

ARTICULO ORIGINAL

Ensayo del cometa como bioindicador de inestabilidad genómica en pacientes diabéticos hemodializados

Comet assay as a bioindicator of genomic instability in hemodialysis diabetic patients

Franco de Diana, Deidamia¹; Segovia Abreu, Jaime¹; Cabrera, Walter²; Castiglioni, Diana¹; López Acosta, Nery¹; Urdapilleta, Natalia¹; Schupp, Miriam¹; Dure, Juan¹; Santa-Cruz, Francisco²

¹Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, Facultad de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Genética Toxicológica. Asunción, Paraguay.

²Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, Facultad de Ciencias de la Salud, Cátedra de Fisiopatología. Asunción, Paraguay.

Como referenciar éste artículo | How to reference this article:

Franco de Diana D, Segovia J, Cabrera W, Castiglioni D, López Acosta N, Urdapilleta N. Ensayo del cometa como bioindicador de inestabilidad genómica en pacientes diabéticos hemodializados. *An. Fac. Cienc. Méd. (Asunción)*, 2022; 55(1): 27-38

RESUMEN

Introducción: Procesos como la mutagénesis, la carcinogénesis y la teratogénesis son producto de la interacción de agentes de origen endógeno como exógeno que interactúan con la molécula de ADN en forma crónica produciendo rupturas en la doble hélice, y en cromosomas completos resultando en la inestabilidad genómica. El estrés oxidativo al que se encuentran sometidas las células al formarse las especies reactivas de oxígeno (ROS) y también las especies reactivas de nitrógeno (RNS), que pueden provenir de radicales producidos a consecuencia de la diabetes o en estados iniciales de la enfermedad renal crónica o como respuesta a procesos inflamatorios en estados avanzados de estas patologías, actúan como agentes genotóxicos endógenos. **Objetivos:** Esta investigación tuvo como objetivo determinar el daño basal en la molécula de ADN de pacientes diabéticos hemodializados, a través del ensayo del Cometa, como un bioindicador de inestabilidad genómica., durante seis meses de tratamiento. **Materiales y métodos:** Se planteó un estudio longitudinal prospectivo de cohorte para comparar los diferentes niveles de daño antes y durante los primeros seis del tratamiento de hemodiálisis. Se evaluó con el test del cometa o electroforesis de células individuales, el daño basal en muestras de sangre venosa de pacientes diagnosticados con Diabetes de tipo II como control negativo y en pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica antes de iniciar el tratamiento de diálisis y luego durante el tratamiento. Se utilizó el test de t- Student para muestras independientes y emparejadas. **Resultados:** Se observó un aumento significativo de daño basal y oxidativo en el material genético de pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica, comparados con los controles negativos ($p < 0.005$) y se observó, además, que el daño celular aumenta con el tratamiento de hemodiálisis ($p < 0.005$).

Autor correspondiente: Lic. Deidamia Franco de Diana. Laboratorio de Genética Toxicológica Facultad de Ciencias de la Salud – Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción. Asunción, Paraguay. E-mail: deidamia_franco@uc.edu.py

Fecha de recepción el 21 de Noviembre del 2021; aceptado el 15 de Marzo del 2022.

Conclusión: Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que el estrés oxidativo tiene un efecto genotóxico y que el nivel de daño genético es un buen bioindicador del avance de la enfermedad renal crónica y que la hemodiálisis induce a un aumento de daño a nivel del material genético, aumentando el riesgo de carcinogénesis.

Palabras Clave: Ensayo del cometa, Hemodiálisis, Inestabilidad genómica, Daño oxidativo del ADN.

ABSTRACT

Introduction: Processes such as mutagenesis, carcinogenesis and teratogenesis are the product of the interaction of agents of endogenous and exogenous origin that interact with the DNA molecule in a chronic way producing ruptures in the double helix, and in complete chromosomes resulting in genomic instability. The oxidative stress to which the cells are subjected when reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) are formed, which may come from radicals produced as a result of diabetes or in initial stages of chronic kidney disease or in response to inflammatory processes in advanced stages of these pathologies, act as endogenous genotoxic agents. **Objectives:** This research aimed to determine the basal damage in the DNA molecule of hemodialyzed diabetic patients, through the Comet assay, as a bioindicator of genomic instability, during six months of treatment. **Materials and methods:** For this research, a prospective longitudinal cohort study was proposed to compare the different levels of genetic damage before and during the first six of hemodialysis treatment. Baseline damage was evaluated with the comet test or single cell electrophoresis, in venous blood samples from patients diagnosed with Type II Diabetes as a negative control and in diabetic patients with chronic kidney disease before starting dialysis treatment and then during treatment. **Results:** A significant increase in basal and oxidative damage was observed in the genetic material of diabetic patients with chronic kidney disease, compared to negative controls ($p < 0.005$) and it was also observed that cell damage increases with hemodialysis treatment ($p < 0.005$). The t-Student test was used for independent and paired samples. **Conclusion:** The results obtained in this research allow us to conclude that oxidative stress has a genotoxic effect and that the level of genetic damage is a good bioindicator of the progression of chronic kidney disease and that hemodialysis induces an increase in damage at the level of the genetic material, increasing the risk of carcinogenesis.

