



Disparidad en daño al ADN, Hsp70 y apoptosis, por UVA en leucocitos ovinos y humanos

David A García-López¹ ; Jennifer Ortiz-Letechipia¹ ; Rómulo Bañuelos-Valenzuela² ;
Rosa G Reveles-Hernández¹ ; Rosa M Ramírez-Santoyo¹ ; Sergio H Sánchez-Rodríguez^{1*} .

¹Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Biología Celular y Neurobiología. Avenida Preparatoria, Colonia Hidráulica, Zacatecas Zacatecas, México.

²Universidad Autónoma de Zacatecas. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Laboratorio de Biología Celular. El Cordobel, Enrique Estrada, Zacatecas Zac. México.

*Correspondencia: smdck@hotmail.com

Recibido: Agosto 2023; Aceptado: Febrero 2024; Publicado: Mayo 2024.

RESUMEN

Objetivo. Determinar viabilidad celular, expresión de proteína Hsp70, degradación del material genético y muerte celular por apoptosis en leucocitos ovinos Katahdin, Dorper y Humanos irradiados *in vitro* con radiación UVA. **Material y métodos.** Se utilizó leucocitos, los cuales fueron expuestos *in vitro* a radiación UVA, para evaluar viabilidad celular, fragmentación de ADN, expresión de proteína Hsp70 y alteraciones morfológicas relacionadas con apoptosis de cada modelo. **Resultados.** Se encontró una caída en la viabilidad de leucocitos expuestos a radiación UVA, siendo los ovinos los más afectados. Se observó un incremento en la expresión de Hsp70 en los leucocitos humano, Katahdin y Dorper. Se encontró aumento progresivo de la fragmentación de ADN, así como aumento en las alteraciones morfológicas relacionadas con apoptosis conforme aumentó el tiempo de exposición a radiación UVA, siendo el modelo Dorper el más afectado. **Conclusiones.** La radiación UVA genera estrés en leucocitos ovinos y humanos, observando que los leucocitos humanos son más resistentes, mientras que los ovinos son más susceptibles, principalmente el genotipo Dorper.

Palabras clave: Apoptosis; estrés; Hsp70; radiación ultravioleta (*Fuente: CAB*).

ABSTRACT

Objective. Determine cell viability, Hsp70 protein expression, degradation of genetic material and cell death by apoptosis in Katahdin, Dorper ovine and human leukocytes irradiated *in vitro* with UVA radiation. **Material and methods.** Leukocytes, which were exposed *in vitro* to UVA radiation, were used to evaluate cell viability, DNA fragmentation, Hsp70 protein expression and morphological alterations related to apoptosis of each model. **Results.** A drop in the viability of leukocytes exposed to UVA radiation was found, with ovine being the most affected. An increase in the expression of Hsp70 was observed in human, Katahdin and Dorper leukocytes. A progressive increase in DNA fragmentation was found, as well as an increase in morphological alterations related to apoptosis as the time of exposure to UVA radiation increased, with the Dorper model being the most affected. **Conclusions.** UVA radiation generates stress in ovine and human leukocytes, observing that humans leukocytes are more resistant, while ovines are more susceptible, mainly the Dorper genotype.

Keywords: Apoptosis; Hsp70; stress; ultraviolet radiation (*Source: CAB*).

Como citar (Vancouver).

García-López DA, Ortiz-Letechipia J, Bañuelos-Valenzuela R, Reveles-Hernández RG, Ramírez Santoyo RM, Sánchez-Rodríguez SH. Disparidad en daño al ADN, Hsp70 y apoptosis, por UVA en leucocitos ovinos y humanos. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(2):e3176. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3176>



©El (los) autor (es) 2024. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

INTRODUCCIÓN

El ozono atmosférico nos protege de la radiación UV que es el carcinógeno físico más importante para el hombre, animales terrestres y marinos (1,2,3). Debido a las actividades humanas tanto habituales como industriales se generan compuestos clorofluorometanos que se agregan al ambiente en cantidades cada vez mayores; estos compuestos pueden permanecer en la atmósfera durante 40 a 150 años, lo cual permite su rápida acumulación. Cuando estos compuestos alcanzan la capa de ozono e interactúan con la radiación solar, se produce un proceso de foto disociación, lo que lleva a la generación de átomos de cloro libres, los cuales interactúan con las moléculas de ozono conduciendo a su progresiva destrucción, permitiendo que de manera gradual aumente la radiación ultravioleta que incide sobre la tierra y produzca daño sobre los organismos que la habitan (4).

La radiación ultravioleta proveniente del sol abarca desde los 100 a los 400 nanómetros (nm), por su longitud de onda se clasifica en: luz ultravioleta A (UVA), luz ultravioleta B (UVB), y luz ultravioleta C (UVC), donde la radiación UVA con longitud de onda entre 320 a 400 nm, atraviesa la capa de ozono en un 95% (5) y es absorbida entre un 70-80% por las células de la dermis y melanocitos de la epidermis basal (6,7). La radiación UVB con longitud de onda de entre 280 a 320 nm (5), es absorbida por la capa de ozono en un 95%, solo el 5% llega a la tierra, es responsable de la mayor parte de los daños en piel, ya que es absorbida hasta en un 70% por el estrato córneo de la epidermis (6,7). La radiación UVC con longitud de onda entre los 100 a 280 nm, es muy energética, y es detenida en su totalidad por la capa de ozono (8).

La radiación ultravioleta genera daño en las células de la piel y su estructura. La radiación UVA produce por excitación molecular efectos fotodinámicos mediados por fotosensibilizadores endógenos, como citocromos, flavina, grupo hemo, NADPH y porfirinas, que pueden actuar sobre el ADN oxidando las pirimidinas y purinas o rompiendo sus cadenas sencillas y en proteínas, oxidando el Triptófano y la Tirosina o excitando los aminoácidos de manera directa, lo que fomenta rupturas o una desestabilización de la estructura proteica. Por otro lado, la radiación UVB posee efectos directos excitando las bases pirimidicas y ionizando la guanina. La radiación UVC tiene efectos más dañinos, pero está actualmente no atraviesa la atmosfera (9).

