

DAÑO EN EL ADN DE LINFOCITOS HUMANOS POR EFECTO DE CLOROQUINA

Leticia Amésquita^{1,a}, María Nimia Cruz-Briceño^{1,a}, Zulita Prieto^{1,b}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de cloroquina (CQ) en linfocitos humanos a través del ensayo cometa. Los linfocitos fueron aislados de muestras de sangre periférica obtenidas de tres donantes sanos, no fumadores de 24 a 30 años. Los linfocitos aislados fueron expuestos durante una hora a diversos tratamientos: peróxido de hidrógeno 2,5 % (control positivo), buffer fosfato salino 1X (control negativo) y cloroquina a concentraciones de 0 µg/ml, 0,25 µg/ml; 5 µg/ml y 300 µg/ml. Se registró los promedios del porcentaje de ADN en la cola del cometa, momento de la cola y momento de la cola de Olive, encontrándose diferencias significativas entre las diversas concentraciones de CQ ($p < 0,01$). Asimismo, la magnitud de daño del ADN se incrementó en función de la concentración de CQ. Se demostró el efecto genotóxico de CQ en linfocitos humanos expuestos *in vitro*.

Palabras clave: Ensayo Cometa; Genotoxicidad; Cloroquina; Linfocitos; Malaria (fuente: DeCS BIREME).

DAMAGE TO HUMAN LYMPHOCYTE DNA FROM CHLOROQUINE EFFECT

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of chloroquine (CQ) on human lymphocytes through the Comet Assay. Lymphocytes were isolated from peripheral blood samples obtained from three healthy, non-smoking donors aged 24 to 30 years. The isolated lymphocytes were exposed for one hour to various treatments: hydrogen peroxide 2.5% (positive control), saline buffer phosphate 1X (negative control) and chloroquine at concentrations of 0 µg/ml, 0.25 µg/ml; 5 µg/ml and 300 µg/ml. The averages of the percentage of DNA in the comet tail, moment of tail and moment of Olive's tail were recorded, with significant differences between the different concentrations of CQ ($p < 0.01$). Also, the magnitude of DNA damage was increased as a function of the CQ concentration. The genotoxic effect of CQ was demonstrated in human lymphocytes exposed *in vitro*.

Keywords: Comet Assay; Genotoxicity; Chloroquine; Lymphocytes; Malaria (source: MeSH NLM).

INTRODUCCIÓN

La cloroquina (CQ) es un fármaco utilizado para el tratamiento de la malaria⁽¹⁾ y otras patologías. En recientes investigaciones, se describe que la CQ potencia la quimioterapia y radioterapia debido a sus propiedades antitumorales, alta capacidad antiproliferativa e inhibidora de la autofagia y reparación del ADN⁽²⁾. No obstante, se reportan efectos secundarios a la terapia⁽³⁾.

Inicialmente se propuso que el mecanismo de acción de la CQ, en el tratamiento de malaria, producía la muerte del parásito por intercalación con el ADN⁽⁴⁾. Sin embargo, en años recientes se ha demostrado que inhibe la replicación del ADN, mediado por la acumulación del hemo al interior de la vacuola alimentaria del trofozoito y altera el metabolismo

de reducción-oxidación, fijación de carbono y el metabolismo anaplerótico del ciclo del ácido tricarbóxico⁽⁵⁾.

A nivel genético, se presenta evidencia del efecto mutagénico de la CQ en *Drosophila melanogaster*⁽⁶⁾, roturas del ADN en células de hígado de ratas⁽⁷⁾, roturas cromosómicas en células de médula ósea y alteraciones en la morfología de los espermatozoides en *Mesocricetus auratus*⁽⁸⁾. Contrariamente a estos reportes, en el bagre amarillo se observó que la CQ mejora la motilidad de los espermatozoides e incrementa su capacidad de fertilización⁽⁹⁾.

El uso frecuente de la CQ para distintas patologías, el bajo costo, el reporte de efectos secundarios, el periodo de tratamiento de tres a cuatro meses, el alto grado de

¹ Universidad Nacional de Trujillo. La Libertad, Perú

^a Biólogo, doctor en Ciencias Biomédicas; ^b biólogo, doctor en Ciencias Biológicas
Recibido: 11/10/2017 Aprobado: 18/07/2018 En línea: 03/09/2018

toxicidad, la variación de concentraciones en los diferentes tejidos; constituyen factores que motivan a realizar pruebas para la determinación genotóxica de CQ, principalmente a bajas concentraciones, para lo cual, el ensayo cometa constituye una herramienta de alta sensibilidad aplicable en diferentes sistemas biológicos.