Keywords: Comet assay, Hemodialysis, Genomic instability, Oxidative DNA damage.

INTRODUCCION

La prevalencia de la diabetes, especialmente la de Tipo 2 ha aumentado en los últimos años en el mundo, la nefropatía diabética ocurre en más del 40 % de los pacientes diabéticos y es una de las causas principales de la enfermedad renal crónica avanzada. Varios factores afectan el desarrollo de la nefropatía diabética, la hiperglucemia incrementa la producción de radicales libres, los cuales tienen un importante papel en el desarrollo de la enfermedad renal crónica (1).

La interacción entre tóxicos tanto endógenos como exógenos y el ADN se traduce en procesos como la mutagénesis, la carcinogénesis y la teratogénesis entre otros. Estos agentes interactúan con la molécula de ADN produciendo efectos genotóxicos, evidenciados como rupturas en la doble hélice, de una o doble cadena y de cromosomas completos, originando fragmentos denominados micronúcleos, que determinan la inestabilidad cromosómica (2).

Pacientes con patologías renales, en diferentes etapas de la enfermedad y en particular los

que se encuentran en tratamiento de diálisis o trasplantados muestran un incremento en la incidencia de cáncer, especialmente renal (3,4). Ya en el año 1988 Cezing et al (5) han reportado un aumento en la frecuencia de cromátidas hermanas en linfocitos de pacientes urémicos. Estudios posteriores realizados en pacientes renales crónicos, mostraron aumento de aberraciones cromosómicas, aneugénicas y clastogénicas así como una disminución en la capacidad de reparación del ADN, tanto en pacientes dializados como en no dializados (6-8).

El daño al material genético puede estar causado por el estrés oxidativo al que se encuentran sometidas las células al formarse las especies reactivas de oxígeno (ROS) y también las especies reactivas de nitrógeno (RNS), producto de procesos fisiológicos donde los mecanismos de protección contra los ROS están desequilibrados con respecto a la producción de estos. Tanto los ROS como los RNS pueden provenir de radicales producidos en estados iniciales de la enfermedad renal o como respuesta a procesos inflamatorios en estados avanzados de la misma enfermedad (9).

Las células inflamatorias generan enzimas oxidativas que producen grandes cantidades de ROS y RNS. El estrés oxidativo daña lípidos, proteínas y DNA siendo el de mayor capacidad de daño el radical hidroxilo cuyo target principal es el ADN. Los daños que inducen los ROS en el ADN pueden resultar en la ruptura de la doble hélice o en la cadena simple, modificaciones de bases, modificaciones de desoxirribosas, mutaciones y fallas en la reparación del ADN (10,11).

Uno de los ensayos útiles para la detección de daño a la molécula de ADN tanto de cadena simple como de doble cadena es la electroforesis en gel de células individuales o ensayo del cometa, que permite evaluar los niveles de daño en poblaciones celulares sin necesidad de estudios de proliferación, convirtiéndose en una herramienta altamente sensible para evidenciar daño genotóxico

inducido por diferentes agentes en el sitio de acción de estos (12,13). Este bioensayo consiste en movilizar las células en estudio en una capa delgada de agarosa colocada en un portaobjetos, para luego provocar la lisis de las membranas, y eliminar las Histonas dejando al ADN en un estado de superenrollamiento conectado a la matriz del núcleo. El proceso de electroforesis produce el desenrollamiento y desplaza los fragmentos de ADN hacia el ánodo, formando una figura que se asemeja a la cola de un cometa. El contenido relativo de ADN en la cola indica la frecuencia de roturas de la molécula y en consecuencia el nivel de daño. El ensayo del cometa puede además medir el daño oxidativo en las bases del DNA, haciendo una variación del protocolo, luego del paso de la lisis de las membranas celulares, se realiza un tratamiento con la enzima ENDO III, que reconoce pirimidinas oxidadas y las corta dejando sitios Apurínicos o AP que se evalúan en la cola del cometa (12,14).

La hemodiálisis (HD) puede disminuir el daño genético en linfocitos al reducir las toxinas urémicas que producen el estrés oxidativo, sin embargo, el proceso de hemodiálisis por sí mismo produce especies reactivas de oxígeno, por lo que investigadores durante los últimos años han buscado otros métodos alternativos que disminuyan el estrés oxidativo y el potencial riesgo de aumentar el daño genético en las células de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) (15,16). Esta investigación tuvo como objetivo determinar el daño basal en la molécula de ADN de pacientes diabéticos hemodializados, a través del ensayo del Cometa, como un bioindicador de inestabilidad genómica, durante seis meses de tratamiento.

MATERIALES Y METODOS

Sujetos del estudio

Participaron de la investigación pacientes de ambos sexos, diabéticos y con enfermedad renal crónica avanzada, estado V (clasificación según grupo Kidney Disease Outcome Quality Initiative, 2012) (17) que iniciaban el tratamiento

de hemodiálisis en el centro privado de hemodiálisis de NEFRO SERV y pacientes de ambos sexos diagnosticados con diabetes de tipo 2, sin enfermedad renal crónica, reclutados de consultorios privados y del Departamento de diabetología del IPS de la ciudad de San Pedro Ycua Mandyju.