Afectación de la radiación solar en animales.

Algunos animales expuestos por largos periodos a la radiación solar, que viven a grandes altitudes, en lugares tropicales, que carecen de pigmento en la epidermis y tienen poco pelo son más propensos a enfermedades de la piel, ya que la radiación UV daña su ADN, aumentando la aparición de mutaciones, la detención del ciclo y muerte celular. Uno de los padecimientos que se relaciona con estos factores es el carcinoma de células escamosas. Estos tumores se presentan principalmente en bovinos de las razas Hereford, Simmental, y Holstein, ocasionando cáncer de ojo, cuyo origen es genético, pero también se relaciona con la exposición a la radiación UV, así mismo afecta a felinos y caninos. En caballos, las razas más sensibles son Belga, Clydesdale, Shire y Appaloosa generando lesiones principalmente en regiones muco-cutáneas (conjuntiva, vulva y perineo). En canideos las lesiones están localizadas en tronco, extremidades, escroto, labios y el lecho ungueal; en felinos, en cara, orejas, principalmente cuando hay pelo blanco. La radiación UV induce también melanocitomas, el 80 al 90 % de estos tumores son benignos en bovinos, localizándose principalmente en piel; en el resto de los animales, estos tumores suelen ser malignos, llamados melanomas, siendo comunes en caninos y equinos, poco comunes en gatos y raros en otras especies (2,10).

Otros padecimientos provocados por luz UV son los melanomas, en perro se localizan en boca, labios, piel (cabeza y el escroto), dedos y ojo, así como los hemangiomas, que son una neoplasia relativamente benigna de los capilares caninos en la piel, tronco, extremidades y tejidos blandos, con frecuencia son precursores de los hemangiosarcomas. Así la radiación UV afecta a algunas especies de manera importante tanto en aspectos de salud, como en aspectos de trascendencia económica para productores de ganado (2,10).

Estrés celular. Debido a que los estresores físicos y químicos afectan a los organismos, se ha puesto interés en un grupo de biomoléculas conocidas como proteínas de choque térmico (Hsp), son una familia de proteínas altamente conservadas, existen tanto en células eucariontes como procariontes. En condiciones normales ayudan al plegamiento de proteínas, en los procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diversos orgánulos. Un miembro de esta familia es la Hsp70 la cual actúa como chaperona y juegan un rol importante en la homeostasis de proteínas en la célula (11,12).

En procesos de estrés como choque térmico, exposición a metales pesados, especies reactivas de oxígeno y radiación ultravioleta, entre otros, estas proteínas aumentan su expresión para recuperar la homeostasis celular al renaturalizar proteínas o al inducir su destrucción cuando son dañadas. Se ha encontrado una relación directa respecto a la dosis de UV recibida y la expresión de la proteína Hsp70 en diferentes modelos experimentales como en células de la piel humana (13), en fibroblastos murinos (14), y en corneas de ratón (15).

Apoptosis. El proceso de apoptosis o muerte celular programada se lleva a cabo con el fin de controlar el desarrollo y crecimiento celular, puede presentarse por señales celulares controladas o inducida por factores físicos, químicos o fisiológicos que dañan la célula. Ocurre durante el desarrollo y el envejecimiento, como mecanismo homeostático para mantener las poblaciones celulares en tejidos. Hay dos vías apoptóticas principales: la vía del receptor extrínseco o de muerte, y la vía intrínseca o mitocondrial. La apoptosis se considera uno de los principales mecanismos de muerte celular por la exposición a la radiación (16). En las células que activan la apoptosis se pueden observar características morfológicas celulares tales como, contracción celular, picnosis (contracción del núcleo y condensación de la cromatina), citoplasma denso, orgánulos más apretados, cariorrexis (ruptura del núcleo celular) y separación de fragmentos celulares (citoplasma con organelos apretados con o sin un fragmento nuclear) en cuerpos apoptóticos (17,18,19).

Leucocitos y radiosensibilidad a luz UV. Un modelo para estudiar los efectos dañinos de la radiación UVA son los leucocitos, debido a su alta radiosensibilidad, por lo que es utilizado como modelo para observar la susceptibilidad de algunos organismos que habitan en zonas áridas con un alto nivel de radiación solar y ultravioleta (20,21).

Los altos índices de radiación UVA que llegan a la superficie terrestre tiende a disminuir la respuesta inmune tanto innata como adaptativa (21,22,23), debido a que la UVA tiene la capacidad de penetrar hasta la dermis cuya estructura está altamente vascularizada (6,7), donde puede interactuar con células del sistema inmune (leucocitos), modificando su respuesta (22,23).

Factores de exposición a Luz UV y estrés animal. La especie ovina es la más explotada en las zonas áridas, siendo su carne y lana, los productos más importantes. México se encuentra en el 5° lugar de América en producción de ovinos de las cuales, Zacatecas cuenta con 427,080 cabezas de ganado (24,25). La mayor parte es de tipo criollo, Hamtshire Down, Katahdin, Dorper entre otras. Su explotación se desarrolla en condiciones extensivas de manejo por lo que su alimentación depende del pastoreo de la vegetación de los agostaderos, y por ende se exponen frecuentemente a los factores ambientales de la región (26). Uno de estos factores a los que se exponen estos animales e incluso el ser humanos que habita Zacatecas, es a altas dosis de luz solar durante todo el año (27,28). Debido a esta exposición continua a las emisiones solares, las células de la piel del hombre y algunos animales domésticos sufren estrés como consecuencia de la radiación UV y el calor, por lo que se puede entender el grado de estrés que padecen los organismos que habitan las zonas áridas y semiáridas en la tierra cuya carga solar es alta con un paquete de radiación ultravioleta elevada y una carga calórica considerable (29).

