G. *Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation.* J Lipid Med (1993). 6, pp 275–86.

10. Kraemer S, Meade E, DeWitt D. *Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5-flanking regulatory sequences.* Arch Biochem Biophys (1992). 293, pp 391–400.

11. Smith, W.L. *Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology.* Annu. Rev. Biochem. (2000). 69, pp 145–182

12. Ristimäki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma.* Cancer Res (1997). 57, pp 1276–1280

13. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. *Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric carcinoma*. J Surg Oncol (1998). 69 pp 168–172
14. Pairet, M, and Engelhardt, G. *Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications*. Fundam. Clin. Pharmacol. (1996). 10 pp 1–17.
15. DuBois R, Abramson S, Croford L. *Cyclooxygenase in biology and disease*. FASEB Journal (1998). 12 pp 1063±1073.
16. Tanabe T, Tohnai N. *Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression*. Prostaglandin Lipid Mediat (2002). 68–9 pp 95–114.
17. Niro H, Otsuka T, Izuhara K, Yamacka K, Ohshima K, Tanabe T. *Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils*. Blood (1997). 89 pp 1621–8.
18. DuBois R, Awad J, Morrow J, Roberts L. *Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and phorbol ester*. J. Clin. Invest. (1994). 93, pp 493–498.
19. Ledwith B, Pauley C, Wagner L, Rokos C, Aberts D, Manam S. *Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-*

tetradecanoylphorbol 12,13- myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. J. Biol. Chem. (1997). 272, pp 3707-3714.

20. Xie W. Herschman H. *v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor.* J. Biol. Chem (1995) 270, pp 27622-27628.

21. Sheng H, Williams C, Shao J, Liang P, DuBois R, Beauchamp R. *Induction of cyclooxygenase-2 by activated Ha-ras oncogene in Rat-1 fibroblasts and the role of mitogen-activated protein kinase pathway.* J. Biol. Chem.(1998^a). 273, pp 22120-22127.

22. Zimmermann K, Sarbia M, Weber A, Borchard F, Gabbert H, Schror K. *Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma.* Cancer Res (1999). 59, pp 198-204.

23. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK. *Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients.* Clin Cancer Res (2000). 6, pp 4064-8.

24. Hyung-Seok K, Hyung-Roul Y, Ji-Shin L, Kyung-Whan M, Jae-Hun C, Chang-Soo P. *Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer.* Lung Cancer (2003). 42, pp 163-170

25. Langenbach R, Loftin C, Lee C, Tiano H. *Cyclooxygenase Knockout Mice models for elucidating isoform-specific functions*. *Biochemical Pharmacology*. (1999). Vd. 58, pp 1237–1246.
26. Plataras J, Guengerich F, Nebert D , Marnett L *Xenobiotic metabolizing cytochrome P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde*. *J Biol Chem* (2000). 275, pp 11784–11790.
27. Gilroy D, Saunders M, Wu K. *COX-2 expression and cell cycle progression in human fibroblasts*. *Am J Physiol Cell Physiol* (2001). 281, pp C188–C194,.
28. Trifan O, Smith R, Thompson B, Hla T. *Overexpression of cyclooxygenase-2 induces cell cycle arrest. Evidence for a prostaglandin-independent mechanism*. *J Biol Chem* (1999). 274 pp 34141–34147.
29. Tsujii M, DuBois R. *Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells over-expressing prostaglandin endoperoxide synthase 2*. *Cell* (1995). 83, pp 493–501.
30. Honn K, Bockman R, Marnett L *Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis*. *Prostaglandins* (1981). 21, pp 833-864.

31. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson W, Isaacs W, De Marzo A. *Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective*. Cancer Lett. (2004). 8, pp215(1):1-20
32. Hla T, Neilson K: *Human Cyclooxygenase 2 cDNA*. Proc Natl Acad Sci. (1992).266, pp7384–7388.
33. Williams G, Kroes R, Munro I *Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans*. Regul Toxicol Pharmacol. (2000), pp117-65.
34. Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, Bellé R. *Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level*. Environ. Chem Lett. (2003). 1, pp8–12.
35. Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. *Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation*. Biology of the Cell (2004). 96 pp 245–249
36. Li Ma, Piero del Soldato, John L. Wallace. *Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance*. FNAS (2002). vol. 99 .no. 20.
37. Pommery N, Taveme T, Teliez A, Goossens L, Charlier C, Pommery J, Goossens JF, Houssin R, Durant F, Henichart JP. *New COX-2/5-LOX*

Inhibitors: Apoptosis-Inducing Agents Potentially Useful in Prostate Cancer Chemotherapy. J Med Chem (2004). 47(25), pp 6195-206

38. Stack E, DuBois N. *Regulation of cyclo-oxygenase-2 Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* (2001). Vol. 15. No. 5, pp 787-800,

39. Monroy C, Cortés A, Sicard D, Flew a M, Groot H. *In vitro evaluation of glyphosate – induced DNA damage in fibrosarcoma cells HT1080 and chinese hamster ovary (CHO) cells.”* Environmental and Molecular Mutagenesis (2004).44 (3), pp 119

40. Dixon D, Kaplan C, McIntyre T, Zimmerman G, Prescott S. *Post transcriptional Control of Cyclooxygenase-2 Gene Expression the role of the 39-untranslated region.* (2000) Vol. 275. No. 16, pp. 11750–11757.

41. Freeman W, Walker S, Vrana K. *Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.* Biotechniques. (1999). 26 (1):112-22, pp 124-5.

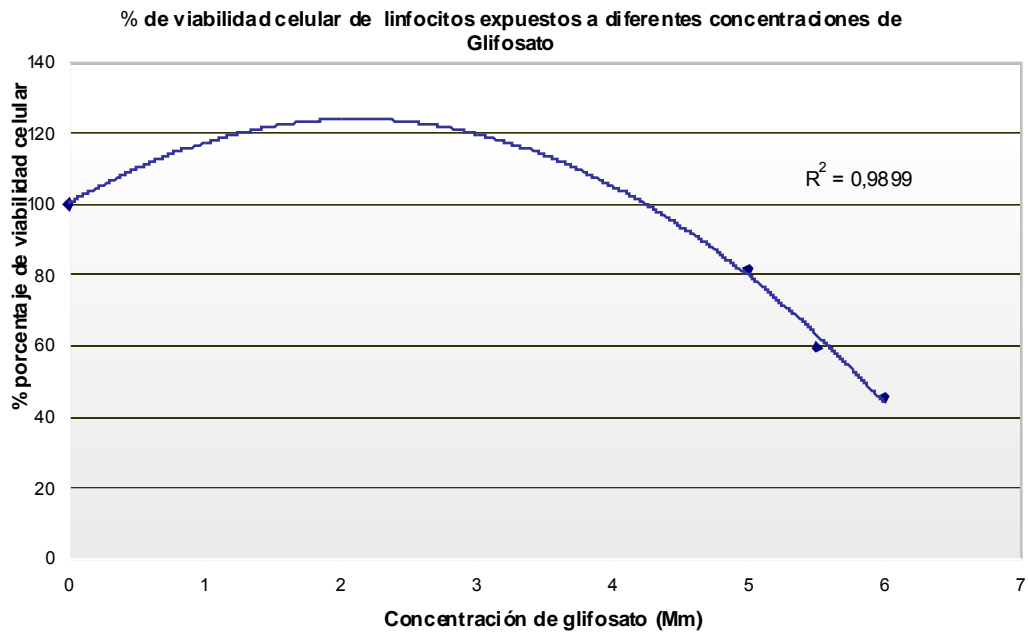


Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato durante 4 horas. Coeficiente de correlación =0.99.