Tratamiento de hemodiálisis

Para las sesiones de hemodiálisis se ha utilizado un filtro o dializador de polisulfona. Cada una de las sesiones de hemodiálisis de 4 horas aproximadamente, requirieron más de 100 litros de agua. El agua utilizada debió ser purificada, pasando por 3 pre-filtros, de arena (para partículas grandes), de carbón activado (para eliminar el cloro) y el ablandador (para extraer el excedente de calcio). El agua pre-tratada se llevó a un filtro de ósmosis inversa para la extracción de todos los elementos pequeños (aluminio, estroncio, etc), y obtener agua pura. El agua pura luego se mezcló con un líquido especial que contenía los elementos complementarios (sodio, potasio, magnesio, bicarbonato, citrato), y finalmente este líquido se cotejó con la sangre del paciente para el proceso de diálisis.

Las sesiones de HD se realizaron a través de catéter central para hemodiálisis o por fístulas arterio-venosas.

Los pacientes fueron medicados y recibieron anti-hipertensivos, carbonato de calcio, eritropoyetina humana y hierro parenteral. Las sesiones de hemodiálisis se llevaron a cabo en número de 3 a la semana, de 4 horas cada una durante un promedio de 6 meses.

Instrumentos de recolección de datos y variables.

Métodos para la recolección de datos y muestra:

Un cuestionario fue aplicado a los participantes para considerar factores de confusión como hábitos de fumar, consumo de alcohol, consumo de medicamentos, drogas o si estuvieron sometidos a algún tipo de tratamiento médico o expuestos a rayos X.

Para la recolección de la muestra se tomaron 2 ml de sangre venosa de los pacientes diabéticos de tipo 2 con enfermedad renal crónica estadio V, antes de iniciar el tratamiento de hemodiálisis y a los 6 meses de tratamiento o luego de 72 sesiones de hemodiálisis en promedio, así mismo, se tomaron 2 ml de sangre venosa de los pacientes diabéticos sin enfermedad renal crónica, como parámetro de control negativo. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción. Se aplicó una encuesta a los pacientes que aceptaron participar de la investigación firmando el consentimiento informado, la aplicación de la misma fue con el fin de considerar datos de confusión como hábitos alimenticios y de fumar, consumo de alcohol y tratamientos con algunos fármacos.

Variables utilizadas en el estudio

1. Tiempo de tratamiento en hemodiálisis. Al inicio, y a los 6 meses
2. Daño en el ADN medido mediante el ensayo del Cometa y el software Comet Imager de MetaSystem- Germany

Tail DNA (T DNA): porcentaje de ADN en la cola del cometa

Tail moment (TM): longitud de la cola del cometa medida en μm

Tail Moment: dispersión de los fragmentos de ADN en la cola del cometa medido en μm

Test de cometa y medición el daño en el ADN

La técnica del ensayo del cometa se realizó según Singh et al (18) y las consideraciones de optimización de Collins. (12,19) Para lo cual se obtuvieron 2 ml de sangre venosa de cada uno de los participantes. Las muestras fueron suspendidas en 0,5 % de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) y pipeteadas en portaobjetos previamente cubiertos con una capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) al 1%. Seguidamente las muestras

fueron enfriadas a 4° C por 20 minutos y luego sumergidas en buffer de lisis (2,5M de NaCl, 100 µm Na₂ EDTA, 10 µm Tris-HCl pH 10,1, Triton X-100 y 10 % DMSO) por 1 hora a 4 °C en obscuridad, a los efectos de provocar la lisis y la descompactación del ADN. Posteriormente los portaobjetos se colocaron en buffer alcalino (1 mM Na₂EDTA, 300mM buffer NaOH) con pH >13 por 20 minutos para facilitar el desenrollamiento del ADN.

Cada uno de los portaobjetos se sometieron a electroforesis por 20 minutos a 25 V y 300 mA, en el mismo buffer, y posteriormente se lavaron los portaobjetos con buffer 0,4% Tris-HCl (pH 7,5), para eliminar el exceso de álcali y remover los detergentes. La fijación de las muestras se realizó en metanol al 80%. Finalmente, las láminas se tiñeron con bromuro de etidio (10µg/ml). Se examinaron las láminas bajo microscopio de Epifluorescencia (ZEISS AXIOS A1) con un aumento de 200X, utilizando un filtro de 590 nm.

Mediante el software Comet Imager de MetaSystem - Germany, del laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción, que

permite determinar el porcentaje de ADN en las colas de los cometas, indicando de esta forma, el nivel de daño en el ADN, se evaluaron 200 cometas por paciente y se midieron tres parámetros para determinar el daño en las células; Tail Moment o TM o longitud de la cola del cometa, el % Tail DNA o % DNA en la cola y ; Olive Tail Moment u OTM que proporciona datos sobre la dispersión de los segmentos de ADN en la cola, Para el análisis estadístico se tuvo en cuenta el % de ADN en la cola de los cometas, ya que es el parámetro que muestra con mayor exactitud el nivel de daño (13,20). Las mediciones de dichos parámetros se realizaron mediante el software Comet Imager de MetaSystem- Germany del laboratorio de Genética Toxicológica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción.

