

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE  
ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES  
(SCGE) PARA EVALUAR ALTERACIONES EN EL ADN  
DEL OSTIÓN JAPONÉS *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873).**

## **T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en: Biología Marina)

p r e s e n t a

**María Guadalupe Carrisoza Valenzuela**

La Paz, B. C. S. Marzo de 2006

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 17 del Mes de Enero del 2005, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Estandarización de la técnica de electroforesis en gel de células individuales (SCGE) para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873)"**

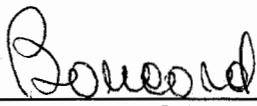
Presentada por el alumno:

**María Guadalupe Carrisoza Valenzuela**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

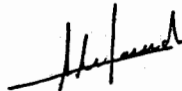
LA COMISION REVISORA



Dra. Celia Vazquez Boucard  
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Mahara Angelica Valverde Ramirez  
CO-TUTOR



Dra. Silvia Alejandra Garcia Gasca  
CO-TUTOR



DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR

### **Dra. Celia Vazquez Boucard (Director)**

Programa de Planeación Ambiental y Conservación  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C (CIBNOR)  
La Paz, B. C. S., México.

### **Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez (Tutor)**

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Autónoma de México (UNAM)  
México, D. F.

### **Dra. Silvia Alejandra García Gasca (Tutor)**

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD)  
Unidad Mazatlán en Acuacultura y Manejo Ambiental  
Mazatlán, Sinaloa, México.

## COMITÉ SINODAL

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| Dra. Celia Vazquez Boucard            | Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste          |
| Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez | Universidad Autónoma de México                             |
| Dra. Silvia Alejandra García Gasca    | Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. |
| Dr. C. Humberto Mejía R. (Suplente)   | Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste          |

## RESUMEN

El incremento en la contaminación ambiental a hecho necesario el desarrollo de nuevas metodologías que permitan evaluar su impacto sobre los seres vivos. La técnica de electroforesis en gel de células individuales (SCGE) representa una excelente alternativa en la detección de daño en el material genético. Las principales ventajas de este método son su sensibilidad, rapidez y bajo costo.

En genotoxicología de mamíferos las guías para el uso de la SCGE han sido definidas, mientras que en el caso de invertebrados marinos los protocolos no han sido bien estandarizados. La principal dificultad al utilizar esta metodología en trabajos ambientales es la comparación de los resultados entre diferentes grupos de investigación, es por ello que la estandarización de la técnica SCGE es necesaria para poder establecer un biomarcador estándar en ambientes marinos.

*Crassostrea gigas* es una especie de gran importancia comercial y gracias a sus características sésiles y filtradoras puede ser utilizada como un organismo centinela o bioindicador de la calidad ambiental. Al ser *C. gigas* muy estudiada, su empleo en la determinación de un biomarcador de daño genotóxico permitirá interpretar desde varios aspectos su comportamiento o respuesta ante determinados estímulos ambientales.

El principal objetivo del presente trabajo fue la estandarización de la técnica SCGE para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *Crassostrea gigas*. Para cumplir con los objetivos propuestos se probó la viabilidad celular y genotoxicidad en varios procedimientos en 4 tejidos (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia). En este sentido, uno de los primeros logros fue determinar a la hemolinfa como el tejido mas representativo del daño presente en el organismo para lo cual se recurrió al uso de un inductor de rompimientos de cadena sencilla del ADN. Así mismo se realizaron diferentes análisis comparando el daño ocasionado en los tejidos de interés y tratamientos y condiciones metodológicas, estableciéndose su validez estadística a través de las pruebas ANOVA y Tukey.

La estandarización de la técnica de electroforesis en gel de células individuales en *C. gigas* permitirá el desarrollo de futuros estudios para la evaluación de la calidad ambiental en el Golfo de California.

**Palabras clave:** biomarcador, SCGE, genotoxicidad, bioindicador, *Crassostrea gigas*, calidad ambiental.

Vo. Bo.

---

Dra. Celia Vazquez Boucard  
Directora de Tesis

## ABSTRACT

The increase of the environmental pollution, makes necessary the development new methodologies to evaluate its impact on the living organisms. The Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) assay represents an excellent alternative for the detection of DNA-damage in different organisms. The main advantages of this method are its sensitivity, rapidity and low cost.

In genotoxicology of mammals the guidelines for the use of the SCGE have been defined, whereas in the case of marine invertebrates the protocols are not standardized. The main difficulty using this approach in environmental works is the comparison of results between different research laboratories, for this reason the standardization of this assay is necessary in order to establish a standard biomarker for the marine environment.

*Crassostrea gigas* is a species of great commercial importance and as they are sessile and filter-feeders can be used like an organism sentry or bioindicator of environmental quality. *C. gigas* has been extensively studied and its use as biomarker of genotoxic damage will allow understand the effects of certain environmental stimuli.

The main objective of the present work was the standardization of SCGE assay to evaluate alterations in DNA of the japanese oyster *Crassostrea gigas*. The cellular viability and genotoxicity was evaluated under several procedures, in four tissues (hemolymph, digestive gland, mantle and gill). One of the main results was to determination of hemolymph as the representative tissue of the damage in the organism, for this motive we employed an inducer of DNA single strand breaks. Different analyses were performed comparing the damage on the four tissues, treatments and methodologic conditions, settling down their statistical validity through the ANOVA and Tukey tests.

Standardization of SCGE assay in *C. gigas* will allow future studies for the evaluation of the environmental quality in the Gulf of California.

**Key words:** biomarker, SCGE, genotoxicity, bioindicator, *Crassostrea gigas*, environmental quality.

*¿Qué sabe el pez del agua en que nada toda su vida?*

*Albert Einstein*

**DEDICATORIA**

*No existe distancia que nos separe siempre están en mi corazón.*

*Con todo mi amor:*

*A la memoria de mi abuelita*

*Ramona Jiménez de Carrisoza Q. E. P. D.*

*A mis padres*

*Álvaro Carrisoza Jiménez y Balvaneda Valenzuela Félix*

*A mis hermanos*

*Jesús Álvaro Carrisoza Valenzuela y José Noé Carrisoza Valenzuela*

*A mi novio*

*Ramiro Ruiz Alvarado*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, SC.

A la Dirección de estudios de posgrado a cargo de la Dra. Thelma R. Castellanos, por el apoyo otorgado para la culminación de este trabajo. A la Lic. Osvelia Ibarra (Control escolar), Lic. Leticia González (Depto. de becas y apoyo estudiantil).

A mi comité tutorial: Dra. Celia Vazquez Boucard, Dra. Silvia Alejandra García Gasca y la Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez por abrirme las puertas del apasionante mundo de la Genotoxicología, por su dirección académica, por su paciencia, sencillez, y sus consejos.

Al laboratorio de Toxicología Genómica del Centro de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la UNAM, a cargo del Dr. Emilio Rojas del Castillo.

A Arturo Sierra responsable del área de Patología Marina por su apoyo en la asignación del área para la realización de la técnica SCGE.

A la MC Carmen Rodríguez, por apoyarnos en la realización del presente trabajo.

A mis compañeros: MC Alfonso Anguiano (El Ponchito) y a Raúl Llera, porque juntos sacamos adelante este proyecto.

A la MC Itzel Sifuentes por donarnos su sangre para la realización de los controles internos.

Al Dr. Amaury Cordero por apoyarnos en la extracción de sangre.

Al personal a cargo del laboratorio de computo Horacio Sandoval y Manuel Melero.

Al personal responsable de la biblioteca Ana Maria Talamantes y Tony Díaz.

Al Dr. Humberto Mejía por sus palabras de aliento siempre que las necesité.

A mis amigos y compañeros del posgrado: especialmente a Wenses, Mony, Rosario, Erika, María, Tony, Gaby, Horacio, Luís, Alex, Polo, Camilo, Carlos, Minda, Alejandro. Nadia, Albert, Aline, Annie, Yumi, Martita, Cristian, Gustavo y Karina.

A mis padres y hermanos por ser mi inspiración y mi principal motivo de superación, por su apoyo, por su confianza y su amor incondicional.

A Ramiro, por amarme, por cuidarme, por compartir conmigo este sueño, y porque además de ser mi novio en ti he encontrado a un verdadero amigo.



## ÍNDICE

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>iii</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>iv</b>     |
| <b>DEDICATORIA</b> .....  | <b>vi</b>     |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | <b>vii</b>    |
| <b>ÍNDICE</b> .....   | <b>viii</b>   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                                       | <b>x</b>      |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....  | <b>xii</b>    |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                                  | <b>xiv</b>    |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>      |
| <b>II. ANTECEDENTES</b> .....                                       | <b>4</b>      |
| 2.1. Ecotoxicología.....  | 4             |
| 2.2 Sistemática y características generales del ostión japonés..... | 7             |
| 2.3. Bioacumulación y biomagnificación.....                         | 8             |
| 2.4. Metabolismo de xenobióticos.....                               | 10            |
| 2.5. Toxicología genética.....                                      | 11            |
| 2.6. Electroforesis en gel de una sola célula.....                  | 13            |
| 2.6.1. Fundamento.....  | 13            |
| 2.6.2. Historia.....  | 13            |
| <b>III. OBJETIVOS</b> .....   | <b>19</b>     |
| 3.1. Objetivo general.....  | 19            |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                     | 19            |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b> .....  | <b>20</b>     |
| <b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                                | <b>21</b>     |
| 5.1. Metodología y diseño experimental.....                         | 21            |
| 5.1.1. Experimento I.....   | 23            |
| 5.1.1.1. Control interno (linfocitos humanos).....                  | 24            |
| 5.1.2. Experimento II.....  | 26            |
| 5.1.3. Experimento III.....   | 27            |
| <b>VI. RESULTADOS</b> .....   | <b>28</b>     |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.1. Experimento I.....                             | 28        |
| 6.1.1. Control interno (linfocitos humanos).....    | 34        |
| 6.2. Experimento II.....                            | 37        |
| 6.3. Experimento III.....                           | 49        |
| 6.4. Comparación entre el experimento II y III..... | 57        |
| <b>VII. DISCUSIONES.....</b>                        | <b>59</b> |
| 7.1. Experimento I.....                             | 64        |
| 7.1.1. Control interno (linfocitos humanos).....    | 68        |
| 7.2. Experimento II.....                            | 69        |
| 7.3. Experimento III.....                           | 70        |
| 7.4. Comparación entre el experimento II y III..... | 75        |
| <b>VIII CONCLUSIONES.....</b>                       | <b>76</b> |
| <b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>                   | <b>77</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| <b>Figura 1.</b> Categorización de los diferentes niveles de daño del ADN en hemocitos de <i>Uca princeps</i> mediante la técnica SCGE y tinción con plata.....   | 22            |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de la metodología seguida en el experimento I.....   | 23            |
| <b>Figura 3.</b> Metodología seguida para la obtención del control interno: linfocitos humanos.....   | 24            |
| <b>Figura 4.</b> Metodología seguida en el experimento II.....  | 26            |
| <b>Figura 5.</b> Metodología seguida en el experimento III.....   | 27            |
| <b>Figura 6.</b> Porcentaje de viabilidad celular determinado por el método de tinción dual CFDA- Et Br, en los tejidos de glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos.....   | 28            |
| <b>Figura 7.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos de <i>C. gigas</i> (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Con centrifugación.....                           | 33            |
| <b>Figura 8.</b> Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 4 organismos en 3 tejidos (glándula digestiva, manto y branquia) de <i>C. gigas</i> .....  | 34            |
| <b>Figura 9.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN, del control interno de corrida de electroforesis: linfocitos humanos (L) tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrida..... | 36            |
| <b>Figura 10.</b> Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) del control interno de corrida de electroforesis: linfocitos humanos (L) tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrida.....              | 36            |
| <b>Figura 11.</b> Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos de <i>C. gigas</i> . Sin centrifugación.....  | 38            |
| <b>Figura 12.</b> Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos de <i>C. gigas</i> tratados con peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación...           | 38            |
| <b>Figura 13.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4   |               |