Lo antes expuesto muestra la capacidad de daño que puede tener la radiación UVA sobre los organismos, por lo que es importante diferenciar el daño que esta radiación produce en los leucocitos de ovinos con respecto a los leucocitos humanos tomando en cuenta que en los ovinos de manera natural no están directamente expuestos a este factor por su capa de pelo y los humanos si, pese a su pigmentación, lo que nos lleva a plantear por lo antes expuesto que los leucocitos humanos deberán ser más radio resistentes que los ovinos en un análisis *in vitro*. Así, el objetivo del presente estudio fue determinar *in vitro* el daño que provoca la radiación UVA medido a través de la viabilidad celular, el grado de expresión de un bioindicador de estrés como la proteína Hsp70, degradación del material genético y el proceso de muerte por apoptosis en leucocitos ovinos Katahdin, Dorper y Humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo de estudio. Se utilizaron leucocitos de ovinos Katahdin, ovinos Dorper y Humanos, los cuales fueron seleccionados por su alto grado de sensibilidad a las radiaciones tanto ionizantes como no ionizantes (17, 20,21) y por su fácil obtención.

Las muestras de leucocitos se obtuvieron de sangre total colectada de ovinos machos sanos Katahdin y Dorper, por punción venosa en la yugular utilizando tubos Vacutainer® adicionados con EDTA (n= 5 para cada modelo experimental). Los animales fueron tratados bajo las mismas condiciones de estabulación, que provenían del rancho "Manicomio", localizado en el municipio de Jerez, Zacatecas, México, localizado en las coordenadas GPS: 22°42'24.2"N 102°59'04.5"W. Las muestras de leucocitos humanos fueron de voluntarios sanos con una edad de 20-30 años, se colectaron por punción en la vena cefálica utilizando tubos Vacutainer® con EDTA (n = 5).

Obtención de leucocitos. Se llevó a cabo por gradiente de Ficoll Histopaque® (SIGMA-ALDRICH® 10771). Hecho esto, se procedió a realizar alícuotas de 500 µL de los leucocitos en medio RPMI® (con un promedio de 100,000 células) en tubos Eppendorf para exponerlos a radiación UVA.

Exposición a radiación UVA. Los leucocitos fueron expuestos a radiación UVA en los tiempos: una, dos y tres horas utilizando una lámpara de radiación UV Handelheld con un potencial de exposición de radiación UVA de 8W a 365 nm. Como control se utilizaron leucocitos no irradiados.

Evaluación de viabilidad celular. Por el método de exclusión de azul de tripán, los leucocitos fueron contados y se evaluó su viabilidad (30). Todo lo anterior fue en leucocitos no irradiados (control) y otros una hora después de la irradiación.

Lisis celular. Cada muestra de leucocitos fue homogenizada en tubos Eppendorf con 500 µL de buffer de lisis que contiene: Tritón X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 e inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626), realizando inversiones sucesivas. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 10,976 gravedades y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de proteínas. La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford en 1976 (31), para garantizar que se evaluará la misma cantidad de proteína de cada muestra por PAGE-SDS.

Caracterización de proteínas por PAGE-SDS. De cada condición experimental, 20 µg de proteína fueron caracterizados por PAGE-SDS al 7.5% de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli en 1970 (32).

Western Blot e Inmunodetección. Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham, RPN303C), tal como describió Towbin en 1979 (33). La membrana fue bloqueada con PBS-Caseína al 3% durante toda la noche, después, se lavaron con PBS e incubaron con anticuerpos monoclonales para identificar Hsp70 (SC-24 Santa Cruz Biotechnology®) en dilución 1:1000 en solución bloqueadora, por 1 hora. Posteriormente para identificar la unión del primer anticuerpo a la proteína de interés, las membranas se incubaron con un segundo anticuerpo anti-ratón IgG-HRP conjugado a peroxidasa (SC-2005 Lot.F0412 Santa Cruz Biotechnology®). La unión antígeno-anticuerpo fue observada mediante colorimetría empleando Diaminobencidina (0.1%) activada con peróxido de hidrógeno, observando la aparición de bandas de color café, las cuales se analizaron con un foto-documentador marca Bio-Rad® (Image Lab Bio-Rad® Laboratorios) empleando el software Image Lab versión 2.0.1 build 18 (Copyright© 2009 de Bio-Rad® Laboratories), para obtener su densidad óptica con la finalidad de cuantificar el nivel de expresión de proteínas en cada muestra.

Evaluación de la integridad de ADN. Para el aislamiento de ADN genómico, se tomó una alícuota de 500 µL de cada muestra a la cual se le adiciono reactivo DNazol® (Regent GibcoBRL) para lisar. Después, el ADN genómico se precipito mediante etanol absoluto frio. Tras un lavado con etanol (75%), el ADN se disolvió en NaOH 8 mM para ser re-suspendido. Posteriormente el ADN se cuantificó por espectrofotometría (a 260 nm) utilizando un Nanodrop® (thermo scientific), para garantizar la misma concentración de ADN de cada muestra, posteriormente se realizó el corrimiento del ADN en geles de agarosa y se evaluó su integridad.

El ADN se caracterizó en geles de agarosa (0.8%) en buffer TAE 1X (Tris ácido etilendiamin tetracético, 5 M, pH 8) con bromuro de etidio para revelarse, preparando las muestras con buffer de carga y colocándose en el gel junto con un marcador de peso molecular para correrse

a 80 Volts por una hora, posteriormente se observaron los geles en el foto-documentador Bio-Rad® (descrito anteriormente) para evaluar su integridad.

La integridad o degradación del ADN se observó en el gel de agarosa utilizando el siguiente criterio: Si el ADN está íntegro, se observa una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra (34).