Se compararon los valores medios obtenidos del porcentaje de ADN en las colas de los cometas de pacientes diabéticos sin enfermedad renal con los pacientes diabéticos con ERC hemodializados y pre hemodializados.

Detección de daño oxidativo

El ensayo del cometa puede además medir el daño oxidativo en las bases del DNA, haciendo una variación del protocolo, luego del paso de la lisis de las membranas celulares se realiza un tratamiento con la enzima ECO III, que reconoce pirimidinas oxidadas y las corta dejando sitios Apurínicos o AP que se evalúan en la cola del cometa.

Las preparaciones se lavaron dos veces con el tampón de las enzimas (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA) a pH 8 durante 5 minutos cada vez. Una vez lavados, los portaobjetos se trataron con 50 µl de la enzima, a una concentración de 5 µl en 500 µl del tampón, utilizando una solución, madre a una concentración de 1/3000, se cubrieron con cubreobjetos de tamaño 22x22 mm. Posteriormente se incubaron en estufa durante 30 minutos a 37 0C en una cámara húmeda.

En el diseño experimental por cada corrida de electroforesis han sido incluidos como un mecanismo de control de calidad de las corridas láminas de control positivo utilizando al peróxido de hidrógeno como agente genotóxico así mismo laminas con muestras de sangre de individuos sanos sin patologías de base para ser utilizados como control negativo en las respectivas corridas.

Los valores de porcentaje de ADN en la cola de los cometas son los indicadores de la medida del daño. La diferencia entre los valores obtenidos para él % de ADN con las enzimas y los valores del daño basal obtenido en cada grupo de pacientes determina el daño oxidativo para cada uno de ellos.

Análisis de datos

Para el análisis de los resultados obtenidos en el ensayo del cometa se utilizó el paquete

estadístico SPSS.23, después de comprobar la distribución normal (prueba Shapiro-Wilk), que mostró normalidad en la mayoría de las variables, se utilizaron pruebas paramétricas. Las comparaciones entre los grupos se hicieron con la t-student para muestras independientes y las comparaciones entre las evaluaciones del daño del mismo grupo con t-student para muestras relacionadas. Se consideró estadísticamente significativa una $P < 0,05$ y el intervalo de confianza de 95 %.

Cuestiones éticas

La participación de los pacientes fue de carácter voluntario, quienes firmaron un consentimiento informado, en el cual se les informó de los objetivos de la investigación, y cómo se utilizarían las muestras de sangre, fueron beneficiados con la comunicación de

los resultados de los análisis de la calidad de su material genético y todos los pacientes que iniciaron el tratamiento de hemodiálisis tuvieron la misma oportunidad de participar de la investigación. Así mismo las historias clínicas de los mismos se mantuvieron dentro del principio de confidencialidad y se encuentran archivadas en el centro de diálisis NEFRO SERV y en el Departamento de diabetología del IPS de la ciudad de San Pedro Ycua Mandyju.

El protocolo de investigación contó con la aprobación del comité de Ética de la investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción.

Los autores declaran que no existen conflictos de interés comercial.

RESULTADOS

Características demográficas de la población

Participaron de la investigación 40 pacientes diabéticos tipo 2 sin enfermedad renal crónica, de los cuales 25 (62,5%) eran de sexo femenino, la edad promedio de la población fue

de 62 años, participaron además 40 pacientes diabéticos con ERC avanzada tipo V, que iniciaban el tratamiento de HD, de los cuales 31 eran de sexo masculino (77,5%), la edad promedio de ésta población fue de 65 años, como puede apreciarse en la Tabla 1.

población	sexo		edad media \pm
	M	F	
control	15 (37,5%)	25 (62,5 %)	62.6 \pm 6.1
pacientes con ERC	31 (77,5%)	9 (22.5 %)	65.3 \pm 3.9

Tabla 1. Características demográficas de la población.

Inestabilidad Genómica en pacientes con Enfermedad renal crónica avanzada

Los cometas observados en las células de los pacientes participantes de la investigación,

se pueden apreciar en las Figuras 1 y 2, donde claramente se visualiza diferencias en la longitud de la cola de los cometas de los participantes.