|  |    |
|--|----|
| organismos de <i>C. gigas</i> (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación.....   | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos de <i>C. gigas</i> tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación..... | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Comparación del daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 4 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B) de <i>C. gigas</i> y los tratados con peróxido de hidrógeno.....  | 48 |
| <b>Figura 16.</b> Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos de <i>C. gigas</i> y los tratados con peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación.....  | 49 |
| <b>Figura 17.</b> Porcentajes de viabilidad celular (tinción Azul tripano) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos <i>C. gigas</i> y los tejidos tratados de peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación.....   | 50 |
| <b>Figura 18.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos de <i>C. gigas</i> (3 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación.....   | 55 |
| <b>Figura 19.</b> Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente de 3 organismos de <i>C. gigas</i> (3 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación..... | 55 |
| <b>Figura 20.</b> Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 3 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B) 3 laminillas/tejido de <i>C. gigas</i> .....  | 56 |
| <b>Figura 21.</b> Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 3 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B, 3 laminillas/tejido tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente) de <i>C. gigas</i> .....   | 56 |
| <b>Figura 22.</b> Comparación del daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) del experimento II y III.....   | 57 |
| <b>Figura 23.</b> Imagen de la categorización de los diferentes niveles de daño del ADN en células de <i>C. gigas</i> mediante la técnica SCGE tinción con bromuro de etidio.....  | 58 |

## LISTA DE TABLAS

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| <b>Tabla I.</b> Análisis de genotoxicidad mediante la técnica SCGE en tejidos de organismos marinos y acuáticos expuestos a diversos contaminantes.....  | 16            |
| <b>Tabla II.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de glándula digestiva (GD), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....  | 30            |
| <b>Tabla III.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de manto (M), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....   | 31            |
| <b>Tabla IV.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de branquia (B), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....   | 32            |
| <b>Tabla V.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del control interno de corrida de electroforesis (linfocitos humanos (L) tratados con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrida)..... | 35            |
| <b>Tabla VI.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....  | 39            |
| <b>Tabla VII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....  | 40            |
| <b>Tabla VIII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....  | 41            |
| <b>Tabla IX.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula (GD) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....   | 42            |
| .....  |               |
| <b>Tabla X.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....   | 43            |
| <b>Tabla XI.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....   | 44            |
| <b>Tabla XII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....  | 45            |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla XIII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.....            | 46 |
| <b>Tabla XIV.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....   | 51 |
| <b>Tabla XV.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....             | 51 |
| <b>Tabla XVI.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....   | 52 |
| <b>Tabla XVII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo..... | 52 |
| <b>Tabla XVIII.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....   | 53 |
| <b>Tabla XIX.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....                | 53 |
| <b>Tabla XX.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....   | 54 |
| <b>Tabla XXI.</b> Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B) tratado con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.....             | 54 |

**LISTA DE ABREVIATURAS**

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>ADN</b>        | Ácido desoxirribonucleico              |
| <b>Com. Pers.</b> | Comunicación personal                  |
| <b>° C</b>        | Grados Celsius                         |
| <b>et al.</b>     | y colaboradores (abreviación en latín) |
| <b>h</b>          | hora                                   |
| <b>mA</b>         | Miliamperios                           |
| <b>mg</b>         | Miligramo (s)                          |
| <b>µL</b>         | Microlitro (s)                         |
| <b>µM</b>         | Concentración micromolar               |
| <b>min</b>        | Minutos (s)                            |
| <b>mL</b>         | Mililitro (s)                          |
| <b>mM</b>         | Concentración milimolar                |
| <b>nm</b>         | Nanómetro (s)                          |
| <b>PCBs</b>       | Bifenilos policlorados                 |
| <b>pH</b>         | Potencial de hidrógeno                 |
| <b>PHAs</b>       | Hidrocarburos aromáticos policíclicos  |
| <b>V</b>          | Voltios                                |

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación de los sistemas costeros, es causada principalmente, por la poca planeación, mal manejo y falta de control de los desechos producidos por las distintas actividades antropogénicas (agrícola, ganadera, industrial y doméstica). Estos contaminantes llegan al medio marino, acarreados por las aguas de superficie y vientos. La capacidad de las zonas costeras para dispersar o asimilar estos contaminantes es limitada, pudiendo impactar de manera importante en los ecosistemas marinos (Schiewe 1991, Forget 1998) y en la salud humana (Svensson, 1994, Waliszewski, 2000).

Muchos de los agentes tóxicos (plaguicidas, PCBs, PHAs, radicales libres, agentes intercalantes, metales pesados, etc.), poseen la capacidad de interactuar con la molécula de ADN y/o con otras moléculas que desempeñan funciones vitales en los seres vivos, alterando su equilibrio. Es bien conocido que la exposición a sustancias tóxicas puede traer severas consecuencias a nivel celular como rompimientos de cadena sencilla y/o doble en el ADN. Estos rompimientos son lesiones potencialmente pre-mutagénicas. (Kammann et al, 2000). En condiciones normales, estas alteraciones pueden ser reparadas por mecanismos celulares complejos, altamente conservados filogenéticamente. Si estos no funcionan correctamente, la alteración será conservada en el material genético de las células ocasionando mutación y pudiendo provocar enfermedades como el cáncer.

Ante esta problemática y debido a que la evaluación de contaminantes químicos en el medio marino es extremadamente difícil y costosa de efectuar (Thomas et al, 2001), en función de su diversidad, variación espacial y temporal, se ha recurrido a la utilización de



bioindicadores y biomarcadores de alteración ambiental. Una de las aplicaciones de un biomarcador es la medición de alteraciones sobre la molécula del ADN. Los métodos convencionales para evaluar genotoxicidad, término empleado para definir los efectos adversos sobre el material genético (ADN), incluyen aberración cromosomal, ensayo de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas (Hodgson and Levi, 1987). La técnica de electroforesis en gel de células individuales (SCGE, por sus siglas en inglés) representa una excelente alternativa en la detección de daño en el ADN, así como en estudios de reparación *in vivo* e *in vitro* en células eucariotas y algunas procariotas. Entre las principales ventajas de esta técnica puede mencionarse que es relativamente rápida, no invasiva, es sensible, y de bajo costo comparada con las técnicas antes mencionadas (Comet Assay Forum, 2003, Rojas et al, 1999), permitiendo la detección de un mayor espectro de daños al ADN (Hartman et al, 2003).

*Crassostrea gigas* es una especie que posee importancia comercial a nivel mundial y gracias a sus características sésiles y filtradoras, este organismo acumula los contaminantes presentes en el medio, actuando como un centinela o bioindicador de la calidad ambiental (Mitchelmore et al, 1998, Solé et al 1996, Livingstone et al, 1996). En México *C. gigas* fue introducida en 1973 y en la actualidad es ampliamente cultivada en los estados de Sonora, Sinaloa, Baja California y Baja California Sur (Corral Palomares, 2003).

El propósito del presente trabajo es la estandarización de la técnica SCGE para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *Crassostrea gigas*. Durante este estudio se comparó la sensibilidad, confiabilidad y eficacia de 4 diferentes tejidos (hemolinfa,

glándula digestiva, manto y branquia), utilizando un tratamiento con  $H_2O_2$  como agente estresor. La estandarización de la técnica SCGE en *C. gigas* permitirá el desarrollo de futuros estudios para la evaluación de la calidad ambiental en el Golfo de California.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Ecotoxicología

La ecotoxicología es una rama de la toxicología, conocida también por toxicología del medio ambiente o toxicología ambiental. El término ecotoxicología fue utilizado por primera vez por Truhaut en 1969, a partir de entonces muchas definiciones han sido propuestas por diversos autores. El Comité Científico en Problemas del Ambiente (SCOPE, por sus siglas en inglés) (Butler, 1978) la define como la disciplina que estudia los efectos tóxicos de agentes físicos y químicos sobre organismos vivos, sus vías de transferencia y sus interacciones con el ambiente.

Aunque es una disciplina relativamente moderna, ha adquirido en los últimos años una gran importancia. Las conclusiones de sus estudios suelen tener, en general, un gran impacto en la sociedad y son la base para el establecimiento de leyes específicas en materia ambiental. Esto ha motivado el desarrollo de numerosas metodologías que permiten un adecuado monitoreo ambiental, dentro de estas puede mencionarse la utilización de biomarcadores y bioindicadores. En el caso de los biomarcadores, su empleo se basa en el estudio de fluidos corporales, células o tejidos para indicar en términos moleculares, bioquímicos, morfológicos o biológicos la presencia y magnitud de la exposición a determinado tóxico a través de la respuesta del organismo receptor o bioindicador (SETAC, 1998; Schlenk, 1999). Los biomarcadores se clasifican en:

- Biomarcadores de exposición: aquellos que indican si la exposición a un tóxico ha tenido lugar y en qué grado. Ejemplos:

- Inducción de sistemas de desintoxicación (sistema de oxidasas de función mixta (MFO) como la enzima citocromo P4501A (CYP1A) y metalotioneinas, como indicadores específicos de contaminantes orgánicos y metales respectivamente (Livingstone, 1993), enzimas protectoras frente a radicales libres, etc.).
- Inhibición de enzimas o rutas enzimáticas específicas (síntesis del grupo hemo, acetilcolinesterasas,
- Biomarcadores de respuesta o efecto: cambio de importancia toxicológica real o potencial aparecido como consecuencia de la exposición a un tóxico. Idealmente debería detectar posibles efectos adversos antes de que estos sean irreversibles.