Evaluación de la morfología leucocitaria. Mediante una alícuota de 500 µL de sangre total control y otra irradiadas con UVA, se realizaron frotis sanguíneos en portaobjetos y se tiñeron con colorante de Wright (WR0505 Golden Bell®). posteriormente, se observaron los frotis en microscopio óptico con aumento 100X y se registraron las anomalías morfológicas encontradas en cada muestra (17).

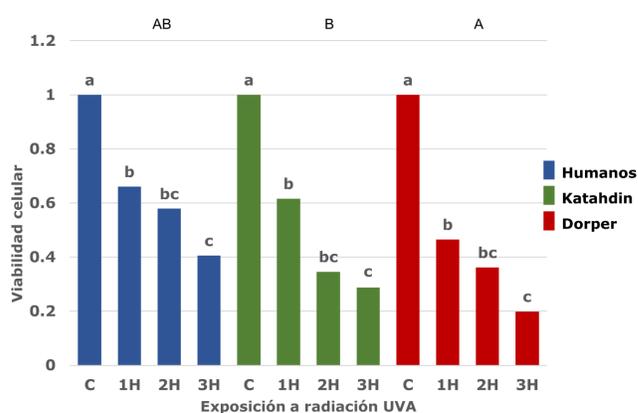
Análisis estadístico. Para el análisis de los datos de viabilidad celular de los leucocitos, que fueron 60 unidades experimentales, se utilizó el modelo de diseño de bloques completos al azar.

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (2002) con una $\alpha=0.05$ para poder observar si existían diferencias significativas en las medias de viabilidad celular. Posteriormente se realizó una comparación de medias de viabilidad celular entre bloques (razas) y tratamientos con el método Tukey con la sentencia MEANS del SAS.

Los resultados obtenidos de viabilidad celular fueron representados gráficamente mediante Excel®, y expresados como media de viabilidad celular para cada bloque y sus tratamientos \pm desviación estándar (\pm D.E.).

RESULTADOS

Viabilidad de leucocitos irradiados con UVA. Se observó un efecto ($p<0.05$) en las medias de viabilidad de los leucocitos con respecto a su control entre las razas evaluadas. Las células que presentaron viabilidades más altas fueron las humanas, seguido de las Katahdin y por último las Dorper. El control mantuvo las viabilidades más elevadas, seguido de una hora de exposición a radiación UVA, después dos horas de exposición y por último tres horas de exposición (Figura 1).



^{a,b,c}Diferentes literales indican diferencia estadística significativa para la variable tratamientos y ^{A,B}para la variable Raza ($p<0.05$).

Figura 1. Viabilidad (\pm D.E.) de leucocitos irradiados con UVA. C: control, 1H: 1 hora, 2H: 2 horas y 3H: 3 horas.

Expresión de Hsp70 en leucocitos irradiados con UVA. Se observó para los tres modelos de estudio, una expresión basal de Hsp70 en el control, una sobreexpresión a la una y dos horas, y una baja expresión a las tres horas para los modelos Katahdin y humano, mientras para el modelo Dorper, se observó un incremento a la hora y una caída a la segunda y tercera hora de exposición. Dichos resultados fueron obtenidos mediante el análisis de densidad óptica de cada banda de proteína detectada por western blot (Figura 2).

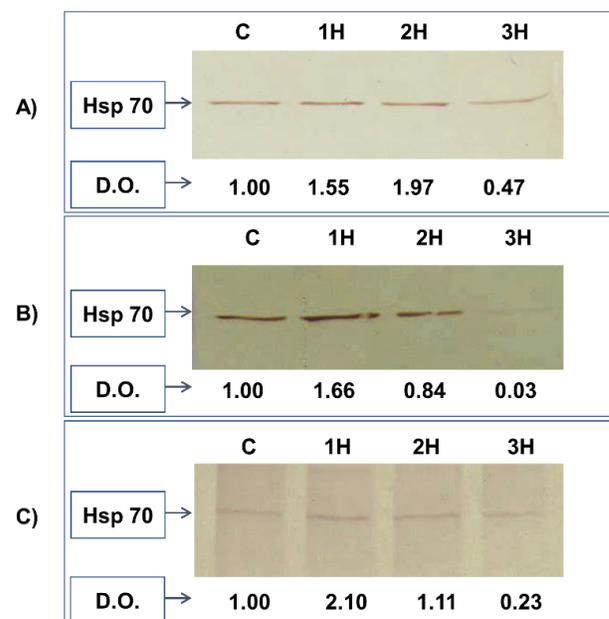


Figura 2. Expresión de Hsp70 en leucocitos. A) Katahdin, B) Dorper y C) Humanos irradiados con UVA. C: control, 1H: 1 hora, 2H: 2 horas y 3H: 3 horas. D.O.: densidad óptica obtenida utilizando un foto-documentador.

Integridad del ADN en leucocitos irradiados con UVA. Se observó para cada tratamiento y para cada modelo de estudio, amplias fragmentaciones en las muestras expuestas a una, dos y tres horas a radiación UVA de manera creciente respecto a su control, así mismo en los modelos de leucocitos Katahdin y Dorper estas fragmentaciones se presentaron con mayor intensidad (Figura 3).

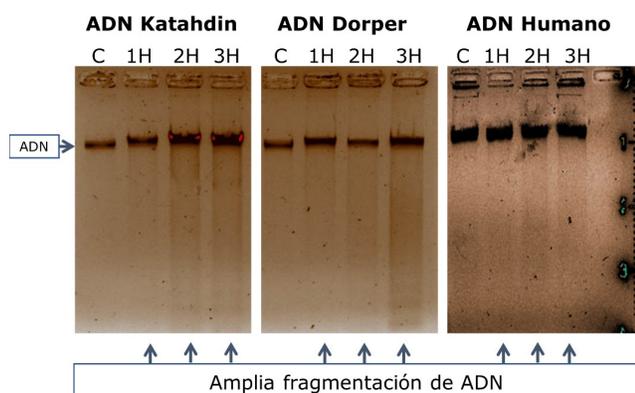


Figura 3. Fragmentación de ADN en leucocitos irradiados con UVA. C: control, 1H: 1 hora, 2H: 2 horas y 3H: 3 horas de exposición.