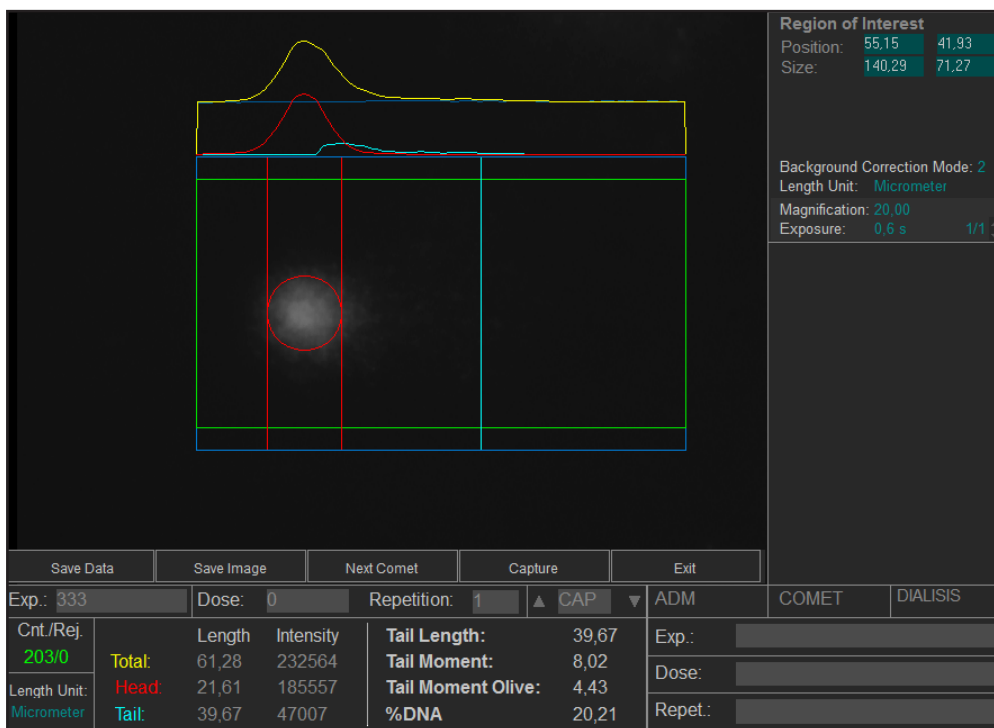


Figura 1. Imagen de cometa de paciente diabético sin ERC.

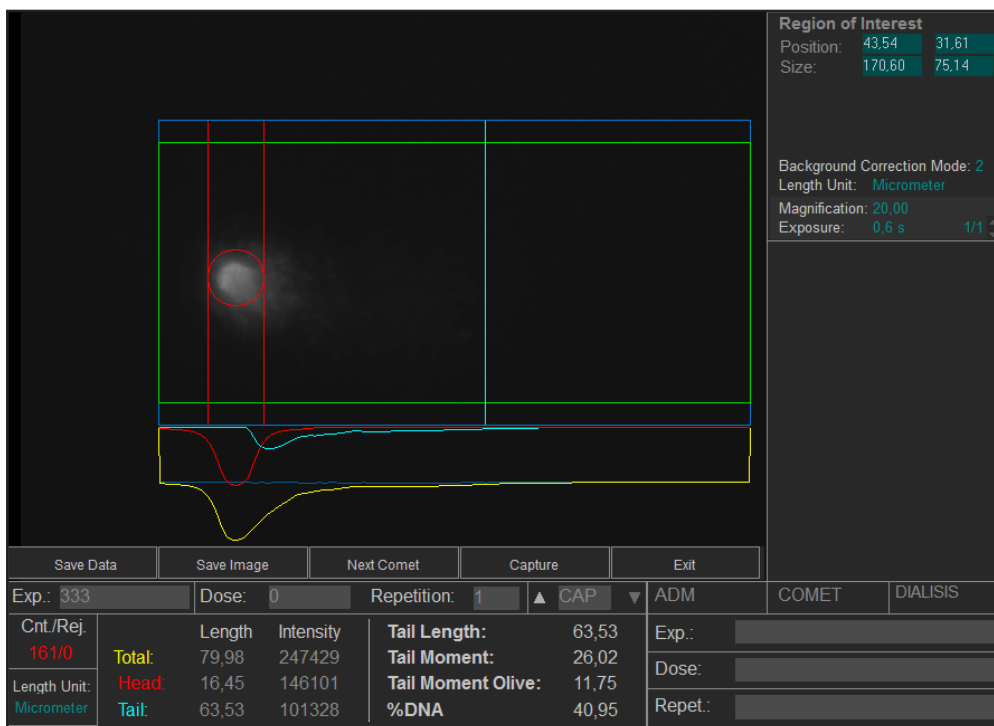


Figura 2. Imagen de cometa de paciente diabético con ERC y daño genético.

Según se puede apreciar en la **figura 3** y en la **tabla 2** los pacientes con enfermedad renal crónica avanzada estado V pre diálisis (NT), presentan alto porcentaje de ADN en las colas de los cometas, lo que se traduce en un daño considerable en la molécula del ADN, que

aumenta con la diálisis (HD). Por otro lado, los pacientes diabéticos que no tienen patología renal (control) presentan mucho menor porcentaje de ADN en las colas de los cometas analizados.

	n	Daño basal	P valor (Sig. Bilateral)
Grupo control	40	25,38 ± 10,27	< 0.000
ERC/NT	40	39,88 ± 12,12	
ERC/HD	40	59,72 ± 17,33	

* ERC/NT + ERC/HD (pacientes con enfermedad crónica pre-diálisis (NT) y pacientes hemodializados HD); los valores se presentan como media ± EE; t- Student para muestras independientes y emparejadas. Se considera estadísticamente significativa a $p < 0.05$

Tabla 2. Comparación de niveles de daño basal entre el grupo control y los pacientes.