Ejemplos:

- Función del sistema inmunitario.
- Morfología y función de tejidos, órganos o sistemas (cambios histopatológicos, alteraciones fisiológicas)
- Daño genético (daño cromosómico, mutaciones) (Everaarts, 1994).
- Biomarcadores de susceptibilidad: son todos aquellos que indican si un organismo o individuo puede ser más o menos susceptible a los efectos adversos resultantes de la exposición a un determinado tóxico. Ejemplo: diversos polimorfismos (Repetto, 1997).

En cuanto a los bioindicadores u organismos centinela, son de gran utilidad para advertir a tiempo una situación potencial de peligro. Las especies centinelas sirven para demostrar la

presencia de contaminantes en el medio en el que viven y el grado de exposición. Pueden ser peces, reptiles, aves, mamíferos, plantas, invertebrados e incluso microorganismos.

Los bioindicadores, así como los biomarcadores son instrumentos esenciales de trabajo en la realización de evaluaciones de monitoreo ambiental, ya que como anteriormente se menciona pueden ser evaluados dentro de toda la gama de organismos vivos. Sin embargo, para que una especie sea apta para la realización de un estudio debe cumplir con ciertas características como lo son: que sea representativa de los diferentes niveles de la cadena trófica, de amplia distribución geográfica y/o local, con importancia ecológica y/o comercial, de fácil manejo tanto en campo como en laboratorio, con un ciclo de vida relativamente corto y de movilidad limitada (Esclápes, 1999). Es conveniente aclarar, que lo ideal es utilizar diferentes bioindicadores en función del o los contaminantes que se deseen evaluar; ya que cada especie reacciona de forma particular ante determinado xenobiótico.

Entre las especies que reúnen estas características se encuentran los moluscos bivalvos, ya que para obtener su alimento filtran grandes cantidades de agua, pudiendo alcanzar a filtrar hasta 20 litros de agua en una hora. Como consecuencia de este flujo, retienen todo tipo de partículas sólidas, muchas de las cuales son flóculos sedimentarios que pueden transportar cualquier cantidad de sustancias tóxicas, bioacumulándolas en su organismo. Una desventaja es su metabolismo poco eficiente, lo que dificulta medir la actividad de enzimas como las CYP450 (García-Gasca com. pers.). En contraste, una de sus mayores ventajas con respecto a otras especies es su nula o escasa movilidad, siendo en su mayoría

organismos sesiles. Lo que los convierte en muy buenos candidatos para su utilización en estudios de monitoreo ambiental. Este es el caso del ostión japonés *Crassostrea gigas*, de cual en el siguiente objetivo se hace una breve descripción.

## **2.2. Sistemática y características generales del ostión japonés**

**Phylum:** mollusca

**Clase:** bivalvia

**Orden:** Pterioidea

**Suborden:** ostreina

**Familia:** Ostreidae

**Genero:** Crassostrea

**Especie:** gigas

El ostión japonés, u ostra del pacifico *C. gigas* (Thunberg, 1873); es una especie nativa de Japón que se ha adaptado ampliamente en diferentes países del mundo, donde por lo general ha sido sometida a procesos de cultivo, por lo que actualmente *C. gigas* es considerada una especie cosmopolita (Corral Palomares, 2003). En México el ostión japonés se introdujo en 1973, y a la fecha la tecnología utilizada para su cultivo se encuentra a la vanguardia en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sinaloa y Sonora, entidades donde la tendencia en su desarrollo muestra un marcado avance.

Pasando a los aspectos y características biológicas de esta especie, se conoce que bajo condiciones naturales, los ostiones se distribuyen en aguas someras limitados verticalmente por la disponibilidad de alimento. Estos organismos son típicos de esteros, desembocaduras

de ríos y lagunas costeras, etc., donde la concentración de materia orgánica en el agua es alta. Son organismos bentónicos y se encuentran fijos a sustratos sólidos y duros tales como rocas o sobre las raíces de la vegetación circundante como el mangle (Rodríguez-Navarro et al. 1994). Su dieta es micrófaga (fitoplanctófaga) (Ahmed, 1975; Lara-Lara et al. 1980). Para obtener su alimento hacen pasar el agua a través de sus branquias, reteniendo la materia orgánica en su sistema digestivo (Farias y Uriarte, 2002).

### **2.3. Bioacumulación y biomagnificación.**

En la realización de estudios de monitoreo ambiental, es especialmente importante comprender la estructura de las redes tróficas, los procesos de transferencia de contaminantes entre compartimentos y las transformaciones de estos. Los niveles de contaminantes se incrementan en general conforme aumenta el nivel trófico, a pesar de que son los niveles inferiores (productores, detritívoros, herbívoros) los que interactúan directamente con estos. Para entender esto debe tomarse en consideración los siguientes factores:

Los contaminantes bioacumulables son compuestos químicamente hidrófobos. Esta característica hace que, una vez ingeridos, su eliminación metabólica sea muy lenta y difícil; tendiendo a acumularse en órganos de almacenamiento como aquellos constituidos por tejidos grasos.

La capacidad de desintoxicación metabólica es variable en diferentes organismos, y esto hace que su potencial de bioacumulación sea distinto. La desintoxicación constituye un proceso metabólico, por el cual un organismo transforma las moléculas contaminantes en nuevos compuestos para ser metabolizados o eliminados (biotransformación). En el caso de

los moluscos bivalvos presentan una escasa capacidad de desintoxicación y por tanto un elevado potencial de bioacumulación (Bayne, 1976; Gardner, 1991). Por el contrario los peces, cuentan con la maquinaria metabólica necesaria para el proceso de desintoxicación y por lo tanto el potencial de bioacumulación es mucho más bajo. Sin embargo, es este proceso de desintoxicación el que puede generar consecuencias tóxicas para el organismo, de modo que son los compuestos resultantes de la metabolización de las moléculas originales las que llegan a producir efectos tóxicos a nivel fisiológico y/o genético. Algo similar ocurre en los humanos, especie que cuenta con una alta capacidad de desintoxicación.

La capacidad de desintoxicación no solo es variable a nivel interespecífico, sino a nivel intraespecífico, e incluso individual. En este sentido, estudios realizados en laboratorio demuestran que la capacidad de desintoxicación para un mismo organismo varía con diversos factores, como el número de compuestos tóxicos que coinciden simultáneamente en el organismo, o su concentración en el ambiente.

La duración del ciclo de vida es determinante en el potencial de bioacumulación, dado que a mayor esperanza de vida, mayor es la exposición a contaminantes a través de la dieta. Es entonces que tiene lugar la biomagnificación, proceso mediante el cual el organismo en el nivel más alto de la red trófica adquiere mayores concentraciones de contaminantes (Pastor Benito, 2002).

En el caso de los ecosistemas marinos, la red trófica de un área geográfica determinada presenta una estructura basada en dos grandes compartimentos conectados parcialmente entre sí. El sistema pelágico, constituido por todos los organismos y materia orgánica localizados en la columna de agua, el cual depende directamente de la producción primaria



generada a nivel planctónico. Parte de esta producción se exporta al sistema bentónico, mediante la sedimentación de organismos planctónicos y materia orgánica particulada. Además, los sistemas bentónicos situados en zonas fóticas, cuentan con producción primaria debida a las micro y macroalgas que se desarrollan en estos hábitats. Ambos sistemas pelágico y bentónico desarrollan complejas redes tróficas conectadas entre sí. Otro punto, que no debe pasar desapercibido es que los sedimentos albergan abundantes comunidades bacterianas que degradan la materia orgánica, y algunas de estas especies pueden degradar contaminantes orgánicos contribuyendo de forma importante a la degradación de estos compuestos (Freire y Fernández, 2003).

#### **2.4. Metabolismo de xenobióticos**

Los organismos marinos, incluyendo *C. gigas* han desarrollado mecanismos de defensa ante compuestos xenobióticos utilizando proteínas de estrés (chaperonas moleculares), metalotioneinas (desintoxicación por metales) y sistemas enzimáticos de biotransformación (desintoxicación de compuestos orgánicos). Tales enzimas son capaces de transformar compuestos orgánicos en formas solubles, para ser más fácilmente excretados.

Los mecanismos de defensa ante xenobióticos se dividen en tres fases. La primera fase se caracteriza por la oxigenación de los compuestos orgánicos, vía enzimas monooxigenasa. De estas la citocromo P450 constituye el sistema de desintoxicación mayor, seguida por la flavin monooxigenasa (FMO), monoamina oxidasa (MAO), oxidasa molibdeno hidroxilasa (aldehído y xantina oxidasa), alcohol y aldehído deshidrogenasa. Los productos oxigenados pueden ser directamente excretados, o bien convertirse en compuestos más reactivos e interactuar con el ADN, lípidos y proteínas, causando daño celular. En la segunda fase tiene

lugar la conjugación enzimática de los productos de la fase I para ser transformados a compuestos endógenos vía glutatión S- transferasas. La tercera fase involucra proteínas de membrana, identificadas por su múltiple resistencia a drogas y xenobióticos, exportándolos fuera de la célula (Boutet et al, 2004).

## **2.5. Toxicología genética**

La toxicología genética es una rama de la toxicología, que comprende la identificación y análisis de agentes tóxicos que actúan directamente sobre el material hereditario de los organismos vivos. El principal objetivo de la toxicología genética es la detección de un riesgo a partir de agentes que poseen una alta especificidad por los ácidos nucleicos y pueden llegar a producir daño al ADN a niveles de exposición subtóxicos. Tales agentes son clasificados como genotóxicos. El término genotóxico es empleado para distinguir entre agentes que tienen una afinidad intrínseca por el ADN y los que no.

Una de las funciones de la toxicología genética es la implementación de métodos que permitan determinar el impacto de los genotóxicos en el ambiente y en la salud humana (Brusick, 1978). Por lo anterior y debido al incremento en la contaminación ambiental, se ha hecho necesario el desarrollo de nuevas metodologías que permitan evaluar las alteraciones causadas en el ADN. La búsqueda e implementación de tales metodologías ha cobrado especial interés en los últimos 25 años.