Control 5.0 mM 5.5 mM 6.0 mM

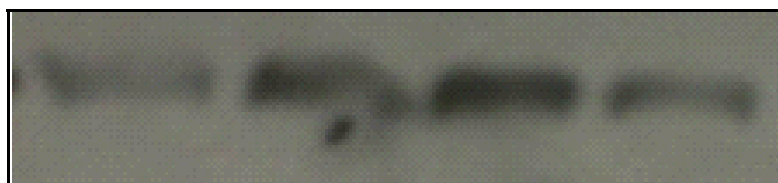
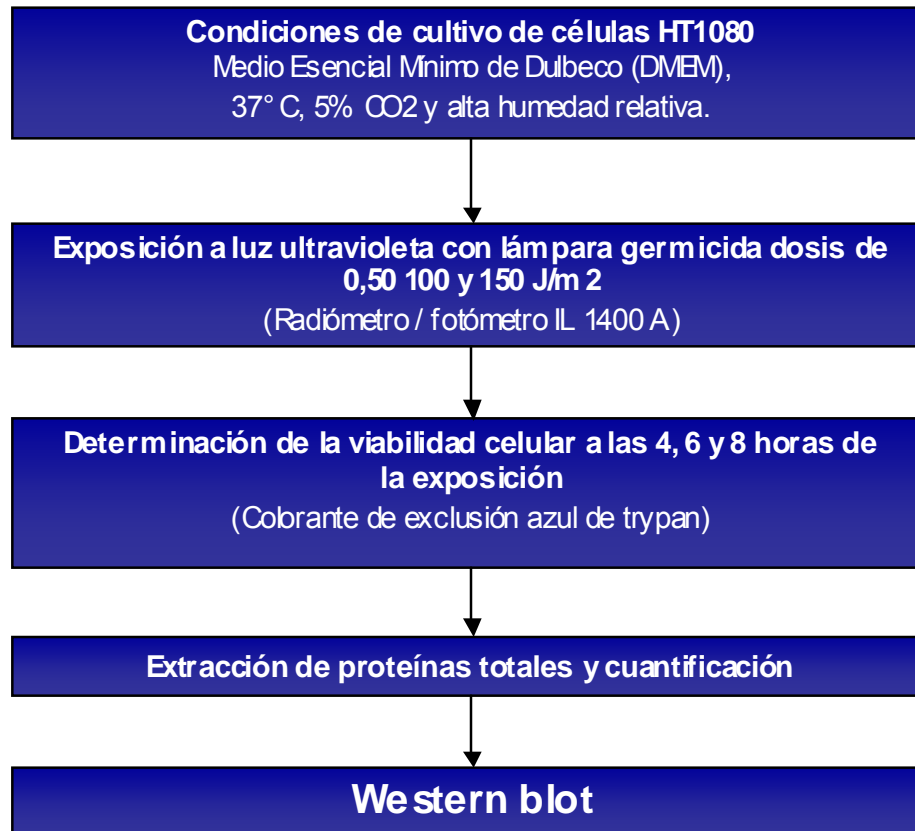


Figura 2. Expresión de la Ciclooxygenasa 2 en linfocitos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato. Resultados de “Western Blot”.

DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA UTILIZADA EN LA INDUCCIÓN DE LA ENZIMA CICLOOXIGENASA 2 EN LA LÍNEA CELULAR DE FIBROSARCOMA HT1080 EXPUESTA A RADIACIÓN ULTRAVIOLETA



**Inducción de la enzima Ciclooxygenasa 2 en la línea celular de
fibrosarcoma HT1080 expuesta a radiación ultravioleta**

Cortés Andrea¹, Monroy Claudia¹, Ruiz Juan¹, Sicard Diana¹, Groot Helena¹

Laboratorio de Genética Humana¹, Universidad de Los Andes, Bogotá,

Colombia, PO Box: 4976

Se ha reportado que la radiación ultravioleta induce la sobreexpresión de la Ciclooxygenasa 2 (COX 2). Esta enzima juega un papel importante en muchos procesos biológicos primordiales tales como la inflamación, agregación de plaquetas, apoptosis, carcinogenesis y angiogenesis. Se han reportado varios estudios en los cuales se han estudiado los patrones de expresión de COX 2 en respuesta a las radiaciones UVA y UVB tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo hasta el momento no se conocen investigaciones sobre su respuesta a la radiación UVC. Este tipo de radiación es filtrada por la capa de ozono y debido a la reciente reducción de la misma por actividades industriales se estima que la cantidad de UVC que alcanza la superficie terrestre se ha incrementado en un 5% en años recientes; haciendo que esta cobre una gran importancia a nivel ambiental. Adicionalmente, esta radiación es utilizada en la gran mayoría de laboratorios del mundo, como germicida, y las personas que allí trabajan se pueden ver expuestas accidentalmente a la luz UVC, convirtiéndose en un factor de riesgo ocupacional. El propósito de este estudio fue determinar el comportamiento de la enzima Cox-2 en células expuestas a dosis de 50 a 150 J /m² de radiación UVC. La extracción de proteínas totales se realizó a las 4, 6 y 8 horas después de la exposición. Se determinó la

viabilidad celular mediante el colorante de exclusión azul de trypan y la cantidad de expresión de la enzima se determinó mediante la técnica de "western blot". Los resultados muestran que la viabilidad celular no se reduce más del 40% tras la irradiación y que la expresión de la enzima es dosis dependiente, siendo detectable a partir de los 100 J/m². En conclusión, la radiación UVC puede activar la expresión del gen de Cox-2 en células HT1080. Por esta razón se sugiere ampliar las investigaciones relacionadas con radiación UVC en otros modelos experimentales.

INTRODUCCION

La Ciclooxygenasa (prostaglandina endoperoxido sintasa) es la enzima clave en el proceso de biosíntesis de las prostaglandinas. Las prostaglandinas (PG) son potentes mediadores lipídicos de diferentes procesos celulares, incluyendo agregación plaquetaria, función renal, integridad de la mucosa gástrica, reactividad vascular y modulación neuronal (1). Dos isoformas de esta enzima han sido identificadas y conocidas como Ciclooxygenasa 1 (COX-1) y Ciclooxygenasa 2 (COX-2). Ambas isoenzimas transforman el ácido araquidónico en prostaglandinas, pero se diferencian en su distribución y su rol fisiológico ya que están reguladas por sistemas de señalización diferentes (2). Bajo la mayoría de circunstancias, COX-1 es producida constitutivamente en casi todos los tejidos bajo condiciones basales y desempeña un papel clave en el mantenimiento de funciones homeostáticas. En caso contrario, COX-2 no es detectada en la mayoría de tejidos normales, pero puede ser inducida por varios estímulos de carácter fisiológico y pro inflamatorio tales como la luz, factores de crecimiento, oncogenes y citoquinas (3). Estos estímulos son resultado de un aumento de la síntesis de prostaglandinas en tejidos neoplásicos y tejidos inflamados (4 - 6).

