

## Ensayo cometa en espermatozoides

### *Sperm comet assay*

M.M. Reta; V. Hynes  
Universidad Juan Agustín Maza

Contacto: valenhynes@hotmail.com

**Palabras clave:** ensayo cometa - integridad ADN - espermatozoides

**Key Words:** comet assay – sperm - DNA integrity

#### Introducción

En 1988 Singh y colaboradores describieron la técnica de electroforesis de células individuales en condiciones alcalinas, y para detectar rupturas de cadena simple del ADN. El fundamento de la técnica es la estimación del daño en el ADN a través de longitud o el momento de la cola, en los cometas formados en cada célula luego de la electroforesis (Lu, Takeshita, & Morimoto, 1997). el ensayo cometa es una técnica que permite evaluar integridad del ADN de las células observadas y ha sido de utilidad para estimar el daño genético de diversos fármacos y productos químicos. .

A lo largo de los años se ha realizado esta técnica en distintos tipos celulares, especies y se han descrito varios protocolos diferentes en espermatozoides. La solución de lisis se compone de NaCl, NaEDTA, tris, DMSO y tritón X100; en ensayo cometa puede realizarse en pH alcalino, neutro o la combinación de ambos. En espermatozoides de bovinos y rata se ha descrito la modificación de agregar dithiotreitol a la solución de lisis. En humanos se ha combinado el uso de dithiotreitol con dodecyl sulfato de sodio y en esta especie se realiza en condiciones de pH neutro y alcalino para detectar rupturas en la cadenas simple y doble de ADN. Tanto en cerdos como equinos se ha utilizado proteína K para romper los enlaces de las protaminas y se describió el uso de solución de lisis de pH neutro y alcalino respectivamente. El uso de beta mercaptoetanol ha sido descrito para romper los enlaces de las protaminas en concentración de 1 y 2%.

#### Objetivo

Realizar el ensayo cometa en espermatozoides y sangre de animales domésticos.

#### Metodología

Se llevó a cabo el ensayo cometa con espermatozoides bovinos, se utilizó sangre canina como control positivo y negativo del ensayo. Se suspendieron las células en agarosa punto de fusión bajo y se extendieron sobre portaobjetos pre-tratados con agarosa punto de fusión normal. Fueron expuestos a la solución de lisis alcalina (NaCl, NaEDTA, Tris, DMSO y Triton X100). Luego se

expusieron los portaobjetos a una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% según la técnica de Strzezek y Kordan (2003), este paso se realizó para descondensar la cromatina espermática a través del rompimiento de los puentes disulfuro entre las protaminas adyacentes. Luego se neutralizó con solución de Tris pH 7.4. La corrida electroforética fue realizada en solución buffer de corrida (NaHO y EDTA, pH 13). Los portaobjetos fueron teñidos con bromuro de etidio 20  $\mu$ g/ml y observamos en microscopio de fluorescencia. Se tomaron 10 fotografías de cada ensayo para luego analizar las imágenes.

#### Resultados

El resultado que obtuvimos fue negativo. Los controles positivos y negativos de espermatozoides fueron sometidos a peróxido de hidrógeno en distintas concentraciones no presentaron cometas. se observaron cometas en sangre de canino en los controles positivos y negativos.

#### Discusión

El ensayo cometa es una técnica usada para evaluar integridad del ADN no muy utilizada, tal vez debido a que no es un método rápido. El uso de la misma esta poco descrito en la bibliografía y los protocolos utilizados no han sido repetidos. Una de las causas probables es la dificultad para desenrollar de la cromatina espermática fuertemente condensada por la protaminas.