Los avances en el campo de la genotoxicología, particularmente el desarrollo de métodos moleculares y citogenéticos aplicados dentro del relativamente nuevo campo de la

ecogenotoxicología, han permitido evaluar el impacto de los contaminantes sobre los organismos vivos (Kleijnans and van Schooten, 2002). Entre los métodos desarrollados para la evaluación de genotoxicidad pueden mencionarse: ensayo de micronúcleos, determinación de aberraciones cromosomales, intercambio de cromátidas hermanas, elusión alcalina, difusión radial y la técnica de electroforesis en gel de una sola célula (SCGE, por sus siglas en inglés) (Bihari et al, 1990; Brunetti et al, 1998; Sasaki, 1999; Singh, 2000; Dixon et al, 2002)

## **2.6. Electroforesis en gel de una sola célula (SCGE)**

### **2.6.1. Fundamento**

Un relativamente pequeño número de células son inmersas en un gel de agarosa, lisadas, sometidas a un campo electroforético, y teñidas con un colorante fluorescente. Los fragmentos rotos de ADN (carga negativa) migran hacia el ánodo, de tal forma que las células pueden ser observadas en un microscopio de fluorescencia para su evaluación

Las células con fragmentos de ADN roto (menor peso molecular) adquieren una apariencia semejante a un cometa (con una cabeza o región del núcleo y una cola con fragmentos rotos) debido a la migración de estos durante la electroforesis; de ahí que también se le llame ensayo cometa (Hartman et al, 2003). La longitud de la cola del cometa es directamente proporcional al daño en la molécula del ADN.

### **2.6.2. Historia**

Haciendo un poco de historia, la técnica SCGE fue introducida por Ostling y Johanson en 1984, quienes emplearon condiciones neutras de lisis y electroforesis, y tinción con naranja

de acridina (Comet Assay Forum, 2003). Sin embargo, este procedimiento, solamente permitía determinar rompimientos de doble cadena. Motivo por el cual, las condiciones neutras fueron modificadas por dos grupos, el de Singh en 1988 y el de Olive en 1989. Singh y colaboradores emplearon condiciones altamente alcalinas ( $\text{pH} \geq 13$ ). Esto permitió desenrollar el ADN, e hizo posible la detección de rompimientos de cadena sencilla y sitios lábiles al álcali. Este método fue desarrollado para medir rompimientos en el ADN con alta sensibilidad, es decir, permite la detección de más de un tipo de daño. Olive y colaboradores (1989) propusieron una electroforesis menos alcalina ( $\text{pH}=12.3$ ) que detecta únicamente rompimientos de cadena sencilla. Por lo que se conoce que la técnica de Singh es uno o dos órdenes de magnitud más sensible que las otras técnicas (Rojas, et al 1999).

En la actualidad un gran número de adelantos han permitido aumentar la flexibilidad y la utilidad de esta técnica para detectar varias formas de daño (rompimientos de cadena sencilla y de doble cadena, además de daños provocados por estrés oxidativo, errores de recombinación y de reparación del ADN, entrecruzamientos ADN-ADN, y ADN-proteína en cualquier célula eucariota) (Comet Assay Forum, 2003). Muchas de estas alteraciones pueden ser generadas directamente por compuestos genotóxicos, y/o finalmente inducir apoptosis o necrosis, tales daños también pueden ser generados por la interacción con especies reactivas de oxígeno y otros intermediarios reactivos, o como consecuencia de la inhibición de los sistemas de reparación (Halliwell, y Aruma, 1991).

Existen varias versiones de esta técnica, sin embargo la más recomendable en primera instancia es la que se realiza a  $\text{pH} \geq 13$ , ya que permite la detección de un amplio espectro

de daño al ADN. La detección de alteraciones en la migración del ADN depende de varios parámetros como lo son: la concentración de agarosa, el pH, la temperatura, duración del desenrollamiento (unwinding) y electroforesis, así como el voltaje y el amperaje (Hartman et al, 2003).

Hoy en día la técnica SCGE es empleada en genotoxicología, área clínica, estudios de reparación del ADN y en biomonitoreos ambientales en distintos lugares del mundo (Rojas et al, 1999). En tales estudios se han utilizado diversos organismos como lo son, bacterias, plantas, invertebrados, peces y mamíferos (células humanas, etc.) (Dixon et al, 2002). Enfocándose principalmente en el estudio de estos últimos. Sin embargo, dado que muchas de las especies restantes (entre ellas, los moluscos bivalvos) están directa o indirectamente relacionados en la alimentación humana, es particularmente interesante saber a cerca de su exposición ambiental a mutágenos y carcinógenos (Bolognesi et al, 1992). Por lo que han cobrado gran importancia en la realización de estudios de monitoreo ambiental, debido al incremento en los niveles de contaminación y al desarrollo de múltiples enfermedades como el cáncer (Freire y Fernández, 2003).

Entre las especies estudiadas se encuentran principalmente *Mytilus edulis* (Mitchelmore et al, 1998a, Mitchelmore et al, 1998b; Wilson et al, 1998; Pruski and Dixon, 2002, Hartwig, 1998; Kitchin, 2001); *Crassostrea virginica* (Nacci et al, 1996; Gielazyn et al, 2001), *Mytilus galloprovincialis* (Frenzilli et al, 2001) y *Tapes japonica* (Sasaki et al, 1997).

En la tabla 1 se observa un resumen de los trabajos realizados con la técnica SCGE en algunas especies marinas y acuáticas mediante la evaluación de sus tejidos expuestos a diferentes agentes químicos.

Tabla 1. Análisis de genotoxicidad mediante la técnica SCGE en tejidos de organismos marinos y acuáticos expuestos a diversos contaminantes.

| <b>Especie</b>        | <b>Tejido</b>      | <b>Agente físico y/o químico</b> | <b>Resultados</b> | <b>Referencia</b>        |
|-----------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------------|
| <i>Mytilus edulis</i> | Glándula digestiva | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | +                 | Mitchelmore et al, 1998b |
| <i>Mytilus edulis</i> | Glándula digestiva | MX                               | +                 | Mitchelmore et al, 1998b |
| <i>Mytilus edulis</i> | Glándula digestiva | BP                               | +                 | Mitchelmore et al, 1998b |
| <i>Mytilus edulis</i> | Glándula digestiva | NP                               | +                 | Mitchelmore et al, 1998b |
| <i>Mytilus edulis</i> | Glándula digestiva | NF                               | +                 | Mitchelmore et al, 1998b |
| <i>Mytilus edulis</i> | Branquia           | Cd Cl <sub>2</sub>               | -                 | Pruski y Dixon, 2002     |
| <i>Mytilus edulis</i> | Branquia           | NDMA                             | +                 | Wilson, 1998             |
| <i>Mytilus edulis</i> | Hemocitos          | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>    | +                 | Wilson, 1998             |
| <i>Mytilus edulis</i> | Hemocitos          | NDMA                             | +                 | Mitchelmore et al, 1998a |
| <i>Mytilus edulis</i> | Esperma            | NF                               | +                 | Steinert, 1996           |

Continuación de la tabla 1.

| <b>Especie</b>                   | <b>Tejido</b>      | <b>Agente físico y/o químico</b>                         | <b>Resultados</b> | <b>Referencia</b>      |
|----------------------------------|--------------------|--|-------------------|------------------------|
| <i>Mytilus edulis</i>            | Esperma            | araC   | +                 | Steinert, 1996         |
| <i>Mytilus edulis</i>            | Esperma            | MNNG   | +                 | Steinert, 1996         |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | Branquia           | Exposición natural, laguna costera altamente eutroficada | +                 | Frenzilli et al, 2000  |
| <i>Crassostrea virginica</i>     | Hemocitos          | BP   | +                 | Cotelle y Ferard, 1999 |
| <i>Crassostrea virginica</i>     | Hemocitos          | DENA   | +                 | Cotelle y Ferard, 1999 |
| <i>Crassostrea virginica</i>     | Hemocitos          | AF   | +                 | Cotelle y Ferard, 1999 |
| <i>Patunopecten yessoensis</i>   | Branquia           | MNNG   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Patunopecten yessoensis</i>   | Branquia           | EMS  | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Patunopecten yessoensis</i>   | Branquia           | BP   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Patunopecten yessoensis</i>   | Branquia           | MX   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Tapes japonica</i>            | Branquia           | MNNG   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Tapes japonica</i>            | Branquia           | EMS  | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Tapes japonica</i>            | Branquia           | MX   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Tapes japonica</i>            | Branquia           | BP   | +                 | Sasaki et al, 1997     |
| <i>Tapes semidecussatus</i>      | Hemolinfa          | Sedimentos de sitios contaminados                        | +                 | Coughlan et al, 2002   |
| <i>Tapes semidecussatus</i>      | Branquia           | Sedimentos de sitios contaminados                        | +                 | Coughlan et al, 2002   |
| <i>Tapes semidecussatus</i>      | Glándula digestiva | Sedimentos de sitios contaminados                        | +                 | Coughlan et al, 2002   |
| <i>Curbicula fluminea</i>        | Hemolinfa          | MMS  | +                 | Rigonato et al, 2005   |
| <i>Curbicula fluminea</i>        | Branquia           | MMS  | +                 | Rigonato et al, 2005   |

Continuación de la tabla 1.

| <b>Especie</b>                 | <b>Tejido</b>      | <b>Agente físico y/o químico</b>  | <b>Resultados</b> | <b>Referencia</b>      |
|--------------------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| <i>Curbicula fluminea</i>      | Glándula digestiva | MMS                               | +                 | Rigonato et al, 2005   |
| <i>C. sapidus</i>              | Embrión            | MNQ                               | +                 | Lee et al, 1999        |
| <i>C. sapidus</i>              | Embrión            | 4-NQO                             | +                 | Lee et al, 1999        |
| <i>Anguilla anguilla</i>       | Eritrocitos        | PB                                | +                 | Nigro et al, 2002      |
| <i>Anguilla anguilla</i>       | Eritrocitos        | PCBs                              | +                 | Nigro et al, 2002      |
| <i>Anguilla anguilla</i>       | Eritrocitos        | TCDD                              | +                 | Nigro et al, 2002      |
| <i>Anguilla anguilla</i>       | Eritrocitos        | NFO                               | +                 | Nigro et al, 2002      |
| <i>Pleuronectes americanus</i> | Sangre             | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | +                 | Cotelle y Ferard, 1999 |
| <i>Pleuronectes americanus</i> | Sangre             | MNNG                              | +                 | Cotelle y Ferard, 1999 |
| <i>Cyprius carpio</i>          | Leucocitos         | Sedimentos de sitios contaminados | +                 | Kammann et al, 2000    |
| <i>Cyprius carpio</i>          | Leucocitos         | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>     | +                 | Kammann et al, 2000    |

Abreviaturas: MNNG (*n*-metil nitrosoguanidina), PB (benzo pireno), MX (3-cloro4-diclorometil-5-hidroxi-2[5H]-furanona), NP (1-nitropireno), NF (nitrofurantoina), araC (citosina-β-D-arabinofuranosida), EMS (etil metano sulfonato), MMS (metil metano sulfonato), 4-NQO (4-nitroquinolina-*N*-óxido), MNQ (2-metil-1,4-naftoquinona), NDMA (*N*-nitrosodimetilamina), AF(2-aminofluoreno), DENA(dietilnitrosamina), NFO (β-naftoflavona), PCBs (bifenilos policlorinados).