Diferentes estudios han mostrado que en tejidos malignos y premalignos los niveles de COX-2 se han encontrado elevados (6-8) y los nuevos trabajos de investigación se han diseñado buscando el entendimiento del rol de este gen en diferentes etapas y procesos carcinogénicos, angiogenesis, apoptosis, función inmune e invasividad tumoral; adicionalmente algunos de estos estudios han mostrado que COX-2 puede jugar un papel clave en la

carcinogenesis inducida por radiación ultravioleta (9 - 12) fotocarcinogénesis y procesos de envejecimiento (13, 14). Reportes publicados han investigado los patrones de expresión de COX-2 en respuesta a la radiación UV de diferentes longitudes de onda como la UVA (320 ± 400 nm) y la UVB (280 ± 320 nm). Así mismo, investigaciones previas concernientes a la luz ultravioleta y la expresión de COX-2 han sido enfocadas principalmente en el espectro de la UVB y sus efectos sobre la expresión del gen. En estos estudios, se ha observado que la cantidad de la proteína COX-2 se incrementa después de la exposición a UVB tanto en los ensayos realizados en piel humana como en keratinocitos humanos en cultivo (15), UVB induce la expresión de COX-2 en células HaCaT a través de la activación del gen p38 (16, 17), así como también la inducción por la activación del receptor EGF en el mismo tipo celular después de ser expuesta a UVB (18). En ensayos realizados con ratones expuestos a radiación UVB la expresión de COX-2 se incrementa consistentemente, observándose cambios hiperplásicos en piel, comienzos de papilomas y cáncer de células escamosas (SCC). Así mismo, la cantidad de la enzima se incrementa en carcinomas baso celulares (BCC) en humanos y murinos (19). La radiación UVB puede activar la expresión del gen de la ciclooxigenasa- 2 en células humanas epiteliales ya sea por la activación directa o por inducción de mecanismos paracrinos (20).

Las radiaciones UVB y UVA-2 han mostrado una fuerte inducción tanto del ARNm como de la enzima COX-2 así como también un incremento en la producción de prostaglandina E después de la irradiación (21). La radiación UVA induce un incremento dosis dependiente en los niveles de proteína y ARNm en líneas celulares de keratinocitos (16). Como conclusión las

radiaciones UVB y UVA dan lugar a un incremento en la expresión de la cicloxigenasa 2 (COX-2) en varios modelos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hasta el momento no se conocen estudios realizados para analizar la respuesta de esta enzima clave a la radiación ultravioleta C (UVC). La radiación UVC (200 ± 280 nm) es filtrada por la capa de ozono. Sin embargo debido a la reciente reducción de la misma, la UVC ha comenzado a ser un factor físico importante al cual están expuestas las poblaciones. Adicionalmente la UVC es usada en laboratorios como germicida y frecuentemente las personas que trabajan en este medio se ven expuestas a este tipo de radiación, convirtiendo a la misma en un riesgo ocupacional. El propósito principal de este estudio fue determinar las diferencias en la cantidad de la enzima Cox 2 producida en la línea celular HT1080, en respuesta a la exposición a diferentes dosis de radiación ultravioleta C.

MATERIALES Y METODOS

Línea celular y condiciones de cultivo

La línea celular de fibrosarcoma humano HT1080 fue cultivada en medio Dulbecco modificado Eagle's (DMEM) suplementado con 1% penicilina/estreptomicina (5000 U/ml y 5000 ug/ml), 2% L-glutamina (200mM), 2.5% bicarbonato de sodio (7.5%) y 5 % de suero bovino fetal (FBS). El cultivo fue mantenido a una temperatura de 37°C en incubadora con 5% CO₂. Los reactivos para el cultivo celular fueron suministrados por Gibco y Sigma Chemical Co.

Tratamiento con UVC y viabilidad celular

Las células fueron lavadas con buffer salino fosfato (PBS) y posteriormente fueron expuestas a las dosis de UVC (254 nm) en un rango de 50 a 150 J/m² con lámparas germicidas. El tiempo de exposición requerido para obtener esta dosis fue determinado con la ayuda de un Radiómetro/Fotómetro IL1400A. La viabilidad celular o integridad de la membrana plasmática fue evaluada mediante el colorante de exclusión azul de Trypan (Gibco) y contabilizada en una cámara de Newbauer después de la irradiación a las células. El control negativo fueron células no irradiadas.

Western Blot

Después del conteo las células, la suspensión celular se ajustó a un rango de 1×10^6 células/ml en cada una de las 5 replicas. Posteriormente se resuspendió en buffer de lisis (Tris HCl 0.5 M pH 8.0, NaCl 13.15 mg, Triton X 100 0.1%, RBSF 17.4 mg/ml, aprotinina 1.5 mg/ml, leupeptina 10 mg/ml) a 0° C durante 30 min. Luego el lisado se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min.

La cantidad de proteínas totales fue cuantificada con el kit de Bio-Rad (protein assay kit). La electroforesis fue llevada a cabo con iguales cantidades de proteínas totales (50 µg/ muestra) en geles de poliacrilamida denaturantes (SDS-PAGE) al 12%. Se utilizaron albúmina serica bobina y gammaglobulina como estándares de peso molecular en cada electroforesis.

Después de la electroforesis, las proteínas fueron electro transferidas a membranas de polivinildivinilfluoruro (Sequi-Bbt PVDF) (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia, los geles se tiñeron con azul de comasie (sigma)

para asegurar el 100% de transferencia. Los "blots" se incubaron en una solución de bloqueo Tris buffer salino-Tween (TBST) (1 M Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, y 0.05% Tween 20) y 5 % de leche deshidratada baja en grasa, a temperatura ambiente por 1 hora en agitación constante. Para el análisis por Western blot de la enzima COX 2, se utilizó un anticuerpo monoclonal primario (Cayman Chemical), en una dilución de 1:1000 en TBST. Las membranas se dejaron por 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante y luego se lavaron con TBST dos veces durante 5 min. Posteriormente, se incubaron durante 1 hora adicional a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en una dilución de 1:5000 "anti-human IgG horseradish peroxidase-conjugated" (VECTOR) y se lavaron tres veces con TBST por 5 minutos. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado con 3 ml de la solución SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce). Finalmente, las membranas fueron expuestas a la película ECL-Hyper film (Amersham) por 1.5 min y para el revelado se utilizaron los productos y reactivos de Kodak.

RESULTADOS

Los resultados muestran un efecto dosis respuesta inversamente proporcional entre la viabilidad celular y las diferentes dosis de luz ultravioleta C después de 4 horas de exposición ($r = -0,94$, $P < 0,05$). Se observa una disminución de la viabilidad celular del 35,28% a una dosis de 150 de J/m^2 de UVC, del 32,06% a una dosis de 100 J/m^2 y del 23,36% a una dosis de 50 J/m^2 . Seis horas después de la exposición a la UVC la viabilidad celular se incremento en un 9,58% en todas las dosis evaluadas. Así mismo, se puede evidenciar que en este tiempo se conserva significativamente la relación entre la dosis de luz

ultravioleta y el porcentaje de viabilidad en cada uno de los tratamientos ($r = -0,99$, $P < 0,05$), es decir que aunque se presente un aumento en la viabilidad celular la diferencia entre tratamientos se conserva. Después de ocho horas de exposición a la UVC la viabilidad celular se incrementó en un 15,95% en la dosis de 50 J/m^2 , en un 13,26% en la dosis de 100 J/m^2 y en un 10,42% en la dosis de 150 J/m^2 . El test de Dunnett's muestra que se presentan diferencias significativas entre el tiempo posterior a la exposición y el aumento en el porcentaje de la viabilidad celular ($p > 0,01$). Al observar la grafica se evidencia una tendencia positiva entre la viabilidad celular y el tiempo transcurrido después de la exposición. En la tabla 1 se presentan las diferencias entre la viabilidad celular y las dosis evaluadas con respecto al control. En la figura 1 se muestran los porcentajes de viabilidad celular con respecto a la dosis y tiempo de recuperación después de la exposición.

Los analisis de western blot indican que las celulas HT1080 expuestas a radiacion ultravioleta presentan un incremento significativo a nivel cualitativo en la cantidad de enzima COX 2 (figura 2) producida a partir del ARNm con respecto al control negativo (celulas no tratadas). Los resultados señalan que la expresion de la COX 2 en celulas no tratadas con radiacion UVC casi indetectable a las 4, 6 y 8 horas posteriores a la exposicion. Asi mismo, se evidencia que en las celulas expuestas a una dosis de 50 J/m^2 no se observan diferencias apreciables en la cantidad de enzima de cox 2 producida, comparada con el control negativo, después de 4, 6 y 8 horas del tratamiento. En contraste, la cantidad de enzima detectada en estos tiempos a dosis de 100 y 150 J/m^2 si presenta diferencias.