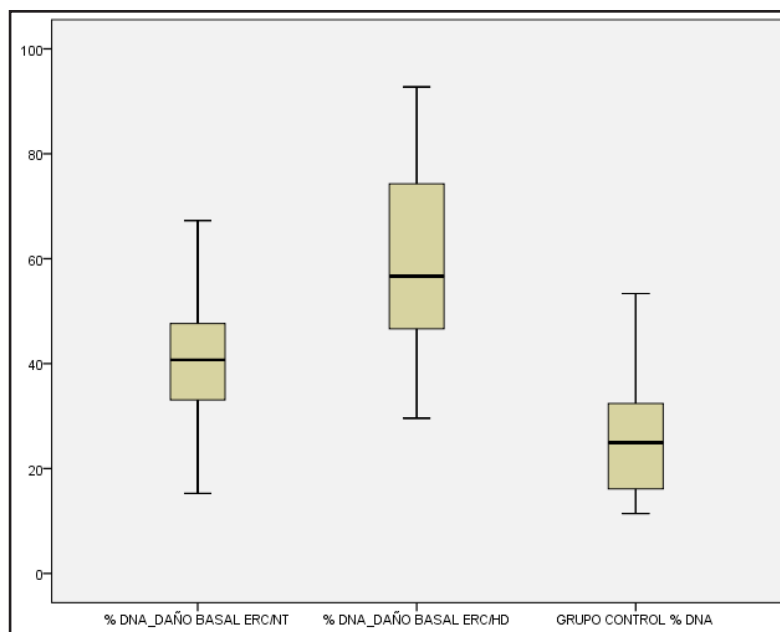


Figura 3. Medidas de tendencia central y de variabilidad del daño basal en el DNA en el grupo control y en los pacientes con ERC/HD y pacientes con ERC/NT

Daño oxidativo en el ADN

Al tratar las muestras de sangre con la enzima endonucleasa Eco III se observa mayor porcentaje de ADN en las colas de los cometas en los pacientes diabéticos con ERC hemodializados comparados con los parámetros observados en las mediciones realizadas previas al tratamiento de hemodiálisis y en pacientes diabéticos sin patología renal, según puede observarse en la **figura 4**.

El daño oxidativo calculado como la diferencia entre los valores obtenidos con la enzima y el daño basal en cada grupo, es mayor en los pacientes hemodializados, $p < 0,013$ (ERC/HD + CONTROL), $p < 0,034$ (ERC/NT+ERC/HD) sin embargo, no existen diferencias significativas entre los valores para pacientes diabéticos sin patología renal y pacientes con ERC no hemodializados, $p > 0,103$ (ERC/NT+CONTROL), según los datos representados en la **tabla 3**.

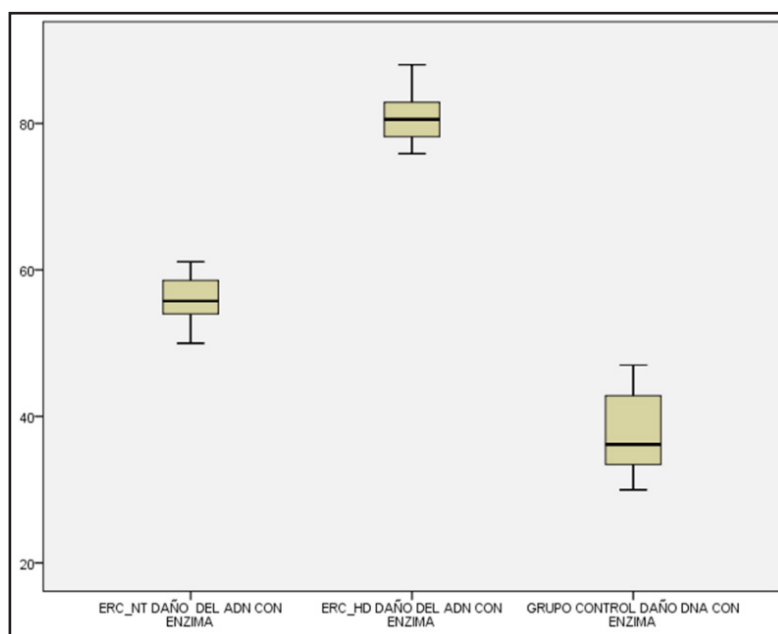


Figura 4. Medidas de tendencia central y de variabilidad del daño oxidativo basal en el DNA en el grupo control y en los pacientes con ERC/HD y pacientes con ERC/NT.

	n	Daño Oxidativo media ± EE	P valor ($\alpha=0,05$) (Sig. Bilateral)
Grupo control	40	12,41 ± 11,79	p < 0,013 (ERC/HD + CONTROL) Sig.
ERC/NT	40	16,06 ± 12,91	p < 0,034 (ERC/NT+ERC/HD) Sig.
ERC/HD	40	21,41 ± 17,62	p > 0,103 (ERC/NT+CONTROL) No Sig.