Varios de los agentes químicos mostrados en la tabla 1 han sido utilizados como agentes estresores en la técnica SCGE. Uno de ellos es el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), compuesto que a través de la reacción de Fenton produce el altamente reactivo radical hidroxilo (OH). El peróxido de hidrógeno al interactuar con una biomolécula le sustrae un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. El daño en las membranas celulares, producido por la oxidación de los lípidos altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular. Mientras que la modificación de bases,



producida al interactuar con los ácidos nucleicos tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte o la pérdida de expresión por daño a un gen específico (Heaton et al, 2002; Rodríguez Perón et al, 2001). Motivo por el cual en la técnica SCGE es empleado comúnmente como control positivo, en distintos tipos de células (Singh et al., 1988, Kruszewski et al., 1994).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general:

Estandarizar la técnica SCGE para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *C. gigas*.

#### 3.2. Objetivos específicos:

1. Establecer una metodología estándar para la técnica SCGE empleando como modelo de estudio a *C. gigas*
2. Seleccionar entre los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia el más sensible, confiable y eficaz para la detección de daño al ADN, mediante la técnica SCGE.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia de *C. gigas* son sensibles, confiables y eficaces para la determinación de genotoxicidad mediante la técnica de SCGE.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos utilizados en este estudio fueron ejemplares adultos (talla de 7- 9 cm. de longitud y 82- 96 gr. de peso) de la especie *C. gigas* cultivados en Laguna Manuela B.C. (dentro de la Reserva de la Biosfera del Vizcaíno) por la empresa Sol Azul S. A. de C. V.

### 5. 1. Metodología y diseño experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos en el presente estudio se realizaron tres experimentos, a través de los cuales se probó la viabilidad de varios procedimientos para estandarizar la técnica SCGE versión alcalina ( $\text{pH} \geq 13$ ) en cuatro tejidos (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia) de *C. gigas*. Cabe aclarar que en el primer experimento solo se trabajó en los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia (dado que aun no se perfeccionaba el método de extracción de hemolinfa); y que en los experimentos II y III (al igual que en el control interno) se utilizó un tratamiento con peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{M}$ /10 min. a temperatura ambiente) como agente estresor en células de los 4 tejidos. Este tratamiento fue de gran utilidad para lograr la estandarización de la técnica, permitiendo la realización de comparaciones entre las células con y sin tratamiento.

La evaluación de las laminillas, se realizó siguiendo el método descrito por Collins (2004), el cual consiste en clasificar 100 células en una escala visual de 0-4, siendo 0 ausencia de daño y 4 el mayor daño, de tal manera que el nivel de daño (en Unidades Arbitrarias) por

cada muestra puede variar entre 0 y 400. Para realizar dicha evaluación se tomó como guía las imágenes obtenidas por Corona Badillo, 2005. Posteriormente los resultados fueron procesados mediante ANOVA (análisis de varianza) de una vía, seguida de una comparación múltiple con la prueba de Tukey (Programa Statistica versión 5.0) para evaluar la significancia estadística de las diferencias encontradas entre los distintos tipos celulares y el tratamiento con peróxido de hidrógeno.

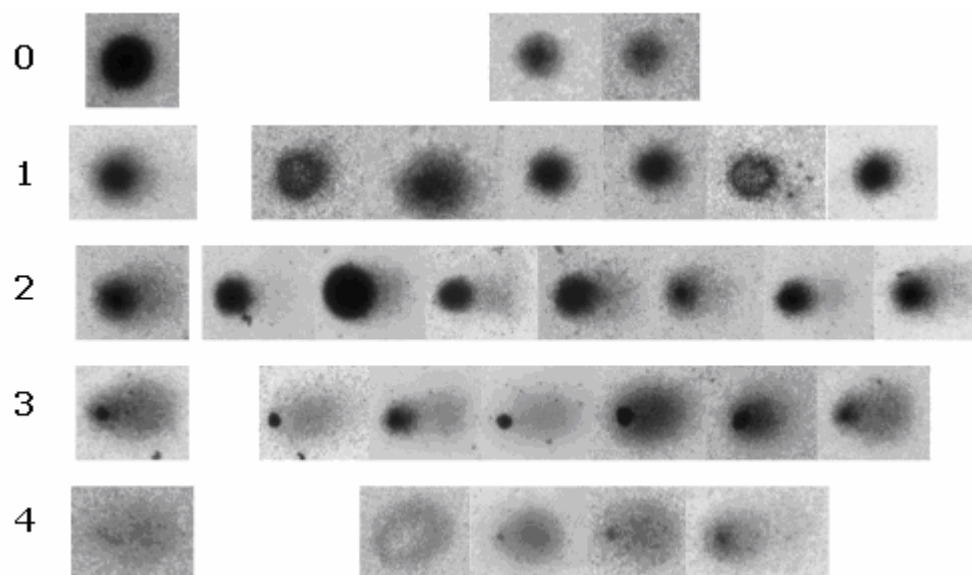


Figura 1. Categorización de los diferentes niveles de daño del ADN en hemocitos de *Uca princeps* mediante la técnica SCGE y tinción con plata. Imagen comparativa de los diferentes niveles de daño del ADN, donde el nivel 0 representa células sin daño, mientras que el nivel 4 representa las células con mayor daño. Los cometas a la derecha representan las variaciones dentro de cada nivel. Fotos tomadas a 400 X (Corona Vadillo, 2005).

### 5.1.1. Experimento I

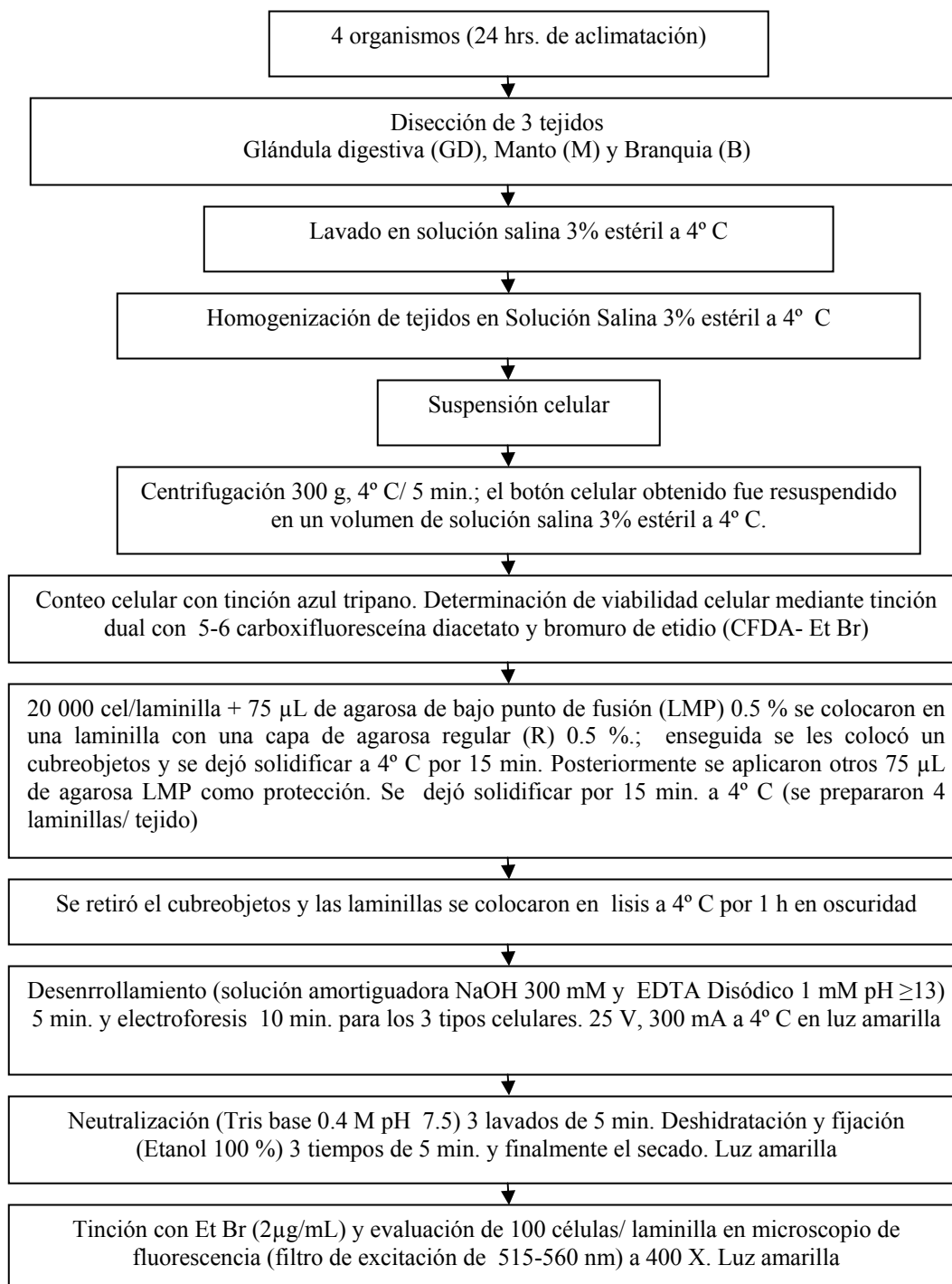


Figura 2. Esquema de la metodología seguida en el experimento I.