Por tal motivo, la presente investigación tiene como finalidad evaluar el daño inducido por la CQ en el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica a través del ensayo cometa.

EL ESTUDIO

Se realizó un estudio de diseño transversal, en bloques al azar. Cada bloque corresponde a los linfocitos de un donante, los que fueron distribuidos en tubos de manera aleatoria y expuestos a un control negativo, un control positivo y a concentraciones de 0 µg/ml, 0,25 µg/ml, 5 µg/ml y 300 µg/ml de CQ.

Se extrajo 10 ml de sangre periférica a tres donantes varones de 24 a 30 años, no fumadores, no expuestos a radiaciones ionizantes o químicos genotóxicos, al menos cuatro meses antes de la toma de muestra, debido al tiempo de semivida del fármaco ⁽¹⁰⁾. De las muestras de sangre se obtuvieron suspensiones de 3×10^6 linfocitos, aproximadamente.

Se utilizó cloroquina difosfato de 250 mg (150 mg de cloroquina base) (Laboratorio Chile S.A.), la que fue homogenizada y diluida en 300 ml de buffer fosfato salino (PBS) 1X en agitación a 25 °C, durante 1 h. Se filtró utilizando membrana millipore de 0,22 µm (Merck). Se realizaron diluciones en concentraciones de 0 µg/ml, 0,25 µg/ml, 5 µg/ml y 300 µg/ml de CQ (equivalentes a las cantidades halladas en suero y orina) ⁽¹¹⁾. Como control positivo, se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 2,5 % ⁽¹²⁾ (Laboratorio ALKOFARMA) y PBS 1X como control negativo. Los linfocitos fueron expuestos a estas soluciones durante 1 h a 25 °C en oscuridad.

Para determinar la viabilidad celular se tomaron 20 µl de linfocitos después de la exposición a los tratamientos, se colorearon con yoduro de propidio 0,5 µl 1mM en oscuridad durante 10 min y se evaluaron al microscopio de fluorescencia Olympus BX51, con filtros 536 y 617 nm. En cada muestra obtenida se contó linfocitos coloreados (muertos) y sin coloración (vivos) haciendo un total de 200 linfocitos, con esta información se determinó el porcentaje de viabilidad de linfocitos:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{número de linfocitos muertos}}{\text{total de linfocitos}} \times 100$$

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. El uso frecuente de la cloroquina (CQ) en diferentes enfermedades, así como la evidencia de su toxicidad en animales, motivó la investigación, a través del ensayo cometa, del efecto que podría producir en linfocitos humanos de sangre periférica.

Principales hallazgos. La CQ, a bajas concentraciones, produce roturas en el ADN de linfocitos; asimismo, el daño se incrementa en función a la concentración de CQ.

Implicancias. Los hallazgos contribuirán a establecer una adecuada dosificación para terapia con CQ. Es necesario la realización de estudios que evalúen los efectos que conllevan tratamientos prolongados.

El ensayo cometa se realizó siguiendo el protocolo de Sayer *et al* ⁽¹²⁾. De cada muestra de linfocitos tratados se preparó 70 µL de linfocitos en 140 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1 % y se llevaron a lisis en NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris HCl 10 mM, Tritón X-100 1 %, DMSO 10 % e incubaron a 4 °C durante 4 h, la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 30 min en buffer de Na₂EDTA 1 mM, NaOH 300 mM pH 13, la neutralización en solución Tris HCl pH 7,5 por 3 min y fijación en alcohol 96° por 3 min. Se coloreó con bromuro de etidio (20mg/ml) y analizó al microscopio de fluorescencia Olympus BX51 a 40X con filtros de 510 nm y 550 nm.