Al comparar la cantidad de Cox-2 entre las dosis más altas se observa que no hay mayores diferencias a las 4 y 6 horas después de la exposición; sin embargo, a las 8 horas se evidencia el efecto diferencial entre la dosis y la producción de la enzima ante la exposición ya que probablemente es el tiempo requerido para que los mecanismos de reparación y respuesta celular a este tipo de daños se activen.

DISCUSION DE RESULTADOS

La radiación ultravioleta da lugar a la formación de dímeros de pirimidina y anillos de ciclobutano en las bases que componen al ADN. Las especies reactivas del oxígeno generadas como compuestos intermediarios después de la luz ultravioleta pueden resultar en aductos y otro tipo de daños oxidativos (22). Adicionalmente a estos daños generados en el ADN, la luz ultravioleta tiene la capacidad de actuar como iniciador o promotor de tumores (22).

La exposición a la luz ultravioleta además de promover el incremento y el tiempo de procesos inflamatorios tiene la capacidad de modular la expresión de numerosos genes asociados con los mecanismos de proliferación y diferenciación celular, producción de eicosanoides y citoquinas, así como la síntesis de factores de crecimiento (22-24). En varios tipos de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* se han investigado los patrones de expresión de COX-2 en respuesta a la radiación UV de diferentes longitudes de onda como la UVA (320 ± 400 nm) y la UVB (280 ± 320 nm). Sin embargo hasta el momento no se conocen estudios realizados para determinar la respuesta de este gen a la luz ultravioleta C.

Los resultados muestran un efecto dosis dependiente entre el porcentaje de viabilidad celular y la dosis de luz ultravioleta en los tiempos y dosis analizados ($p < 0.05$). La radiación ultravioleta C tiene la capacidad de reducir el porcentaje de viabilidad en las células expuestas y su disminución se incrementa de forma paralela a la dosis de UVC. La reducción en la viabilidad celular puede estar explicada por la formación de especies reactivas de oxígeno intracelulares que, pueden causar daño oxidativo al ADN y adicionalmente disfunciones en la mitocondria ya que en este organelo los sistemas de reparación de ADN son casi inexistentes.

Las especies reactivas del oxígeno parecen estar involucradas en una gran variedad de efectos biológicos incluyendo el proceso de apoptosis y las señales de transducción mediante la activación de Src, NF-kappa B y EGFR o reacciones de peroxidación lipídica que traen como consecuencia un aumento en la cantidad de ácido araquidónico libre (10,22, 25,26).

Las especies reactivas de oxígeno se generan por reacciones metabólicas intracelulares como el sistema respiratorio de la mitocondria (27,28), en las reacciones de las enzimas metabólicas citocromo P450 (29-31) o la cascada del ácido araquidónico durante la síntesis de las prostaglandinas (32).

Los análisis de western blot mostraron un incremento significativo en las cantidades relativas de la enzima producida a partir del ARNm con respecto al control negativo (células no tratadas) en todas las dosis y tiempos analizados, sin embargo la mayor inducción de la síntesis de la enzima se observó en la dosis de 150 J/ m^2 a las 8 horas después de la exposición a la radiación UVC. Estos resultados sugieren que este puede ser el tiempo necesario para la

activación de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta celular al estrés generado por la exposición al UVC. Un estudio similar realizado en células expuestas a peróxido de hidrógeno muestra que los niveles de ARNm de los genes de p53, Bax y cox-2 se encuentran aumentados a las 3 y 6 horas posteriores a la exposición, como consecuencia del aumento de especies reactivas de oxígeno generadas. Indicando que este tipo de compuestos modula la síntesis de ARNm y enzima de la ciclooxigenasa 2.

El incremento en la viabilidad celular observado después de varias horas de exposición puede también correlacionarse con el incremento en la cantidad de la enzima, ya que se ha propuesto que el aumento de la expresión del gen Bcl-2 y la reducción en la apoptosis están directamente relacionados con la expresión de la ciclooxigenasa 2 en células malignas (33). Adicionalmente mecanismos de reparación del ADN podrían estar influenciando la recuperación de las poblaciones celulares a través del tiempo.

En general se han descrito varios mecanismos en los cuales participan las prostanoides generadas a partir de las reacciones catalizadas por la ciclooxigenasa 2, dentro de estos mecanismos se encuentran la inhibición de la apoptosis (33) el aumento en la formación de aductos y el decremento en la capacidad de repararlos (34, 35)

En conclusión este tipo de estudios son indispensables para la identificación de diferentes vías ya sean metabólicas o de señalización molecular relacionadas con la proliferación o la inflamación después de la exposición a la luz ultravioleta ya que ofrecen la oportunidad de utilizar agentes específicos

que bloqueen o contrarestren eventos tempranos que podrian desencadenar procesos carcinogenicos.

REFERENCIAS

1. Tanabe T, Tohnai N. *Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression*. Prostaglandins & other Lipid Mediators 68–69 (2002), pp 95–114
2. Morita I. *Distinct functions of COX-1 and COX-2* Prostaglandins & other Lipid Mediators 68–69 (2002) pp 165–175
3. Garavito M, Malkowski M, DeWitt D. *The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2*. Prostaglandins & other Lipid Mediators 68–69 (2002), pp 129–152
4. Smith W L, Meade E A, Dewitt DL. *Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes -1 and -2* Ann. New York Acad. Sci. (1994) 714, pp 136-142.
5. Subbaramaiah K. *Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells*. Cancer Res. 56 (1996), pp 4424–4429
6. Wadleigh DJ. *Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages*. J. Biol. Chem 275 (2000), pp 6259–6266

7. Toyota M, Shen L, Ohe-Toyota M, Hamilton S, Sinicrope F, Issa JP. *Aberrant Methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG Island in Colorectal Tumors* Cancer Res. (2000).60, pp 1044 - 4048.
8. Goodman J, Bowman E, Chanock E, Alberg A, Harris C. *Arachidonate lipoygenase (ALOX) and cyclooxygenase (COX) polymorphisms and colon cancer risk.* Carcinogenesis. (2004), pp 10 1093.
9. Brecher AR. *The role of cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of skin cancer* J Drugs Dermatol.(2002). 1, pp 44-7.
10. Fischer S , Conti C , Viner J, Aldaz M, Lubet A. *Celecoxib and difluoromethylornithine in combination have strong therapeutic activity against UV-induced skin tumors in mice.* Carcinogenesis (2003). vol.24 no.5 pp.945-952
11. Wilgus T, Parrett M, Ross M, Tober K, Robertson F, Oberszyn T. *Inhibition of ultraviolet light B-induced cutaneous inflammation by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor.* Adv Exp Med Biol (2002). 507, pp 85-92.
12. Fischer S, Lo H, Gordon G, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti C. *Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis.* Mol Carcinog (1999). 25 (4), pp 231- 40.