### 5.1.1.1. Control interno (linfocitos humanos)

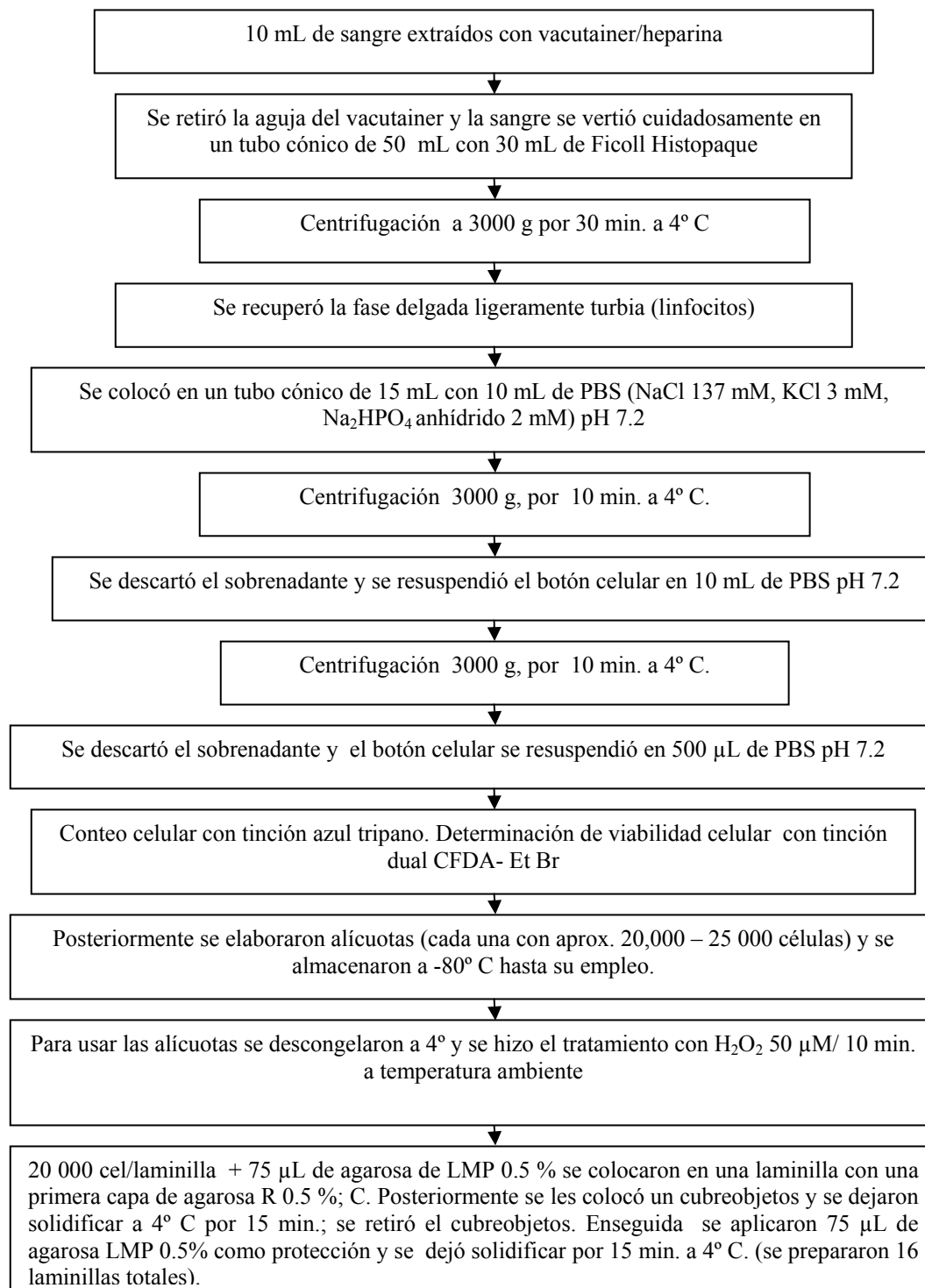
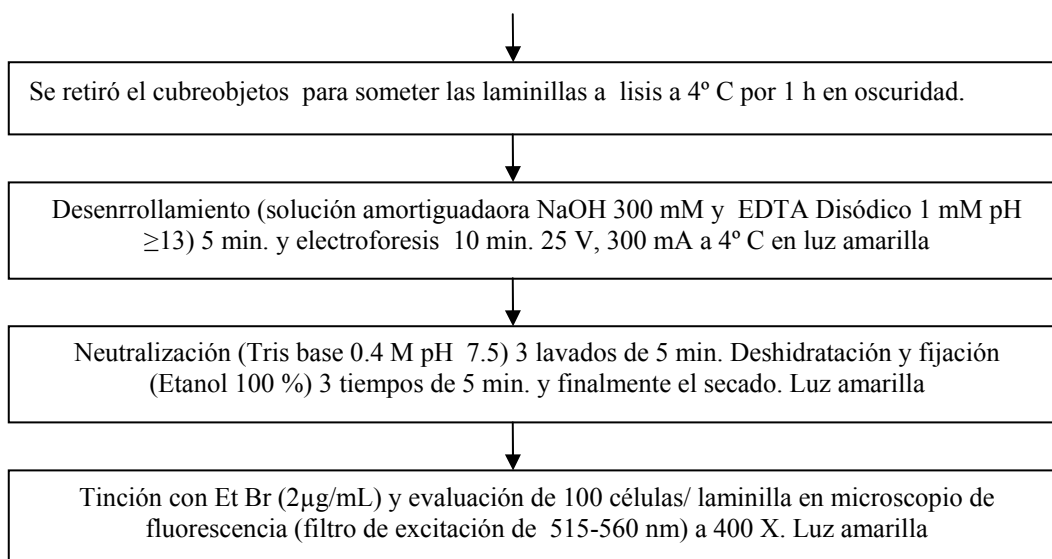


Figura 3. Metodología seguida para la obtención del control interno (linfocitos humanos). Se realizaron 4 corridas de electroforesis, usando 4 laminillas por c/u.

Continuación de la Fig 3.





### 5.1.2. Experimento II

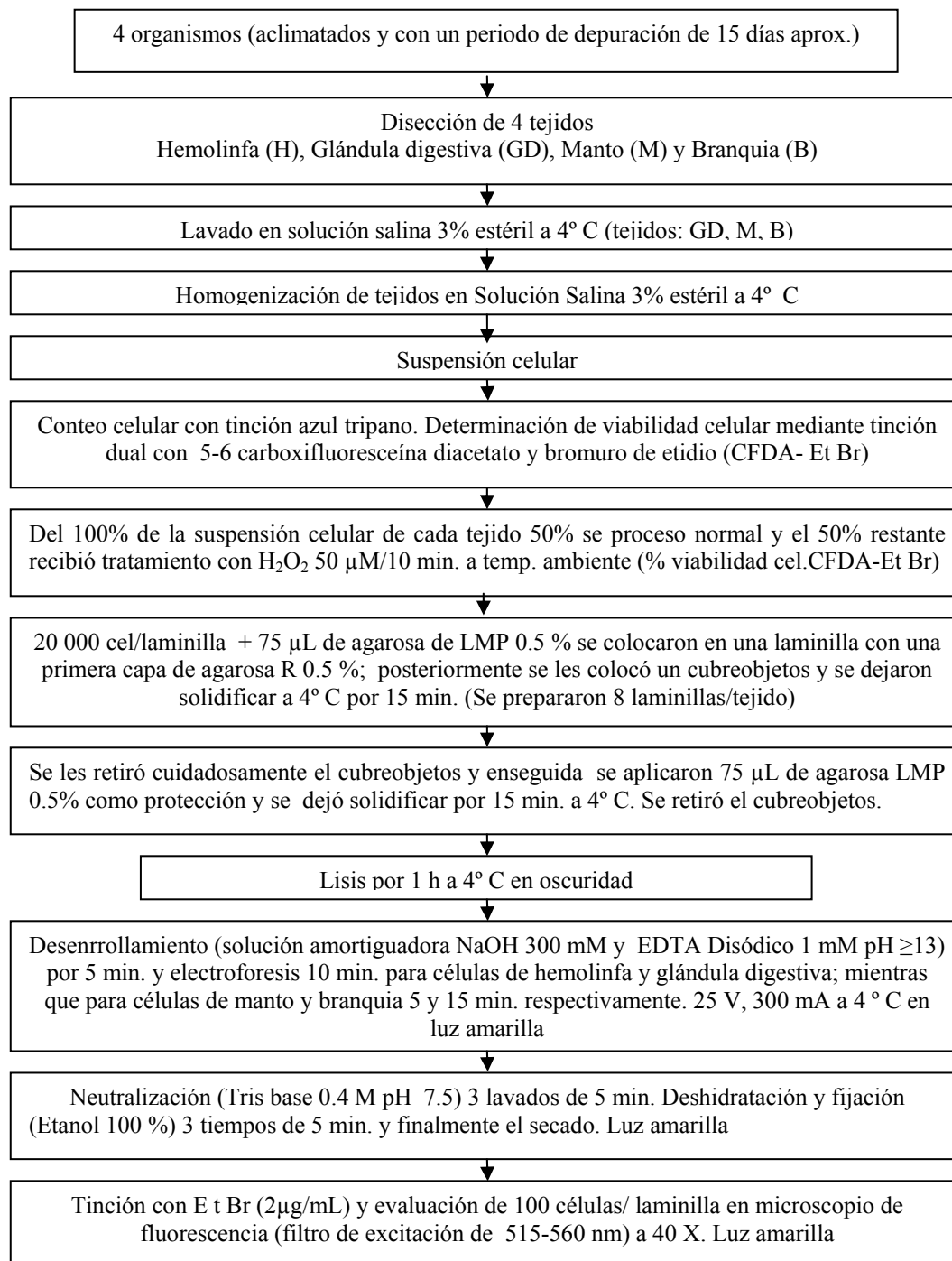


Figura 4. Metodología seguida en el experimento II, en el cual se eliminó el paso de centrifugación y se incluyó un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/ 10 min. a temperatura ambiente.