*Los resultados de la tabla se presentan como media ± su error estándar y se considera estadísticamente significativa p inferior a 0,05.

Tabla 3. Distribución del Nivel de Daño Oxidativo según grupo control y pre-diálisis (NT) y luego de la diálisis (HD).

DISCUSION

El estrés oxidativo es importante en el desarrollo y progresión de la nefropatía diabética en la cual están involucradas varias vías y moléculas. Por lo que existen numerosos biomarcadores para detectar el nivel de estrés oxidativo y a qué nivel molecular está induciendo este daño (4).

Nuestra investigación consistió en comparar los niveles de daño en el material genético de pacientes diabéticos de tipo 2 con pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica avanzada clase V, pre dializados y hemodializados durante un promedio de seis meses de tratamiento, medidos mediante el bioensayo del Cometa, que es un excelente

bioindicador de genotoxicidad (12,21). Hemos encontrado una diferencia significativa en el porcentaje de las colas de los cometas evaluados en de los pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica antes del tratamiento de la diálisis, comparado con los pacientes sin patología renal, (p < 0.005), lo que se interpreta como mayor daño en el material genético. Esto es consistente con otras investigaciones que reportan mayor daño genético en pacientes con ERC, evidenciado por un aumento de micronúcleos y anomalías nucleares en linfocitos de estos pacientes, como indicadores de inestabilidad cromosómica (6) y un aumento

de % de ADN en la cola de cometas de células de pacientes con ERC avanzada (8). Se observó además que el porcentaje de ADN en la cola de los cometas de las células de los pacientes aumentaba significativamente luego de seis meses en promedio de tratamiento de hemodiálisis (72 sesiones aproximadamente), interpretándose este hecho como un aumento de daño en el material genético, estos hallazgos también coinciden con los obtenidos por otros autores que encontraron que el daño aumentaba en los pacientes hemodializados, utilizando biomarcadores como el test de MN y el bioensayo el cometa (4,6,8,22), sin embargo, contradicen a los resultados de otras investigaciones que no encontraron diferencias significativas entre los paciente pre dializados y los hemodializados y que el daño no aumentaba con el tiempo de la hemodiálisis (23).

Otro de los objetivos propuestos en esta investigación fue el de medir el daño oxidativo del ADN mediante una modificación de la técnica del cometa, utilizando enzimas como la ECO III, que permite identificar pirimidinas oxidadas en las colas de los cometas, dado la existencia de evidencias clínicas y científicas, de que el estrés oxidativo y los radicales libres van en aumento en la enfermedad renal y de que este aumento es aún mayor en los pacientes en tratamiento de hemodiálisis (1).

En nuestro estudio hemos encontrado que el daño oxidativo en pacientes en tratamiento de hemodiálisis es significativamente mayor que antes de iniciar el tratamiento y mayor al encontrado en los pacientes diabéticos sin ERC, sin embargo, no encontramos diferencias significativas de daño oxidativo entre los pacientes con ERC prediálisis y los pacientes diabéticos sin ERC. Estos resultados coinciden con los resultados de Corredor et al (24), quienes demostraron que los pacientes pre dializados tienen daño oxidativo significativamente menor que los hemodializados, sin embargo contradice los resultados de otras investigaciones (23) en las que hallaron mayor daño en pacientes pre dializados, estos resultados contradictorios podrían estar relacionados a

diferentes procedimientos del tratamiento de la hemodiálisis como el uso de diferentes tipos de membranas y a las características individuales de cada paciente, como estilo de vida y alimentación diferentes entre poblaciones de los distintos países y a los tratamientos antioxidantes que suelen ser administrados a dichos pacientes. Además, a diferencia de otras investigaciones que investigaron el daño genómico en pacientes con enfermedad renal crónica de diferentes orígenes, ésta se centró en pacientes diabéticos de tipo 2, con un daño genético basal debido al estrés oxidativo al que están sometidas las células por la propia patología (25).

Por otro lado, el deterioro de la enfermedad podría aumentar los niveles de estrés oxidativo ya que durante la HD se puede alcanzar un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la pérdida de los eliminadores de éstos. La hemodiálisis si bien es un procedimiento de depuración, a la par que se pierden toxinas urémicas también se pierden sustancias antioxidantes particularmente las vitaminas, como la vitamina C (26).

Los resultados obtenidos en esta investigación, permiten concluir que el estrés oxidativo tiene un efecto genotóxico y que el nivel de daño genético es un buen bioindicador del avance de la enfermedad renal crónica y que la hemodiálisis induce a un aumento de daño a nivel del material genético, aumentando el riesgo de carcinogénesis, por lo que sería recomendable tratamientos antioxidantes que contrarrestan la producción del estrés oxidativo, ya que muchas investigaciones han asociado los estados avanzados de la enfermedad renal crónica con la aparición de diferentes tipos de cáncer (26,27).

Fuente de financiamiento

Esta investigación es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT con recursos del FEEI

Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses en esta investigación

El CONACYT es un ente financiador de los proyectos de investigación.