13. Smith W, Meade E, Dewitt D. *Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes -1 and -2*. Ann. New York Acad. Sci (1994). 714, pp 136-142.
14. Jin Young Seo a, Eun Kyung Kim a, Soo Hwan Lee b, Kyung Chan Park a, Kyu Han Kim a, Hee Chul Eun a, Jin Ho Chung a. *Enhanced expression of cyclooxygenase-2 by UV in aged human skin in vivo*. Mechanisms of Ageing and Development (2003). 124, pp 903-910
15. Buckman S, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland A. *COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer*. Carcinogenesis vol.19 no.5 (1998) pp.723-729,
16. Bachelor M, Silvers A, Bowden G. *The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT*. Oncogene (2002) 21, pp 7092 – 7099
17. Tang Q, Chen W, Gonzales MS, Finch J, Houe H and Bowden GT. *Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes*. Oncogene (2001). 20, pp 5164 -5172.
18. Ashida M, Bito T, Budiyo A, Ichihashi M, Ueda M. *Involvement of EGF receptor activation in the induction of cyclooxygenase-2 in*

HaCaT keratinocytes after UVB. *Experimental Dermatology* (2003). 12 (4), pp 445-452

19. An K, Athar M, Tang X, Katiyar S, Russo J, Beech J, Aszterbaum M, Kopelovich L, Epstein E Jr, Mukhtar H, Bickers DR. *Cyclooxygenase-2 expression in murine and human nonmelanoma skin cancers: implications for therapeutic approaches*. *Photochem Photobiol* (2002). 76 (1), pp 73-80.

20. Soriani M, Luscher P, Tyrrell R. *Direct and indirect modulation of ornithine decarboxylase and cyclooxygenase by UVB radiation in human skin cells*. *Carcinogenesis* (1999). vol.20 no.4, pp.727–732.

21. Mahns A, Wolber R, Stab F, Klotz L, Sies H. *Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis*. *Photochem Photobiol Sci* (2004). 3 (3), pp 257-62

22. Rosette C, Karin M. *Ultraviolet light and osmotic stress. Activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors*. *Science* (1996). 174, pp1194–1197.

23. Ananthaswamy H. *Ultraviolet light as a carcinogen*. In *Bowden, G.T. and Fischer, S.M.* (eds), *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, New York, NY, (1997) pp 255-279.

24. Yuspa S, Dlugosz .A. *Cutaneous carcinogenesis: natural and experimental*. In Goldsmith,L.A (ed.), *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the Skin*, Vol. II, 2nd Edn. Oxford Universit Press, New York, NY (1991) pp 1365-1402.
25. Devary Y, Gootlieb R, Smeal T, Karin M *The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases*. Cell (1992). 71, 1081–1091.
26. Devary Y, Rosette C, DiDonato J, Karin M *NF-kappa B activation by ultraviolet light not dependent on nuclear signal*. Science (1993). 261, pp 1442–1445.
27. Cadenas E, Davies K. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging*. Free Radic. Biol. Med (2000). 29, pp 222–230.
28. Kow altow ski, A. J., and Vercesi, A. E *Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress*. Free Radic. Biol. Med. (1999). 26, pp 463–471.
29. Parke D, Sapota A. *Chemical toxicity and reactive oxygen species*. Int. J. Occup. Med. Environ. Health (1996). 9 pp 331–340.
30. Rapoport R, Sklan D, Hanukoglu I. *Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450_{scc} and P450_{c11} systems: NADPH and steroid dependence*. Arch. Biochem. Biophys (1995). 317, pp 412–416.

31. Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L, Sklan D. *Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system*. Arch. Biochem Biophys (1993). 305, pp 489–498.
32. Cadenas, E. *Biochemistry of oxygen toxicity*. Annu. Rev. Biochem (1989). 58, pp 79–110.
33. Tsujii M, DuBois R. *Alteration in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2*. Cell (1995). 83, pp 493–501.
34. Liehr J, Wang M. *Lipid hydroperoxide-induced endogenous DNA adducts in hamsters: Possible mechanisms of lipid hydroperoxide mediated carcinogenesis*. Arch. Biochem. Biophys. (1995), 316, pp 38–46.
35. Cerutti P, Trump B. *Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis*. Review. Cancer Cells (1991). 3, pp 1–7.

Dosis UVC (J/m ²)	Promedio (Viabilidad celular)	Desviación estándar (viabilidad celular)
0	100	0
50**	83,10	6,80
100**	73,65	4,71
150**	64,72	3,35

TABLA 1. Viabilidad de células expuestas a luz ultravioleta C. Resultados de tres experimentos independientes. ** Diferencias altamente significativas entre las dosis y el control negativo. (P<0.01)

% de viabilidad celular de la línea de Fibrosarcoma HT1080 a las 4, 6 y 8 horas después de la exposición a diferentes dosis de radiación ultravioleta C

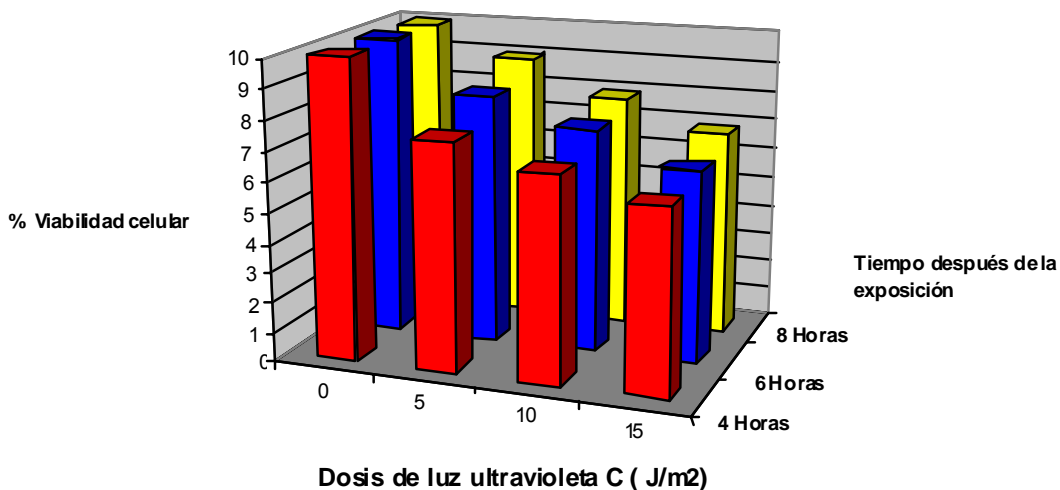


FIGURA 1. Viabilidad celular de la línea HT1080 expuesta a diferentes rangos de radiación de luz ultravioleta C y diferentes tiempos después de la exposición

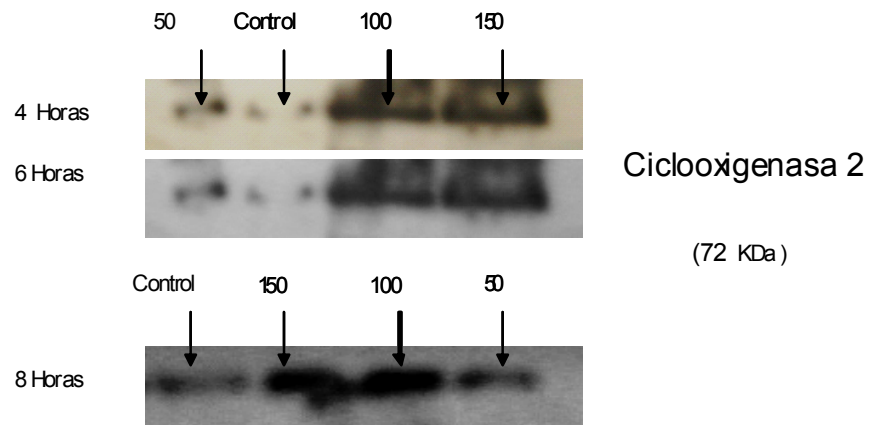


Figura 2. Expresión de la Ciclooxygenasa 2 en células HT 1080 a las 4, 6 y 8 horas después de la exposición a dosis de 0, 50, 100 y 150 J/m² de radiación ultravioleta C.