### 5.1.3. Experimento III

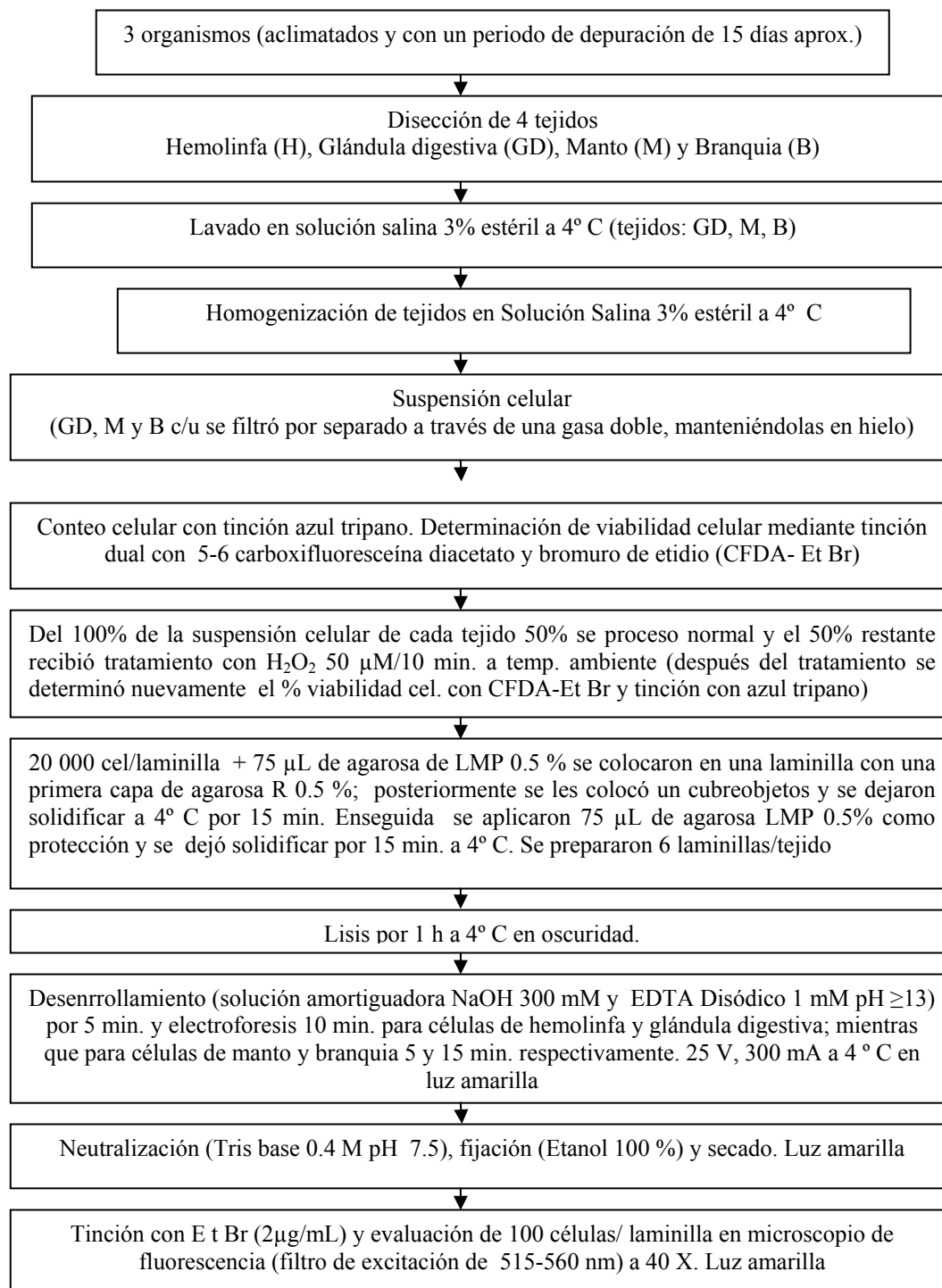


Figura 5. Metodología seguida en el experimento III, en el cual se incluyó un paso de filtración a través de gasa para eliminar los debris celulares.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Experimento I

En la figura 6 se observan los resultados de la determinación del porcentaje de viabilidad celular mediante el método de tinción dual CFDA- Et Br. La existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 3 tejidos es muy evidente, ya que el tejido de glándula digestiva (GD) presentó un 70%, manto un 60%, mientras que la branquia presentó un 30% de viabilidad celular.

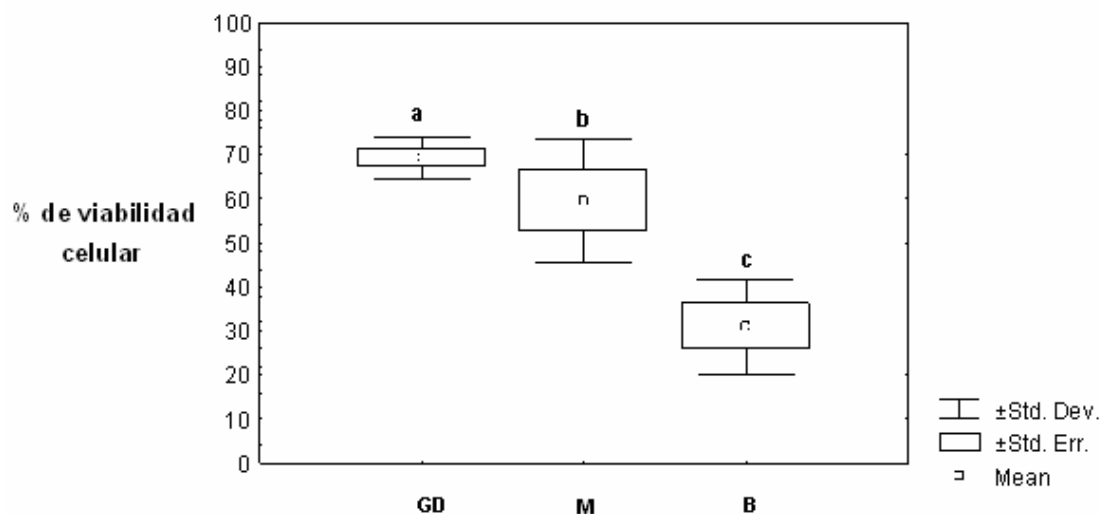


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular determinado por el método de tinción dual CFDA- Et Br, en los tejidos de glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tejidos.

Una vez determinados los porcentajes de viabilidad celular y de obtenerse la densidad celular, se procedió a la elaboración de laminillas las cuales se sometieron a un proceso de lisis durante 1 h, y desenrollamiento del ADN, seguido por la electroforesis con una duración de 5 y 10 min. respectivamente. Enseguida se procedió al análisis de las

laminillas: se clasificaron de acuerdo a una escala visual de daño al ADN, se realizó la determinación de unidades arbitrarias (UA) (estos pasos fueron descritos en el capítulo de metodología). En las tablas II, III y IV se incluyen los resultados del tejido de glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos y de las 4 laminillas elaboradas por cada animal. En estas tablas se observa la escala visual de daño al ADN, la cantidad de células que se encuentran en cada nivel, el número de células evaluadas por laminilla el cual fue de 100, sumando un total de 1600 células evaluadas. De la misma manera se aprecian las UA en las que se ubica cada laminilla, finalmente el promedio de UA y la desviación estándar por cada organismo. De manera general en las 3 tablas puede observarse que en los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia procesados mediante el protocolo que incluye los pasos de centrifugación no hay un comportamiento uniforme ya que existen grandes diferencias en la distribución de frecuencias de daño al ADN y UA, lo cual se hace más evidente en las desviaciones estándar.

Tabla II. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de glándula digestiva (GD), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| 1GD1                                  | 1                            | 4   | 42  | 38  | 15  | 100                                | 262 |          |           |
| 1GD2                                  | 0                            | 7   | 32  | 40  | 21  | 100                                | 275 |          |           |
| 1GD3                                  | 4                            | 11  | 27  | 35  | 23  | 100                                | 262 |          |           |
| 1GD4                                  | 4                            | 10  | 22  | 20  | 44  | 100                                | 290 | 272.25   | 13.3260   |
| 2GD1                                  | 6                            | 18  | 48  | 15  | 13  | 100                                | 211 |          |           |
| 2GD2                                  | 9                            | 13  | 46  | 17  | 15  | 100                                | 216 |          |           |
| 2GD3                                  | 3                            | 10  | 58  | 16  | 13  | 100                                | 226 |          |           |
| 2GD4                                  | 8                            | 13  | 51  | 13  | 15  | 100                                | 214 | 216.75   | 6.5       |
| 3GD1                                  | 0                            | 0   | 0   | 36  | 64  | 100                                | 364 |          |           |
| 3GD2                                  | 0                            | 1   | 7   | 46  | 46  | 100                                | 337 |          |           |
| 3GD3                                  | 0                            | 0   | 3   | 27  | 70  | 100                                | 367 |          |           |
| 3GD4                                  | 0                            | 0   | 2   | 23  | 75  | 100                                | 373 | 360.25   | 15.9452   |
| 4GD1                                  | 5                            | 8   | 6   | 24  | 57  | 100                                | 320 |          |           |
| 4GD2                                  | 3                            | 4   | 3   | 12  | 78  | 100                                | 358 |          |           |
| 4GD3                                  | 1                            | 3   | 3   | 24  | 69  | 100                                | 357 |          |           |
| 4GD4                                  | 8                            | 18  | 10  | 34  | 30  | 100                                | 260 | 323.75   | 46.0316   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 52                           | 120 | 360 | 420 | 648 | 1600                               |     |          |           |

Tabla III. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de manto (M), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| 1M1                                   | 7                            | 17  | 35  | 28  | 13  | 100                                | 223 |          |           |
| 1M2                                   | 5                            | 14  | 45  | 26  | 10  | 100                                | 222 |          |           |
| 1M3                                   | 8                            | 20  | 42  | 15  | 15  | 100                                | 209 |          |           |
| 1M4                                   | 2                            | 15  | 56  | 15  | 12  | 100                                | 220 | 218.5    | 6.4549    |
| 2M1                                   | 3                            | 6   | 4   | 27  | 60  | 100                                | 335 |          |           |
| 2M2                                   | 8                            | 8   | 10  | 19  | 55  | 100                                | 305 |          |           |
| 2M3                                   | 10                           | 4   | 9   | 33  | 44  | 100                                | 297 |          |           |
| 2M4                                   | 7                            | 6   | 16  | 41  | 30  | 100                                | 281 | 304.5    | 22.6495   |
| 3M1                                   | 10                           | 12  | 16  | 25  | 37  | 100                                | 267 |          |           |
| 3M2                                   | 5                            | 7   | 16  | 30  | 42  | 100                                | 297 |          |           |
| 3M3                                   | 5                            | 9   | 17  | 35  | 34  | 100                                | 284 |          |           |
| 3M4                                   | 9                            | 8   | 16  | 31  | 36  | 100                                | 277 | 281.25   | 12.6062   |
| 4M1                                   | 6                            | 8   | 10  | 36  | 40  | 100                                | 296 |          |           |
| 4M2                                   | 7                            | 8   | 14  | 37  | 34  | 100                                | 283 |          |           |
| 4M3                                   | 5                            | 5   | 8   | 32  | 50  | 100                                | 317 |          |           |
| 4M4                                   | 6                            | 10  | 10  | 33  | 41  | 100                                | 293 | 297.25   | 14.2916   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 103                          | 157 | 324 | 463 | 553 | 1600                               |     |          |           |