Las opiniones y conclusiones del resultado final de los proyectos son de exclusiva responsabilidad de los autores y las instituciones beneficiarias.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vodošek Hojs N, Bevc S, Ekart R, Hojs R. Oxidative Stress Markers in Chronic Kidney Disease with Emphasis on Diabetic Nephropathy. *Antioxid Basel Switz.* 2020 Sep 27;9(10):E925.
2. Ribeiro, L, Salvadori, D, Marques, E. *MUTAGENESIS AMBIENTAL.* 1a ed. São Paulo: ULBRA; 2003. 355 p.
3. Liang X, Feswick A, Simmons D, Martyniuk CJ. Reprint of: Environmental toxicology and omics: A question of sex. *J Proteomics* [Internet]. 2018 Apr 10; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391918301131>
4. Schupp N, Stopper H, Heidland A. DNA Damage in Chronic Kidney Disease: Evaluation of Clinical Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–10.
5. Cengiz K, Block AW, Hossfeld DK, Anthone R, Anthone S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988 Nov 1;36(1):55–67.
6. Sandoval SB, Pastor S, Stoyanova E, Rodríguez Ribera L, García Quispes WA, Coll E, et al. Genomic instability in chronic renal failure patients [Internet]. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 2012 [cited 2019 Aug 4]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/em.21694>
7. Khan Z, Pandey M, Samartha RM. Role of cytogenetic biomarkers in management of chronic kidney disease patients: A review. *Int J Health Sci.* 2016 Oct;10(4):576–89.
8. Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J Jrg, Bahner U. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001 Aug 1;38(2):296–301.
9. Tucker PS, Scanlan AT, Dalbo VJ. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:806358–806358.
10. Son J, Pang B, McFaline JL, Taghizadeh K, Dedon PC. Surveying the damage: the challenges of developing nucleic acid biomarkers of inflammation. *Mol Biosyst.* 2008 Sep;4(9):902–8.
11. Lonkar P, Dedon PC. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *Int J Cancer.* 2011 May 1;128(9):1999–2009.
12. Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Feb;1840(2):794–800.
13. Collins A, Koppen G, Valdiguiesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, et al. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat Res Mutat Res.* 2014 Jan;759:27–39.
14. Sung C-C, Hsu Y-C, Chen C-C, Lin Y-F, Wu C-C. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:301982.
15. Rodríguez-Ribera L, Corredor Z, Sandoval SB, Coll E, Silva I, Diaz JM, et al. Radiosensitivity in patients suffering from chronic kidney disease. *Int J Radiat Biol.* 2015 Feb;91(2):172–8.
16. Comet Assay - Modified for Detection of Oxidized Bases Using the Repair Endonucleases Fpg, hOGG1 and Endonuclease III (Nth) | NEB [Internet]. [cited 2018 May 25]. Available from: <https://www.neb.com/protocols/0001/01/01/comet-assay-modified-for-detection-of-oxidized-bases-using-the-repair-endonucleases-fpg-hoggi-and-endonuclease-iii-nth>
17. Jojoa JA, Bravo C, Vallejo C. Clasificación práctica de la enfermedad renal crónica 2016: una propuesta. *Repert Med Cir.* 2016 Jul 1;25(3):192–6.
18. Singh NP. The comet assay: Reflections on its development, evolution and applications. *Mutat Res Mutat Res.* 2016 Jan;767:23–30.
19. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249–61.
20. Bright J, Aylott M, Bate S, Geys H, Jarvis P, Saul J, et al. Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay. *Pharm Stat.* 2011 Nov 1;10(6):485–93.
21. Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J Jrg, Bahner U. Original Investigations: Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001 Aug 1;38:296–301.
22. Stopper H, Meysen T, Böckenförde A, Bahner U, Heidland A, Vamvakas S. Increased genomic damage

- in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found.* 1999 Sep;34(3):433–7.
23. Ersson C, Odar-Cederlöf I, Fehrman-Ekholm I, Möller L. The effects of hemodialysis treatment on the level of DNA strand breaks and oxidative DNA lesions measured by the comet assay. *Hemodial Int Int Symp Home Hemodial.* 2013 Jul;17(3):366–73.
 24. Corredor Z, Stoyanova E, Rodríguez-Ribera L, Coll E, Silva I, Díaz JM, et al. Genomic damage as a biomarker of chronic kidney disease status. *Environ Mol Mutagen.* 2015 Apr 1;56(3):301–12.
 25. Rogulj D, El Aklouk I, Konjevoda P, Ljubić S, Pibernik Okanović M, Barbir A, et al. Age-dependent systemic DNA damage in early Type 2 Diabetes mellitus. *Acta Biochim Pol.* 2017;64(2):233–8.
 26. Hegbrant J, Bengtsson UH. Vitamin C and E as Antioxidants in Hemodialysis Patients. *Int J Artif Organs.* 1999 Feb 1;22(2):69–73.
 27. Fenech MF. Nutriomes and nutrient arrays - the key to personalised nutrition for DNA damage prevention and cancer growth control. *Genome Integr.* 2010 Aug 12;1(1):11.