CONCLUSIONES GENERALES

- Existe un efecto dosis dependiente entre la concentración de glifosato y el porcentaje de viabilidad celular ($p < 0.05$). A medida que aumenta la concentración de glifosato disminuye el porcentaje de viabilidad celular.
- Las concentraciones de glifosato en prueba no son capaces de aumentar la cantidad de la enzima de Cox 2 en los linfocitos expuestos durante 4 horas a este agente químico.
- Las diferentes concentraciones en prueba del glifosato (5.0, 5.5 y 6 mM) no alteran la cantidad del ARNm del gen de COX-2.
- No existe un efecto dosis dependiente entre la concentración de glifosato y la cantidad de enzima y ARNm en los linfocitos expuestos a este herbicida.
- Existe un efecto dosis dependiente entre las dosis de radiación ultravioleta C y la viabilidad celular ($p < 0.01$). A mayor dosis de ultravioleta C se observa una menor viabilidad celular.
- No se observó un efecto de recuperación celular significativo a las 4, 6 y 8 horas posteriores a la exposición a UVC ($p > 0.01$)
- Las dosis de radiación UVC inferiores a 100 J/m² no parecen inducir la expresión de Cox 2
- La expresión de la COX 2 se vio incrementada en las dosis más altas de radiación ultravioleta C
- La radiación ultravioleta C induce la sobre expresión de la enzima cicboxigenasa 2.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis Helena Groot de Restrepo por todo su apoyo y confianza durante el transcurso de mi maestría, sus consejos y enseñanzas fueron indispensables para mi formación integral como persona.

A mi Co-directora de tesis Diana Sicard

A toda mi familia especialmente a mis padres y hermano por todo su apoyo y cariño.

A mis amigos Claudia Monroy, Juan Eduardo Ruiz y Maria Paula Rozo

A la familia Arenas por toda su comprensión, principalmente a Andrés Arenas.

Y finalmente a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Humana.

ANEXOS

EXTRACCION DE PROTEINAS TOTALES

TECNICA WESTERN BLOT

Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana).Martha Mesa y Carolina Clavijo. (Universidad Javeriana), Protein blotting a practica approach, Dunbar B. 1996.Molecular Cloning, Sambrook et al.

1. Preparar el buffer de lisis el mismo día que se va a realizar la extracción y mantener en hielo.

Com puesto	Peso/Volum en
Stock buffer Tris HCl pH 8.0, 0.5 M	150 μ L
NaCl	13.15 mg
Triton X 100	15 μ L
Stock PMSF (17.4 mg/ml)	8.62 μ L
Stock aprotinina (1.5 mg/ml)	10 μ L
Stock leupeptina (10 mg/ml)	1.5 μ L
Agua destilada / Desionizada	1.30 μ L

2. Las células deben estar confluentes para iniciar los ensayos. (Condiciones de cultivo: 95% humedad, 5% CO₂, 37 ° C, medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 5% en cajas de petri de 15ml).

3. Aspirar el sobrenadante y lavar con 5ml de buffer salino fosfato (PBS).

5. Repetir el paso 3

6. Agregar 1ml de tripsina al 0.1%, incubar a 37° C durante un minuto.

7. Adicionar 8 ml de medio DMEM completo.

8. Transferir los 8 ml de suspensión celular a un tubo de centrifuga.

9. Centrifugar a 900 rpm durante 5 minutos.

10. Descartar todo el sobrenadante.

11. Resuspender las células en 1 ml del buffer de lisis a 0 ° C. (sobre hielo)

12. Transferir a un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml

13. Mantener la solución en hielo durante 30 min

14. Centrifugar el lisado a 12.000 g durante 2 min a 4 ° C

15. Realizar Alícuotas del sobrenadante (200 μ l) en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml y almacenar a -70°C .

SOLUCIONES STOCKS DEL BUFFER DELISIS

1. Solución Stock buffer Tris HCl pH 8.0, 0.5 M

Reactivo	Peso/Volumen
Trisma Base	3.024 gr
Agua destilada / Desionizada	40 ml
Adicional HCl hasta ajustar el pH a 8.0	
Aforar con agua destilada / Desionizada	50 mL

2. Solución Stock PMSF 100 mM

Reactivo	Peso/Volumen
PMSF	17.4 mg
Isopropanol 100%	1 ml

* Almacenar a -20°C

3. Solución Stock leupeptina (10 mg/ml)

Reactivo	Peso/Volumen
leupeptina	10 mg
Agua destilada/ desionizada	1 ml

* Almacenar a -20°C

4. Almacenar el Stock aprotinina (1.5 mg/ml) a 4°C

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS Totales TECNICA WESTERN BLOT

Trascrito por Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana) a partir del protocolo del kit de cuantificación Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad).

1. Preparar 5 diluciones del estándar de proteínas (gama globulina o albúmina sérica bovina).
2. Transferir 800 μ l de cada dilución a un tubo de micro centrifuga
3. Adicionar 200 μ l del colorante BioRad concentrado
5. Incubar a temperatura ambiente durante 50 min
6. Transferir a una cubeta de cuarzo de 1ml
6. Medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm
7. Determinar la concentración proteica de cada solución por triplicado.
8. Determinar la curva patrón
9. Determinar la concentración de las muestras

Resuspensión de la proteína estándar (Gama globulina)

1. Adicionar 20 ml de agua destilada, desionizada estéril.
2. Mezclar hasta homogenizar bien la solución.
3. Alicuotar la solución y almacenar al -20°C

* La solución queda a una concentración final de 1.37 mg/ml

PROCOLO DE ELECTROFORESIS DE PROTÉINAS (SDS PAGE)

Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana), Martha Mesa y Carolina Clavijo. (Universidad Javeriana), Protein blotting a practica approach, Dunbar B. 1996. Moleculat Clorig, Sambrug et al.

Preparar todas las soluciones stock

1. Solución stock de poliacrilamida:

Com puesto	Peso/volum en
Arcrilamida	29 gr.
Bis-acrilamida	1 gr.
Agua destilada / desionizada	100 ml

*Acrilamida y bis-acrilamida son neurotoxicas, se absorben por mucosa y piel, se deben usar guantes, mascara para material particulado y se deben manejar en campana extractora.

- El agua destilada / desionizada (DDI) debe estar tibia para facilitar la disolución de la bisacrilamida.
- Filtrar la solución
- Medir el pH de la solución, debe ser mas bajo de 7.0
- Almacenar en frasco ámbar a 4 °C máximo 45 días

2. Solución Stock de SDS al 10%

Com puesto	Peso/volum en
SDS	5 gr.
Agua destilada / desionizada	Ajustar a 50 ml

*Siempre utilizar el mismo SDS, la misma marca y la misma referencia de catalogo

3. Buffer Tris-HCl pH 8.8 1.5 M

Com puesto	Peso/volum en
Tris-base	9,0825 gr.
Agua destilada / desionizada	40 ml

- Ajustar el pH a 8.8 con HCl
- Completar el volumen de la solución a 50 ml con agua DDI
- Almacenar a 4 °C

4. Buffer Tris-HCl pH 6.8 0.5 M

Com puesto	Peso/volum en
Tris-base	3 gr.
Agua destilada / desionizada	40 ml

- Ajustar el pH a 6.8 con HCl
- Completar el volumen de la solución a 50 ml con agua DDI

- Almacenar a 4 ° C

5. Buffer de corrido pH8.3 5x

Com puesto	Peso/volum en
Tris-base	15 gr.
Glicina	72 gr.
SDS	5 gr.
Agua destilada / desionizada	900 ml

- Ajustar el pH a 8.3 con HCl
- Completar el volumen de la solución a 1000 ml con agua DDI
- Almacenar a 4 ° C

6. Buffer de corrido pH8.3 1X

Com puesto	Peso/volum en
Buffer de corrido pH 8.3 5x	200 ml
Agua destilada / desionizada	800 ml

7. Buffer Laem li (soluciones stocks)

A. 2-mercaptoetanol 1% P/V

Com puesto	Peso/volum en
2-mercaptoetanol	0,1 gr.
Agua destilada / desionizada	10 ml