Se determinó el porcentaje de ADN de la cola del cometa (%TADN), momento de la cola (TM) y momento de Olive (OTM) como parámetros de genotoxicidad ⁽¹³⁾, para lo cual se utilizó el programa CASPLab (<http://casplab.com>). El linfocito dañado se asemeja a la forma de una cometa, con un núcleo redondeado (cabeza) que se continúa con una tinción más tenue en forma alargada (cola), el programa captura la imagen, la intensidad de fluorescencia de la cola delineada es comparada a la intensidad total del cometa para determinar el %TADN. El momento de la cola y el momento de Olive se calcularon por las siguientes formulas:

$$\text{Momento de la cola (TM)} = \frac{\text{longitud de la cola} \times \% \text{TADN}}{\% \text{ total de ADN}}$$

$$\text{Momento de Olive (OTM)} = \text{distancia entre la cabeza y la cola} \times \% \text{TADN}$$

El %TADN mide la cantidad de ADN existente en la cola en estado fragmentado y/o desplegado, mientras que TM y OTM representa la magnitud de rotura del ADN.

Se estimaron las medias y desviación estándar para el %TADN, TM y OTM. Los datos fueron ajustados a la distribución normal y se compararon mediante el análisis de varianza y Tukey. Para el análisis de regresión lineal se consideró la concentración de la CQ como variable

independiente (función x) y como variables dependientes al %TADN, TM y OTM (función y), los coeficientes de regresión ($\beta = \text{covarianza } x,y / \text{suma de cuadrados de } x$) fueron estimados mediante el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para el análisis estadístico, se consideró un $\alpha = 0,05$.

La investigación contó con la aprobación del Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo (CIEI-FAC.MED-UNTE. cód. n.º 21101403156). Además, los participantes firmaron el respectivo consentimiento informado.

HALLAZGOS

Los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos a las concentraciones de 0,25 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 300 $\mu\text{g/ml}$ de CQ fueron 98,52 %, 98,37 % y 89,39 %, respectivamente. Asimismo, los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos al control negativo y al control positivo fueron de 99,48 % y de 94,67 %, respectivamente (Tabla 1).

Al evaluar visualmente el daño de la CQ en el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica con el ensayo cometa, se observaron linfocitos con: A) ADN sin daño, B) ADN con daño de bajo nivel, C) ADN con daño moderado y D) ADN con daño elevado (Figura 1).

El %TADN presentó diferencias significativas a la concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con las

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de linfocitos de sangre periférica expuestos a diferentes tratamientos: buffer fosfato salino, peróxido de oxígeno y cloroquina

Tratamientos	Viabilidad (%)
PBS 1X (control negativo)	99,48
H ₂ O ₂ (2,5 %) (control positivo)	94,67
CQ (0,25 $\mu\text{g/ml}$)	98,52
CQ (5 $\mu\text{g/ml}$)	98,37
CQ (300 $\mu\text{g/ml}$)	89,39

PBS: Buffer fosfato salino
H₂O₂: Peróxido de oxígeno
CQ: Cloroquina

concentraciones de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 5 $\mu\text{g/ml}$ de CQ. Sin embargo, los valores promedios del TM y OTM fueron diferentes estadísticamente ($p < 0,001$) a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ en comparación con 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y 0 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2). Asimismo, no se presentaron diferencias entre la concentración más baja de CQ con el control negativo. El control positivo con H₂O₂ 2,5 % presentó diferencias en todos los casos de tratamientos con CQ.

En la Figura 3 se muestra la relación lineal del porcentaje de ADN medido mediante %TDNA y OTM en función directa a la concentración de CQ; los coeficientes de regresión (β) fueron 3,49 y 2,27, respectivamente ($p < 0,01$). El coeficiente de regresión del MT y concentración de CQ fue 3,43, ($p < 0,01$). Los valores de correlación entre el %TDNA, TM y OTM con respecto a la concentración de CQ, fueron $r = 0,94$, $r = 0,92$ y $r = 0,92$, respectivamente.