Evaluación morfológica de leucocitos irradiados con UVA. Al observar una disminución de la viabilidad celular, investigamos si esta caída es debida a una muerte celular vía apoptosis, observándose lo siguiente:

En leucocitos Katahdin control se observaron morfologías normales en el 100% de las células, en una hora de exposición se encontraron cambios morfológicos relacionados con apoptosis como: Fragmentación, condensación nuclear, cuerpos apoptóticos, rupturas de membrana y fragmentación del ADN en el 40% de las células, para dos horas de exposición se encontraron: Cuerpos apoptóticos, fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear en el 70% de las células y para tres horas de exposición se encontró: Cuerpos apoptóticos, fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear en el 100% de las células. En este estudio solo presentamos las alteraciones morfológicas para modelo Katahdin, cuyas anomalías se relacionan con los modelos Dorper y Humano, no así el porcentaje, las cuales son menores en los leucocitos humanos (Figura 4, Figura 5 y Tabla 1).

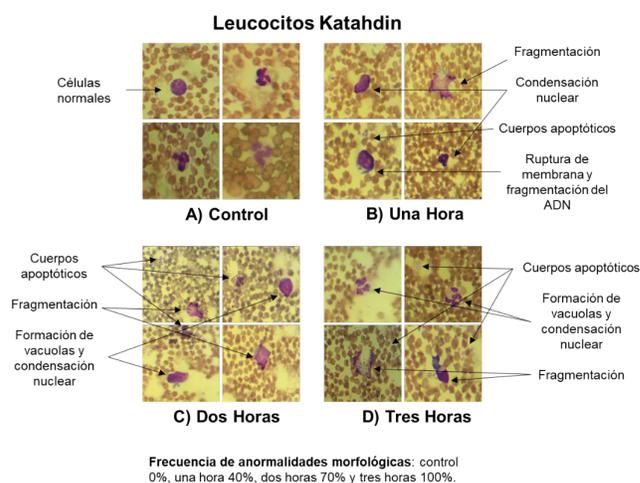


Figura 4. Cambios morfológicos relacionados con apoptosis en leucocitos Katahdin irradiados con UVA. A) Células control, B) Una hora de exposición, C) Dos horas de exposición y D) Tres horas de exposición.

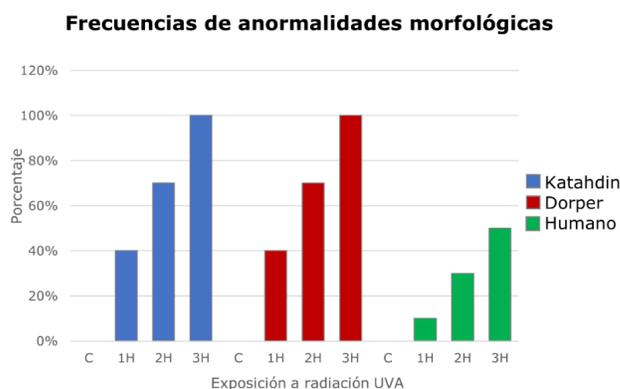
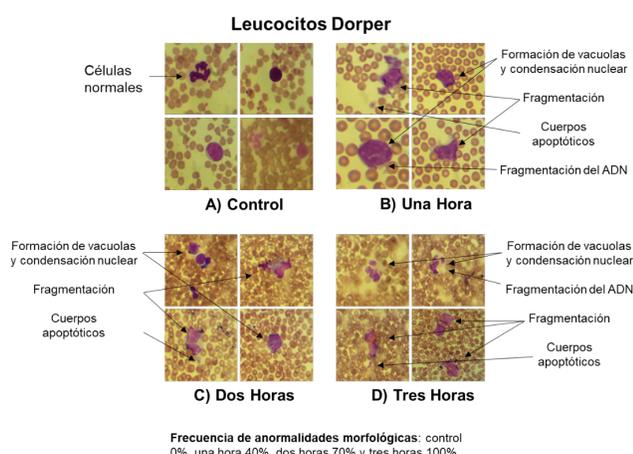


Figura 5. Porcentaje de alteraciones morfológicas relacionadas con apoptosis en leucocitos irradiados con UVA. C: control, 1H: 1 hora, 2H: 2 horas y 3H: 3 horas de exposición.

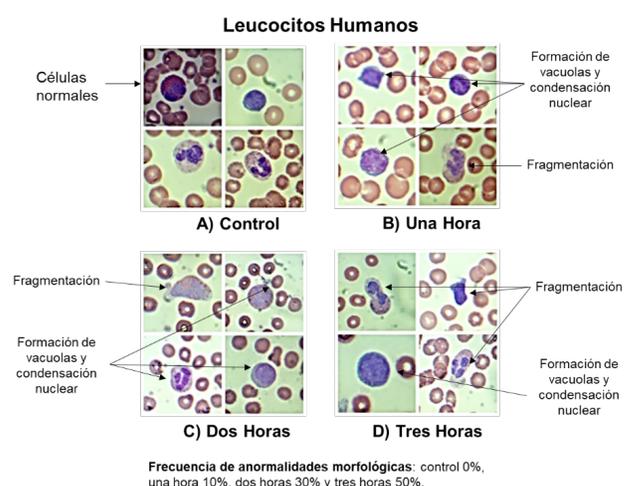
En leucocitos Dorper en el control se observaron morfologías normales en el 100% de las células, en una hora de exposición se encontraron cambios morfológicos relacionados con apoptosis como: Formación de vacuolas, condensación nuclear, fragmentación, cuerpos apoptóticos y fragmentación del ADN en el 40% de las células, en dos horas de exposición se encontraron: Formación de vacuolas, condensación nuclear, fragmentación y cuerpos apoptóticos en el 70% de las células y en tres horas de exposición se encontraron: Formación de vacuolas, fragmentación, condensación nuclear, fragmentación del ADN, y cuerpos apoptóticos en el 100% de las células (Figura 5, Figura 6 y Tabla 1).