B. Azul de bromofenol al 1%

Com puesto	Peso/volum en
Azul de bromofenol	0,1 gr.
Agua destilada / desionizada	10 ml

C. Buffer completo Laem li

Com puesto	Peso/volum en
Buffer Tris-HCl pH6.8 0.5 M	1 ml
SDS al 10 %	1.6 ml
2-mercaptoetanol 1%	0.4 ml
Azul de bromofenol al 1%	0.4 ml
Glicerol	0.8 ml
Agua destilada / desionizada	3.8 ml

- Almacenar a 4 ° C

2. Ensamble el sistema para la polimerización del gel

- Todo se debe purgar con agua desionizada
- Sacar el agua de la cámara y poner a escurrir sobre una toalla de papel absorbente

3. Preparar la solución para los dos geles de resolución

Com puesto	10 %	12 %	15 %
Agua destilada / desionizada	4.0 ml	3.3 ml	2.3 ml
Solución acrilamida/bisacrilamida	3.3 ml	4.0 ml	5.0 ml
Buffer Tris-HCl pH8.8 1.5 M	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
SDS al 10 %	0.1 ml	0.1 ml	0.1ml
Persulfato de amonio al 10%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	0.004 ml	0.004 ml	0.004 ml

* **IMPORTANTE:** Adicionar el Persulfato de amonio y el TEMED al mismo tiempo.

4. Mezclar bien con un aspirador y servir entre los vidrios rápidamente, el gel de resolución se sirve tomando en cuenta el tamaño del peine, mas un centímetro.

5. Adicionar 1 ml de agua DDI en la superficie para evitar el contacto con el oxígeno

6. La polimerización dura aproximadamente 30 min.

7. Retirar el agua de la superficie del gel de resolución y lavar varias veces con agua DDI para retirar los restos de acrilamida no polimerizada.

8. Aspirar el agua restante y secar con una toalla absorbente sin tocar el gel

9. Preparar la solución para el gel concentrador

Com puesto	5 %
Agua destilada / desionizada	3.4 ml
Solución acrilamida/bisacrilamida	0.83 ml
Buffer Tris-HCl pH8.8 1.5 M	0.63 ml
SDS al 10 %	0.05 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

10. Servir el gel concentrador directamente en la superficie del gel de resolución polimerizado. Se debe regar un poco la solución, pues siempre quedan excesos de agua.

11. Insertar el peine de teflón en la solución del gel concentrador, sin hacer ninguna burbuja.

* **IMPORTANTE:** El peine debe ser lavado con agua DDI y secado con etanol antes de usar.

12. Adicione más solución del gel concentrador hasta que se llene completamente la cámara y se salga un poco. La polimerización dura aproximadamente 20 min.

13. Preparar las muestras con el Buffer Laemli de acuerdo con la concentración de proteínas en prueba. Calentar las muestras durante 5 minutos a 95 °C.

13. Una vez terminada la polimerización se lleva el soporte del gel a la cámara de electroforesis.

14. Adicionar a la cámara interna baja más o menos 125 ml del buffer de corrido

15. Adicionar más o menos 200 ml de buffer de corrido al mini tanque

16. Retirar cuidadosamente los peines, se pueden usar tiras de papel de filtro para retirar el exceso de poliacrilamida

17. Servir 20 µl de las muestras previamente preparadas en cada pozo, no servir en el primer ni en el último pozo.

18. Cambiar la posición del marcador de peso molecular en cada gel.

19. Tapar la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de poder.

20. Aplicar 120 voltios constantes 90 min aproximadamente.

21. Una vez terminada la electroforesis, apagar la fuente de poder

22. Sacar el gel, nunca manipularlo sin guantes, se debe manipular lo menos posible, así se tengan guantes

23. Preparar la solución de tinción de azul de comassie para visualizar las bandas

Com puesto	Peso/volum en
Azul de Commasie R-250	1.25 gr.
Acido acético glacial	50 ml.
Metanol	225 ml.
Agua destilada / desionizada	225 ml

Filtrar la solución, papel de filtro w atman N 1.

24. Sumergir el gel en la solución de azul de comassie durante 5 h, en agitación constante.

25. Decolorar los geles en la siguiente solución

Com puesto	Peso/volum en
Acido acético glacial	10 ml.
Metanol	45 ml.
Agua destilada / desionizada	45 ml

PROCOLO DE ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

TECNICA WESTERN BLOT

Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana).Martha Mesa y Carolina Clavijo. (Universidad Javeriana), Protein blotting a practica approach, Dunbar B. 1996.Mdecular Clonig, Sambrug et al.

1. Llenar la unidad de enfriamiento con agua (destilada, desionizada), y mantener a -20°C .
2. Preparar el buffer de transferencia Tris-Glicina

Com puesto	Concentración	Peso / Volumen
Trisma base	48 mM	5.8128 gr
Glicina	39 mM	2.9277 gr
SDS	0.025 %	0.25 ml
Agua destilada desionizada	Completar a 1 L	

3. Mantener el buffer a 4°C hasta completar la transferencia
4. Una vez terminada la electroforesis, desarmar el sistema de electroforesis.
5. Separar el gel de los vidrios cuidadosamente
6. Cortar el gel concentrador
7. Equilibrar las espumas, el papel de filtro y los geles en el buffer de transferencia por un tiempo mayor a 5 minutos.
8. Humedecer la membrana de PVDF en metanol durante 15 segundos. (hasta que se vea translucida).
9. Equilibrar la membrana de PVDF en el buffer de transferencia por un tiempo mayor a 5 minutos
10. Ensamblar el modulo de transferencia (espuma, papel de filtro, membrana, gel, papel de filtro, espuma). La membrana debe quedar hacia el lado transparente del modulo.
11. El lado transparente del modulo debe orientarse hacia la parte roja del sistema.
12. Ensamblar el sistema en el tanque de electroforesis y adicionar la unidad de enfriamiento
13. Adicionar un agitador magnético al tanque de electroforesis.
14. Cobcar el tanque sobre una plancha de agitación, a 30 V durante 12 horas en agitación constante.

PROTOCOLO DE DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR QUIMIOLUMINICENCIA TECNICA WESTERN BLOT

Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana). Adaptado de los protocolos realizados por Martha Mesa Universidad Javeriana, Protein blotting a practica approach, Dunbar B. 1996.Molecular Clonig, Sambrook et al.

1. Preparar los siguientes buffers

Buffer Tris HCl pH 8.0 10mM

Com puesto	Peso / volumen
Trisma base	1.2114 gr
Agua DDI	900 ml

*Ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico

Solución TBS-Tween 20 0.2%

Com puesto	Peso / volumen
Cloruro de sodio (1560 mM)	8.7 gr
Buffer Tris-HCl pH8.0 (10 mM)	900 ml
Tw een 20 (0.2%)	2 ml
Agua DDI	Completar a 1 L

Buffer de bloqueo

Com puesto	Peso / volumen
TBS-Tween 20	30ml
Leche Baja en Grasa	1.5 gr

Solución de Rojo Ponceau 0.5%

Com puesto	Peso / volumen
Rojo Ponceau	0.5 gr
Acido Acetico	1 ml
Agua Destilada	98.5 ml

2. Remover la membrana del sistema de transferencia.

3. Teñir las membranas con la solución de Rojo Ponceau durante 5 min. Marcar la ubicación de los carriles y la ubicación de la banda de interés. (Lápiz No. 2)

4. Decolorar las membranas con varios lavados de agua destilada.
5. Rápidamente, introducir la membrana en una bolsa plástica (8 x 10cm), y adicionar 15 ml de buffer de bloqueo, antes de que se seque la membrana.
6. Incubar la membrana en el buffer de bloqueo durante 60 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.
7. Cambiar la membrana a una bolsa nueva, adicionar el anticuerpo primario. Incubar la membrana toda la noche a 4 °C.
8. Realizar dos lavados de 5 minutos cada uno con la solución TBS-Tween 20.
9. Cambiar la membrana a una bolsa nueva, adicionar el anticuerpo secundario. Incubar la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante.
10. Realizar tres lavados de 5 minutos cada uno con la solución TBS-Tween 20.