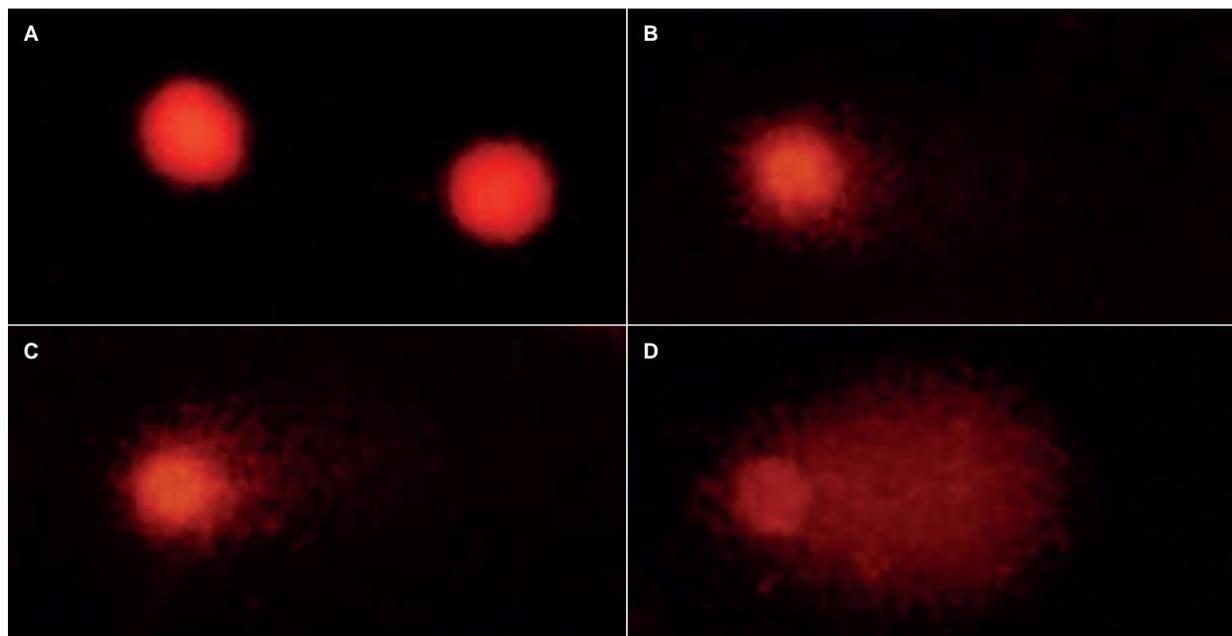
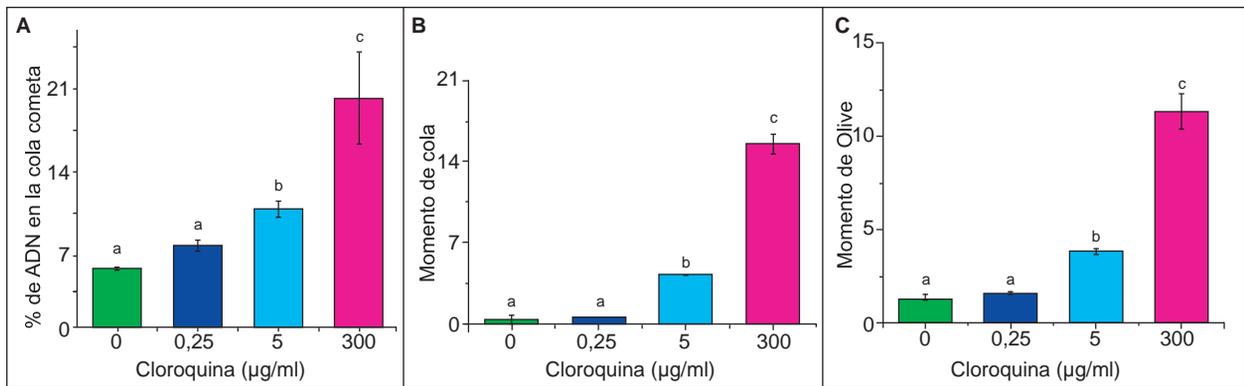


Figura 1. Determinación del daño inducido por cloroquina en el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica a través del ensayo cometa. A) ADN sin daño, B) ADN con daño de bajo nivel, C) ADN con daño moderado y D) ADN con daño elevado



Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Figura 2. Daño en el ADN en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos a diferentes concentraciones de cloroquina (0 µg/ml, 0,25 µg/ml, 5 µg/ml y 300 µg/ml) A) Porcentaje de ADN en la cola del cometa, B) Momento de cola y C) Momento de Olive

DISCUSIÓN

El ensayo cometa presenta mayor ventaja en la detección de genotóxicos, debido a la capacidad de resolver si un agente produce daños en el ADN a bajas dosis, manejo sencillo, bajo costo y reproducible⁽¹⁴⁾. De allí, su aplicación en genética toxicológica.

Esta investigación muestra evidencias del efecto clastogénico de la CQ en linfocitos humanos de sangre periférica *in vitro* expuestos a diferentes concentraciones de CQ. Estos daños genéticos pueden presentarse en los diferentes tejidos y fluidos de pacientes tratados con CQ, desde concentraciones que fluctúan entre 0,05 µg/ml hasta 334,4 µg/ml^(15,16).