Tabla 1. Cambios morfológicos relacionados con apoptosis en leucocitos irradiados con UVA.

Leucocitos	Control	Una hora de irradiación	Dos horas de irradiación	Tres horas de irradiación
Katahdin	Células normales.	Fragmentación, condensación nuclear, cuerpos apoptóticos, ruptura de membrana y fragmentación del ADN.	Cuerpos apoptóticos, fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear.	Cuerpos apoptóticos, formación de vacuolas, condensación nuclear y fragmentación.
Dorper	Células normales.	Fragmentación, formación de vacuolas, condensación nuclear, cuerpos apoptóticos, ruptura de membrana y fragmentación del ADN.	Formación de vacuolas, condensación nuclear, fragmentación, cuerpos apoptóticos.	Formación de vacuolas, condensación nuclear, fragmentación del ADN, fragmentación y cuerpos apoptóticos.
Humanos	Células normales.	Fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear.	Fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear.	Fragmentación, formación de vacuolas y condensación nuclear.

**Figura 6.** Cambios morfológicos relacionados con apoptosis en leucocitos Dorper irradiados con UVA. A) Células control, B) Una hora de exposición, C) Dos horas de exposición y D) Tres horas de exposición.

En leucocitos Humanos en el control se observaron morfologías normales en el 100 % de las células, en una hora de exposición se encontraron cambios morfológicos relacionados con apoptosis como: Formación de vacuolas, condensación nuclear y fragmentación en el 10% de las células, para las dos y tres horas de exposición se encontraron las mismas anomalías, pero con una frecuencia de 30 y 50 % respectivamente (Figura 5, Figura 7 y Tabla 1).

**Figura 7.** Cambios morfológicos relacionados con apoptosis en leucocitos humanos irradiados con UVA. A) Células control, B) Una hora de exposición, C) Dos horas de exposición y D) Tres horas de exposición.

DISCUSIÓN

El propósito del presente estudio fue determinar el daño que provoca la radiación UVA medido a través de la viabilidad celular, el grado de expresión de un bioindicador de estrés como es la proteína Hsp70, degradación del material genético y el proceso de muerte por apoptosis en leucocitos ovinos Katahdin, Dorper y humanos. Esto se basa en estudios que demuestran la alteración de la homeostasis celular provocada por la radiación UVA (1,7,9), sobre todo en leucocitos, ya que la UVA llega hasta la dermis altamente vascularizada (6,7).

Al analizar la viabilidad celular por exposición a radiación UVA, está disminuyó en los tres modelos de estudio, siendo más evidente en los leucocitos ovinos, fenómeno similar reportado por otros autores utilizando distintos modelos animales y vegetales (8,35).

También hay que considerar que los leucocitos ovinos pueden ser más susceptibles a la exposición a radiación ultravioleta *in vitro* respecto a los humanos, ya que en la naturaleza los especímenes ovinos cuentan con barreras naturales como el pelo y la grasa que protegen a las células de este factor ambiental, por lo cual las células al no estar tan expuestas a la radiación UV, estas no generan mecanismos adaptativos para su protección a este factor, y por otro lado, debido a que el humano no cuenta con tal protección, sus células han tenido que adaptarse de mayor manera a la exposición a la radiación UV.

En otro tipo de animales como los bovinos se ha observado que la morfo-fisiología de la piel animal muestra características de adaptación a las condiciones del ambiente del tipo evolutivo. Estudios entre el ganado bovino Cebú (*Bos indicus*) y el Holstein (*Bos taurus*) en relación al calor, muestran que el grosor de la piel no es homogéneo, ni las diferentes estructuras de la piel, lo que explica una mejor adaptación del Cebú a las altas temperaturas, por presentar pelo más corto y grueso, un mayor grosor de la piel con epidermis más delgada, una dermis reticular más profunda, y un mayor volumen de glándulas sudoríparas con implantación dérmica, lo que le confiere una mayor superficie excretora y una densidad glandular incrementada por área. Todo esto permite generar ajustes térmicos a las variables ambientales, para facilitar el incremento o disminución de la pérdida de calor, lo que conlleva a un menor estrés ambiental (10).

Al observar el comportamiento en la expresión de Hsp70 que es un bioindicador de estrés celular (11,36), encontramos un incremento de esta proteína por exposición a radiación UVA a la una y dos horas y una disminución a las tres horas en los modelos Katahdin y humano, mientras que para el modelo Dorper su incremento fue a la hora y una caída a la segunda y tercera hora de exposición. Estos resultados coinciden con otros estudios en diferentes modelos experimentales sometidos a radiación UV como en células epidérmicas (NHK, células A431, NHM y SK30) que mostraron una expresión de Hsp70 alta, con una disminución después de altas dosis de

irradiación con UVA (13); también se observó en corneas de ratón sometidas a radiación UVB una elevación en Hsp70 (15); otro estudio en queratinocitos de ratones transgénicos irradiados con UVB, generó aumento en la expresión de Hsp70 y una disminución en dosis mayores (37); al igual que para embriones de erizo (*Paracentrotus lividus*) expuestos a UVB, los cuales presentaron una elevación en Hsp70 (38).