PROTOCOLO DE REVELADO DE PROTEÍNAS (MANUAL)

TECNICA WESTERN BLOT

Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana). Adaptado de los protocolos realizados por Martha Mesa Universidad Javeriana, Protein blotting a practica approach, Dunbar B. 1996. Molecular Clonig, Sambrook et al.

1. Preparar las siguientes soluciones

Solución de Revelado (D76 Kodak)

Com puesto	Peso / volumen
Solución A	Bolsa
Solución B	Bolsa
Agua DDI	Completar a 3 L

*Preparar la solución en completa oscuridad y almacenarla en frasco ámbar y lugar oscuro, disolver los reactivos en agua a 37°C. Agitar bien antes de usar.

Solución Fijadora (Kodak)

Com puesto	Peso / volumen
Fijador	92.11 gr
Agua DDI	Completar a 500 ml

2. Preparar la solución de trabajo de luminol (1.5 ml de solución A y 1.5 ml de solución B), mantener en la oscuridad.

3. Sacar las membranas de la solución de lavado, ponerlas en una bolsa plástica nueva y adicionarles la solución de trabajo de luminol.

4. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y agitación constante.

5. Sacar las membranas, ponerlas en una bolsa plástica nueva.

6. Exponerlas a la película de rayos X durante 2 minutos.

7. Mbjar las películas en agua corriente durante unos segundos.

8. Introducir las en el tanque de la solución reveladora durante 5 minutos.

9. Lavarlas con agua corriente durante 2 minutos.

10. Introducir las en el tanque de la solución fijadora durante 15 minutos.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS

1. Tomar muestras de 4 ml de sangre de un donante voluntario sano, con el sistema venojet en tubos con EDTA como anticoagulante.
2. Resuspender la sangre cuidadosamente por inversión.
3. Adicionar a 3 ml de Histopaque (Sigma) en tubos de centrifuga de 15 ml.
4. Posteriormente adicionar cuidadosamente (sin romper el gradiente) 5 ml de de sangre.
5. Centrifugar por 20 min a 1900 rpm (centrifuga antigua colocar en la marca de 50).
6. Sacar el anillo formado en la interfase y resuspenderlo en 5 ml de buffer salino fosfato (PBS)
7. Centrifugar por 5 min a 1900 rpm.
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el "pellet" de células en 5 ml de buffer salino fosfato (PBS)
9. Centrifugar por 5 min a 900 rpm
10. Descartar el sobrenadante y resuspender el "pellet" de células en 5 ml de medio RPMI suplementado con las diferentes concentraciones del agente químico en prueba.
11. Mantener las células durante el tiempo de exposición a 95% humedad relativa, 5% CO₂ y 37 ° C
12. Una vez finalizado el tiempo de exposición centrifugar por 5 min a 900 rpm
 8. Descartar el sobrenadante hasta dejar un volumen de 1ml en el tubo Falcon y resuspender las células.
9. Tomar 10µl de la solución anterior y transferir a un tubo de microcentrifuga de 1.5ml con 90 µl de azul de Trypán.
10. Realizar conteo de viabilidad celular (New bauer).

$$\text{Nb. de células/ml} = [(\text{No. células} \times 100) / \text{total cuadrantes contados}] \times 1000$$

EXTRACCION DE ARN TOTAL

Trascrito por Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana) a partir del protocolo de extracción del kit SV Total RNA Isolation System (Promega).

1. Si el protocolo se realiza con células adherentes, se lavan las cajas dos veces con 5ml de buffer salino fosfato (PBS) y se adiciona 1 ml de tripsina al 1%, si las células no son adherentes las células se centrifugan (ver paso 2)
2. Se adicionan 5 ml de medio DMEM (sin suero bobino fetal) y se centrifuga la suspensión celular a 900 rpm por 5 minutos.
3. Descartar el sobrenadante hasta dejar 1 ml y se centrifuga la suspensión celular a 900 rpm por 5 minutos.
4. Resuspender el "pellet" de células en 175 ul del buffer de lisis (SV RNA Lysis Buffer) e incubar las células
5. Adicionar 350 ul de la solución SV RNA Dilution Buffer y homogenizar los lisados celulares por inversión de tres a 4 veces.
6. Llevar las muestras a una temperatura de 70 C ° por tres minutos (bloque seco) e Inmediatamente después centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
7. Transferir el lisado a un tubo de centrifuga de 1.5 ml y adicionar 200 ul de etanol al 95%.
8. Transferir a una columna (kit) y centrifugar las muestras a 13.000 rpm por 1 min.
9. Vaciar los tubos de recolección y adicionar a la columna se 50 ul de mix de extracción (40 ul de yellow core Buffer, 5 ul de $MnCl_2$ 0.09 M y 5 ul de DNasa I).
10. Incubar las muestras por 15 min a 20-25 ° C.
11. Adicionar 200 ul de la solución SV DNasa Stop Solution a la columna y centrifugar a 12.000 rpm durante 1 min.
12. Adicionar 600 ul de la solución SV RNA wash Solution y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
14. Adicionar 250 ul de la solución SV RNA wash Solution y centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min.
15. Una vez finalizado el proceso transferir la columna a un tubo nuevo y adicionar 100 ul de agua libre de nucleasas.
16. Centrifugar las muestras por 1 min a 13.000 rpm, alicuotar y almacenar las muestras a - 80 ° C.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA CICLOOXIGENASA 2 MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Trascrito por Andrea Cortés (Laboratorio de Genética Humana) a partir del protocolo "Quantitect SYBR Green RT-PCR" (Promega)

1. Descongelar las muestras y mantener en hielo
2. Preparar el mix de reacción, teniendo en cuenta la concentración de las muestras. Todas las muestras deben tener la misma cantidad inicial de ARNm total (< 500 ng por reacción)

Reactivos	Volumen de reacción
2x Quantitect SYBR GREEN	10 ul
Primer A	0.5 ul (0.5M)
Primer B	0.5 ul (0.5 M)
QuantiTect RT mix	0.5 ul
Agua libre de DNAsas	Variable
Templado de RNA	6 – 7 ul (vol variable según concentración de la muestra).

3. Amplificar las muestras según las condiciones de amplificación.

Condiciones de amplificación para la Cicloxigenasa 1 y 2

Proceso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de la RT-polimerasa	50 ° C	30 min.	1
Temperatura inicial de denaturación	95 ° C	15 min	1
Denaturación	94 ° C	15 seg.	35 ciclos
Alineamiento	55 - 60 ° C	30 seg.	
Extensión	72 ° C	30 seg.	
Lectura de fluorescencia desde el tercer ciclo			
Determinación de las curvas de	50-95 ° C	Incremento de temperatura	35 ciclos

melting		cada 0.2 ° C	
Extensión final	72 ° C	10 min	1
	10 ° C	Por tiempo indefinido	

*Estas temperaturas fueron seleccionadas para amplificar fragmentos del ARNm de la Ciclooxygenasa 1 y 2.

*Secuencia de los "primers" Ciclooxygenasa 1:

5' TGCCAGCTCCTGGCCGCGCTT-3'

5' GTGCA TCAACACAGGCGOCTCTTC-3'

*Secuencia de los "primers" Ciclooxygenasa 2:

5' TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'

5' AGATCATCTCTGCCTGAGTA TCTT-3'