El daño del ADN se demuestra con el incremento del %TDNA, TM y OTM en función al aumento de las concentraciones de CQ, en relación lineal directa. Así

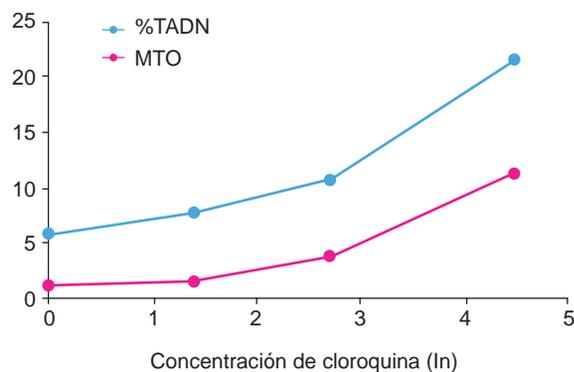


Figura 3. Porcentaje de ADN en la cola del cometa en linfocitos humanos de sangre periférica en función de la concentración de cloroquina (0 µg/ml, 0,25 µg/ml, 5 µg/ml y 300 µg/ml) transformados a logaritmo natural (ln), por ajuste a la distribución normal. Porcentaje de ADN en la cola del cometa (%TADN) ($\beta=3,49, r=0,94, p=0,05$). Momento de Olive (MTO) ($\beta=2,27, r=0,92, p<0,01$)

mismo, la viabilidad de los linfocitos por encima del 89,39 % en todos los tratamientos revelan que el porcentaje de daño del ADN de los linfocitos es a causa de CQ. La respuesta positiva de daño genético en el ensayo cometa se considera como punto de corte el 75 % de viabilidad celular⁽¹⁷⁾.

Las diferencias de viabilidad (98,37 %) de los linfocitos de sangre periférica directamente expuestos a CQ registradas en el presente estudio en comparación con la viabilidad (50 %) de los linfocitos de sangre periférica en cultivo expuestas a la misma concentración de 5 µl⁽¹¹⁾, así como, en las concentraciones de H₂O₂, en cultivo (100µM)⁽¹⁸⁾ y directamente expuesto (734 mM)⁽¹²⁾ utilizadas como control positivo; constituyen pruebas que el daño del ADN depende de la estructura y estado funcional de los linfocitos expuestos a CQ *in vitro*.

Los linfocitos maduros que tienen mayor grado de empaquetamiento del ADN presentarán mayor resistencia al daño, en comparación a las células en estado proliferativo, debido a los procesos activos de replicación y transcripción. Ensayos de resistencia en diferentes subpoblaciones de linfocitos, encuentran alta sensibilidad a mutágenos en los linfocitos B y mayor resistencia en los linfocitos T⁽¹⁹⁾. A estas variaciones, se sumarían los efectos epigenéticos, centrándose en la acción de los microARN, metilación del ADN y modificación de las histonas, que actúan modificando la accesibilidad del ADN a los mutágenos⁽²⁰⁾, cambios que podrían generar diferencias en individuos expuestos a las mismas dosis e igual tiempo de exposición a la CQ.

Entre las limitaciones del estudio se puede mencionar que, a pesar de haber trabajado con linfocitos humanos de sangre periférica, se ha observado vulnerabilidad del ADN. Es probable que el daño del ADN por CQ sea mayor cuando los linfocitos se encuentren en su medio natural, debido a su estado funcional y diferentes grados de maduración. Los linfocitos aislados *in vitro* mostraron viabilidad tan igual que el control negativo, lo que sustenta que las roturas del ADN se deben a la CQ.

Será importante la realización de estudios sobre la actividad antiapoptótica y antirreparador de la replicación del ADN

producida por CQ, así como la evaluación de los efectos secundarios que conllevan tratamientos prolongados.

Se concluye que la CQ induce el aumento significativo de lesiones en el ADN de linfocitos humanos de sangre periférica, reflejadas en el incremento del %TDNA, MT y OTM en función de las concentraciones de 0,25 µg/ml; 5 µg/ml y 300 µg/ml de CQ.

Contribuciones de autoría: LA, MC y ZP han participado en la concepción y diseño del artículo, recolección de datos, análisis e interpretación de datos. Todos los autores realizaron la revisión crítica del artículo y aprobaron la versión final.