Es conocido que los efectos que provoca la radiación UV sobre el ADN son diversos y con consecuencias desfavorables a corto, mediano y largo plazo. Para analizar si en los leucocitos la radiación UVA genera daño al ADN después de la irradiación se obtuvo material genético de los leucocitos y se analizó si tenía alguna alteración. Se encontró degradación de ADN en los tres modelos, tal efecto fue más evidente conforme aumentó el periodo de exposición, el mayor daño se observó en leucocitos ovinos, este daño al ADN por UVA coincide con lo reportado por Martínez (39) en 2017, en donde demuestra la existencia de varios mecanismos que dañan al ADN por la exposición a radiación UVA, así también por lo reportado por Sayed (35) en 2018, en donde observó que al irradiar células sanguíneas de *Clarias gariepinus* con radiación UVA, se inducía daño al ADN, el cual se incrementa a dosis mayores de exposición; en contraste Viada-Pupo et al (40), al irradiar leucocitos humanos bajo dosis y tiempos moderados con radiación UV, no encontraron evidencia significativa de daño al ADN, lo cual nos puede indicar que las células tienen cierto umbral a la exposición de radiación ultravioleta que no afecta la integridad del material genético de manera suficiente para ser evaluado, pero al sobrepasar este umbral el ADN comienza a degradarse por los diferentes mecanismos que induce la exposición a este factor ambiental y bajo este esquema los mecanismos moleculares de reparación no funcionan adecuadamente. Tales alteraciones sobre esta molécula están perfectamente descritas como la dimerización de bases púricas o rompimiento directo (9).

De acuerdo con los resultados descritos previamente al tener una caída en la viabilidad celular, una sobreexpresión de un bioindicador de estrés Hsp70 y daño a la molécula del DNA, posiblemente estos factores pudieran conducir a la activación de muerte celular por apoptosis. Por lo que al analizar si durante la irradiación se manifestaban eventos típicos de apoptosis, se encontró tal activación de la apoptosis a partir de la primera hora y fue más evidente conforme

pasó la segunda y tercera hora. Los resultados anteriores coinciden con reportes sobre el fenómeno de apoptosis en células mononucleares de sangre periférica tratadas con radiación UVA por medio de fotoféresis (41); en células Jurkat y leucocitos de ratas expuestas a radiación UVA por fotoféresis (18) y en neutrófilos irradiados con radiación UVB (42).

En conclusión, la radiación UVA generó estrés en leucocitos ovinos y humanos *in vitro*, ya que se observó una caída en la viabilidad celular, alteración en la expresión de Hsp70, daño al

ADN e inducción de apoptosis, siendo el modelo ovino Dorper el más susceptible a este factor.

Conflicto de intereses

Los autores declaramos que no tenemos conflicto de interés.

Financiación

Este proyecto no contó con financiamiento externo y se realizó con recursos aportados por los propios investigadores.

REFERENCIAS

- Rodríguez de la FAO, Heredia RJA, Heredia RO, Castañeda GME, Rodríguez FLE. El Apocalipsis del Ozono: Efectos Biológicos de la Radiación Ultravioleta. *Biología Y Sociedad*. 2018; 1(2), 55-63. <https://doi.org/10.29105/bys1.2-51>
- Saucedo M, Sánchez-Rodríguez SH, Aréchiga-Flores CF, Bañuelos-Valenzuela R, López-Luna MA. Efecto de la radiación ultravioleta (UV) en animales domésticos. Revisión. *Revista Mex Cienci Pecu*. 2019; 10(2):416-432. <https://doi.org/10.22319/rmep.v10i2.4648>
- Hurtado S. Aspectos químicos: La contaminación de la capa de ozono. *Semilla científica: Revista Investigación Formativa*. 2021; 177-182.
- Molina MJ, Rowland FS. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalysed destruction of ozone. *Nature*. 1974; 249(5460):810-812. <https://doi.org/10.1038/249810a0>
- Ballén JB, Mogollón JFP. Radiación ultravioleta. *Ciencia y Tecnología Para La Salud Visual y Ocular*. 2007; 9:97-104. <https://doi.org/10.19052/sv.1520>
- Morales CM, López-Nevot MA. Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel. *Oncología*. 2006; 29:25-32. <https://doi.org/10.4321/S0378-48352006000700003>
- González-Púmariega M, Tamayo MV, Sánchez-Lamar Á. La radiación ultravioleta. su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Ultraviolet radiation and its incidence in the human health*. *Theoria*. 2009; 18(2):69-80. <https://www.ubiobio.cl/miweb/webfile/media/194/v/v18-2/06.pdf>
- Carrasco-Ríos L. Efecto de la radiación ultravioleta-b en plantas. *Idesia (arica)*. 2009; 27(3):59-76. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292009000300009>
- Cadet J, Douki T, Ravanat JL, Di Mascio P. 2009 Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2009; 8(7):903-911. <https://doi.org/10.1039/b905343n>
- Olarte-Saucedo M, García-López DA, Ortiz-Letechipia J, Palafox-Herrera A, Reveles-Hernández RG, López-Luna MA, et al. DNA fragmentation and changes in the expression of Hsp70, Hsp90 and P53 proteins in the skin of BALB/c mice exposed to ultraviolet UV light (UVA, UVB, UVC). *Dermatol Rev Mex*. 2020; 64(3):255-269. <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/fragmentacion-de-adn-y-cambios-en-la-expresion-de-las-proteinas-hsp70-hsp90-y-p53-en-la-piel-de-ratones-balb-c-expuestos-a-luz-ultravioleta-uv-uva-uvb-uvc/>

11. Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013; 38(10):507-514. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.08.001>
12. Sarkar S, Roy S. A mini review on heat shock proteins (Hsps): special emphasis on heat shock protein70 (HSP70) BN Seal Journal of Science. 2017; 9(1):130-139.
13. Roh BH, Kim DH, Cho MK, Park YL, Whang KU. Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Annals Dermatology*. 2008; 20(4):184-189. <https://doi.org/10.5021/ad.2008.20.4.184>
14. Simon MM, Reikerstorfer A, Schwarz A, Krone C, Luger TA, Jäättelä M, et al. Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest*. 1995; 95(3):926-933. <https://doi.org/10.1172/JCI117800>
15. Lennikov A, Kitaichi N, Kase S, Noda K, Horie Y, Nakai A, et al. Induction of heat shock protein 70 ameliorates ultraviolet-induced photokeratitis in mice. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(1):2175-2189. <https://doi.org/10.3390/ijms14012175>
16. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumor Biology*. 2010; 31(4):363-372. <https://doi.org/10.1007/s13277-010-0042-8>
17. Shidham VB, Swami VK. Evaluation of Apoptotic Leukocytes in Peripheral Blood Smears. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(9):1291-1294. <https://doi.org/10.5858/2000-124-1291-EOALIP>
18. Wolnicka-Głubisz A, Rijnkels JM, Sarna T, Beijersbergen van Henegouwen GMJ. Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4,6,4'-trimethylangelicin. *J Photochem Photobiol B*. 2002; 68(2):65-72. [https://doi.org/10.1016/s1011-1344\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/s1011-1344(02)00332-9)
19. Kessel D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem Photobiol*. 2019; 95(1):119-125. <https://doi.org/10.1111/php.12952>
20. Brengues M, Lapiere A, Bourgier C, Pèlerin A, Özsahin M, Azria D. T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017; 17(2):119-127. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1271715>
21. Lumniczky K, Candéias SM, Gaipf US, Frey B. Radiation and the Immune System: Current Knowledge and Future Perspectives. *Front Immunol*. 2018; 8:1933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01933>
22. Alvarez Fontanet E. Consecuencias del estrés oxidativo de la piel por radiaciones ultravioleta. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 1995; 14:0-10. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001995000100004
23. Aubin F. Efectos inmunológicos de las radiaciones ultravioletas y sus implicaciones en dermatología. *EMC-Dermatología*. 2012; 46(2):1-11. [https://doi.org/10.1016/S1761-2896\(12\)61893-7](https://doi.org/10.1016/S1761-2896(12)61893-7)
24. OCDE/FAO. OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2017-2026. OCDE, París.: OCDE; 2017. <https://www.fao.org/3/i7465s/i7465s.pdf>
25. INEGI. Encuesta Nacional Agropecuaria 2017. INEGI: México; 2017. <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2017/>
26. Chairez FGE, Gutiérrez-Luna R, Ledesma-Rivera RI, Bañuelos-Valenzuela R, Aguilera-Soto JI, Serna-Pérez A. Influencia del sistema de pastoreo con pequeños rumiantes en un agostadero del semiárido Zacatecano. I Vegetación nativa. *Téc Pecu Méx*. 2006; 44(2):203-217. <https://www.redalyc.org/pdf/613/61344206.pdf>
27. Castanedo-Cázares JP, Torres-Álvarez B, Portales-González B, Martínez-Rosales K, Hernández Blanco D. Análisis de la radiación solar ultravioleta acumulada en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2016; 54(1):26-31. <https://www.redalyc.org/pdf/4577/457745148005.pdf>
28. Quiñonez-Choquecota J. Investigación experimental de un calentador solar de aire de doble flujo de convección natural de alta eficiencia. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 2019; 21:274-282. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.504>

29. Salazar G, Suarez H, Acosta D, Cadena C, Adamo J, Castillo J, *et al.* Medición de radiación eritemica en sitios de altura de la provincia de salta. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente-AVERMA.* 2013; 17:119-127. [http://asades.org.ar/revistaaverma/Medicion%20de%20radiacion%20eritemica%20en%20sitios%20de%20altura%20de%20la%20provincia%20de%20salta.%20Suarez%20H.%20Salazar%20\[2013%20-%20Tema-%2011\].pdf](http://asades.org.ar/revistaaverma/Medicion%20de%20radiacion%20eritemica%20en%20sitios%20de%20altura%20de%20la%20provincia%20de%20salta.%20Suarez%20H.%20Salazar%20[2013%20-%20Tema-%2011].pdf)
30. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72(1):248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
32. He F. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol.* 2011; e80-e80. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.80>
33. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(9):4350-4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>
34. Cornejo A, Serrato B, Rendón MG. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Primera ed. Mexico: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat); 2014.
35. Sayed AE-DH. UVA-Induced DNA Damage and Apoptosis in Red Blood Cells of the African Catfish *Clarias gariepinus*. *Photochemistry and Photobiology.* 2018; 94(1):158-164. <https://doi.org/10.1111/php.12818>
36. Multhoff G, Pockley AG, Schmid TE, Schilling D. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Letters.* 2015; 368(2):179-184. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.013>
37. Matsuda M, Hoshino T, Yamashita Y, Tanaka K-i, Maji D, Sato K, *et al.* Prevention of UVB radiation-induced epidermal damage by expression of heat shock protein 70. *J Biol Chem.* 2010; 285(8):5848-5858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063453>
38. Bonaventura R, Poma V, Russo R, Zito F, Matranga V. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology.* 2006; 149(1):79-86. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0213-0>
39. Martinez-Fernandez L, Banyasz A, Esposito L, Markovitsi D, Improta R. UV-induced damage to DNA: effect of cytosine methylation on pyrimidine dimerization. *Signal Transduct Target Therapy.* 2017; 2(1):1-7. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.21>
40. Viada-Pupo E, Gómez-Robles L, Campaña-Marrero IR. Estrés oxidativo. *Correo Científico Médico.* 2017; 21(1):171-186. <http://scielo.sld.cu/pdf/ccm/v21n1/ccm14117.pdf>
41. Yoo E, Rook A, Elenitsas R, Gasparro F, Vowels B. Apoptosis Induction by Ultraviolet Light A and Photochemotherapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Relevance to Mechanism of Therapeutic Action. *Journal of Investigative Dermatology.* 1996; 107(2):235-242. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12329711>
42. Grbatinić I, Milošević NT. Incipient UV-Induced Structural Changes in Neutrophil Granulocytes: Morphometric and Texture Analysis of Two-Dimensional Digital Images. *Microscopy and Microanalysis,* 2016; 22(2):387-393. <https://doi.org/10.1017/S1431927616000532>