Fuente de Financiamiento: Universidad Nacional de Trujillo.

Conflictos de Interés: No.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chakir I, Ibrahim SA, Afane B, Jambou R. Control of malaria in the Comoro Islands over the past century. *Malar J*. 2017;16(1):387. doi: 10.1186/s12936-017-2027-1.
- Plantone D, Koudriavtseva T. Current and Future use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in infectious, Immune, Neoplastic and Neurological Diseases. *Clin Drug Investig*. 2018;38(8):653-671. doi: 10.1007/s40261-018-0656-y.
- Bogaczewicz A, Sobówni T. Psychiatric adverse effects of chloroquine. *Psychiatr Psychol Klin*. 2017;17(2):111-4.
- Meshnick SR. Chloroquine as intercalator: a Hypothesis revived. *Parasitol Today*. 1990;6(3):77-9.
- Tewari SG, Prigge ST, Reifman J, Wallqvist A. Using a genome-scale metabolic network model to elucidate the mechanism of chloroquine action in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017;7(2):138-146. doi: 10.1016/j.ijpddr.2017.03.004.
- Xanema N, Creus A, Velásquez A, Marcos R. Testing of chloroquines and quinacrine for mutagenicity in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*. 1985;158(3):177-80.
- Farombi EO. Genotoxicity of chloroquine in rat liver cells: protective role of free radical scavengers. *Cell Biol Toxicol*; 2006;22(3):159-67.
- Cruz BM. Genotoxicidad de cloroquina en *Mesocricetus auratus* "hámster" [Tesis Doctoral]. Trujillo: Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. 2009.
- Zhang J, Ma W, Xie B, Gui JF, Mei J. Beneficial effect and potential molecular mechanism of chloroquine on sperm motility and fertilizing ability in yellow catfish. *Aquaculture*. 2017; 468:307-13.
- Gustafsson LL, Walker O, Alván G, Beermann B, Estevez F, Gleisner L, et al. Disposition of chloroquine in man after single intravenous and oral doses. *Br J Clin Pharmacol*. 1983;15(4):471-9.
- Bygbjerg IC, Flachs H. 1986. Effect of chloroquine on human lymphocyte proliferation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986; 80(2):231-235.
- Sayer A, Hu Q, Bourdelais AJ, Baden DG, Gibson JE. The effect of brevenal on brevetoxin-induced DNA damage in human lymphocytes. *Arch Toxicol*. 2005; 79(11):683-8.
- Reisinger K, Blatz V, Brinkman J, Downs TR, Fischer A, Henkler F, et al. Validation of the 3D skin Comet assay using full thickness skin models: Transferability and reproducibility. *Mutat Res*. 2018;827:27-41. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.01.003.
- Afanasieva K, Sivolob A. Physical principles and new applications of comet assay. *Biophys Chem*. 2018 Jul;238:1-7. doi: 10.1016/j.bpc.2018.04.003.
- Pussard E, Verdier F, Blayo MC. Simultaneous determination of chloroquine, amodiaquine and their metabolites in human plasma, red blood cells, whole blood and urine by column liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1986;374:111-118.
- Houzé P, de Reynies A. Simultaneous determination of chloroquine and its three metabolites in human plasma, whole blood and urine by ion-pair high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1992; 574:305-312.
- Henderson L, Wolfreys A, Ferdyk J, Bourner C, Windebank S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*. 1998; 13(1):89-94.
- Zivkovic L, Borozan S, Cabarkapa A, Topalovic D, Ciptasari U, Bajic V, et al. Antigenotoxic Properties of *Agaricus blazei* against Hydrogen Peroxide in Human Peripheral Blood Cells. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8759764. doi: 10.1155/2017/8759764.
- Weng H, Morimoto K. Differential responses to mutagens among human lymphocyte subpopulations. *Mutat Res*. 2009;672(1):1-9. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.010.
- Chappell GA, Rager JE. Epigenetics in chemical-induced genotoxic carcinogenesis. *Curr Opin Toxicol*. 2017; 6:10-17. doi: 10.1016/j.cotox.2017.06.007.

Correspondencia: Zulita Adriana Prieto Lara
 Dirección: San Mateo 300-202 Urbanización San Andrés, Trujillo, La Libertad
 Teléfono: (+51) 044 284042
 Correo electrónico: zprieto@unitru.edu.pe