Tabla IV. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE en el tejido de branquia (B), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| 1B1                                   | 14                           | 24  | 31  | 12  | 19  | 100                                | 198 |          |           |
| 1B2                                   | 16                           | 24  | 24  | 20  | 16  | 100                                | 196 |          |           |
| 1B3                                   | 19                           | 18  | 26  | 21  | 16  | 100                                | 197 |          |           |
| 1B4                                   | 12                           | 27  | 30  | 14  | 17  | 100                                | 197 | 197      | 0.8164    |
| 2B1                                   | 5                            | 12  | 15  | 26  | 42  | 100                                | 288 |          |           |
| 2B2                                   | 8                            | 18  | 10  | 34  | 30  | 100                                | 260 |          |           |
| 2B3                                   | 6                            | 7   | 14  | 42  | 31  | 100                                | 285 |          |           |
| 2B4                                   | 1                            | 4   | 10  | 51  | 34  | 100                                | 313 | 286.5    | 21.6717   |
| 3B1                                   | 1                            | 0   | 3   | 49  | 47  | 100                                | 341 |          |           |
| 3B2                                   | 2                            | 1   | 0   | 42  | 55  | 100                                | 347 |          |           |
| 3B3                                   | 1                            | 0   | 2   | 50  | 47  | 100                                | 342 |          |           |
| 3B4                                   | 1                            | 0   | 4   | 35  | 60  | 100                                | 353 | 345.75   | 5.5       |
| 4B1                                   | 0                            | 3   | 4   | 38  | 55  | 100                                | 345 |          |           |
| 4B2                                   | 0                            | 1   | 4   | 43  | 52  | 100                                | 346 |          |           |
| 4B3                                   | 1                            | 3   | 6   | 36  | 54  | 100                                | 339 |          |           |
| 4B4                                   | 3                            | 9   | 7   | 33  | 48  | 100                                | 314 | 336      | 14.9888   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 90                           | 151 | 190 | 546 | 623 | 1600                               |     |          |           |

En las figuras 7 y 8 se observa en forma gráfica la distribución de frecuencias de daño al ADN y en UA respectivamente. La mayoría de las células se encuentran en los niveles más altos de daño al ADN en ambos gráficos, en la figura 7 se aprecia un comportamiento similar en los 3 tejidos. Sin embargo, en el gráfico 8 de UA las diferencias entre los 4 organismos en cuanto al comportamiento de cada tejido son muy marcadas. Ya que mientras las glándulas digestivas de los organismos 1 y 2 se encuentran en las 270 y 210 UA respectivamente, los organismos 3 y 4 están arriba de las 350 UA. Lo que hace una diferencia de 100 UA entre los organismos. En lo que respecta al manto, solo el organismo 1 presentó un comportamiento diferente ubicándose en las 210 UA, mientras que los organismos 2,3 y 4 presentaron un comportamiento muy similar (alrededor de las 300 UA).

En cuanto a las branquias los organismos 1 y 2 presentan diferencias muy marcadas (200 y 300 UA respectivamente). En el caso de los organismos 3 y 4 se encontraron arriba de las 350 UA.

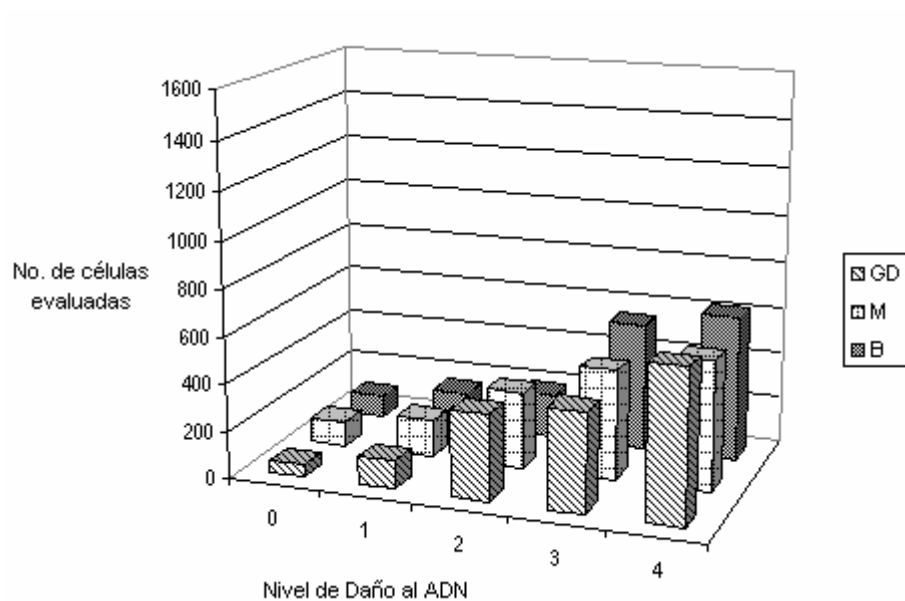


Figura 7. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos de *C. gigas* (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Con centrifugación.



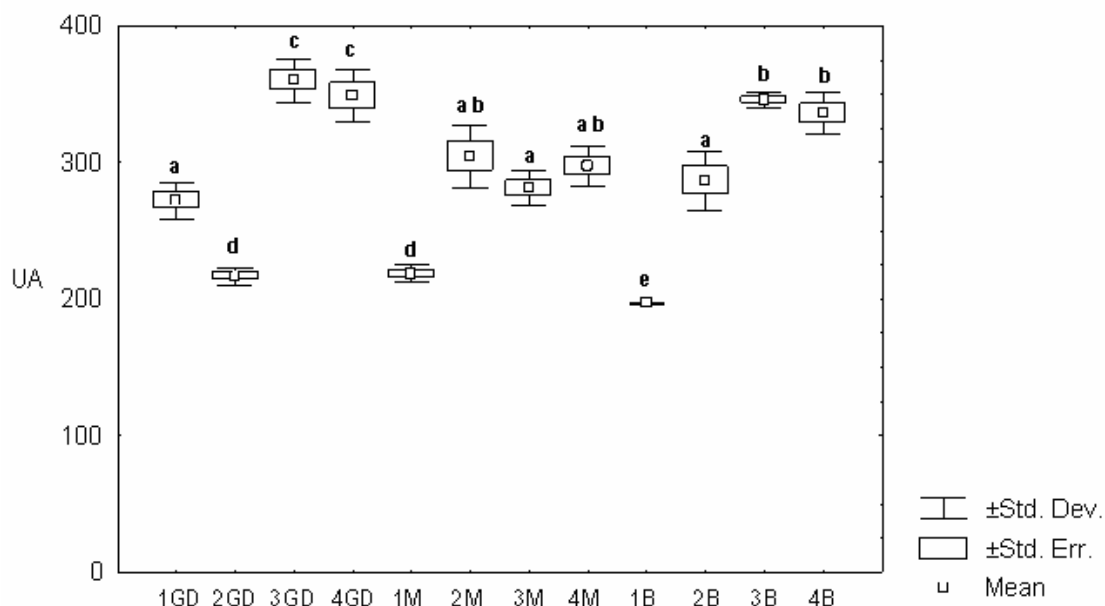


Figura 8. Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 4 organismos en 3 tejidos (glándula digestiva, manto y branquia) de *C. gigas*. Las letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los tejidos y entre los organismos.

### 6.1.1. Control interno: linfocitos humanos

Para obtener un control en cada corrida de electroforesis que actuara como un indicador de que la metodología es seguida adecuadamente, se aislaron linfocitos humanos (la tinción dual CFDA- Et Br dio como resultado una viabilidad celular del 85 %), se alícuotaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se descongelaron a  $4^{\circ}\text{C}$  y se trataron con  $\text{H}_2\text{O}_2$   $50\ \mu\text{M}/10\ \text{min}$ . a temperatura ambiente. Se elaboraron 16 laminillas y se corrieron 4 de ellas en cada corrida, realizándose un total de 4 corridas. En la tabla V se incluyen los resultados obtenidos en las corridas efectuadas con linfocitos (las células encontradas en cada nivel de la escala de daño al ADN, el total de células evaluadas por cada laminilla, las UA y un promedio de estas y sus desviaciones estándar). En esta tabla es muy evidente que el comportamiento de las células sometidas a este tratamiento es congruente, ya que la

mayoría de ellas están dentro de los niveles 3 y 4 de daño al ADN y entre 345 y 350 UA, existiendo mínimas variaciones. Las figuras 9 y 10 ilustran de manera evidente lo observado en la tabla V, ya que en ellas se aprecia un patrón muy uniforme en las 4 corridas; no encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Tabla V. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del control interno de corrida de electroforesis (linfocitos humanos (L) tratados con  $H_2O_2$  50  $\mu M$ /10 min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrida).

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |    |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|----|----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1  | 2  | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| L1                                    | 0                            | 0  | 0  | 30  | 70  | 100                                | 370 |          |           |
| L2                                    | 2                            | 5  | 1  | 45  | 47  | 100                                | 330 |          |           |
| L3                                    | 0                            | 1  | 4  | 39  | 56  | 100                                | 350 |          |           |
| L4                                    | 3                            | 2  | 0  | 41  | 54  | 100                                | 341 | 347.75   | 16.9386   |
| L5                                    | 0                            | 1  | 5  | 37  | 57  | 100                                | 350 |          |           |
| L6                                    | 1                            | 0  | 0  | 46  | 53  | 100                                | 350 |          |           |
| L7                                    | 1                            | 1  | 3  | 40  | 55  | 100                                | 347 |          |           |
| L8                                    | 0                            | 4  | 2  | 35  | 59  | 100                                | 349 | 349      | 1.4142    |
| L9                                    | 0                            | 0  | 5  | 44  | 51  | 100                                | 346 |          |           |
| L10                                   | 2                            | 0  | 0  | 47  | 51  | 100                                | 345 |          |           |
| L11                                   | 0                            | 3  | 3  | 39  | 55  | 100                                | 346 |          |           |
| L12                                   | 0                            | 3  | 3  | 39  | 55  | 100                                | 346 | 345.75   | 0.5       |
| L13                                   | 1                            | 2  | 0  | 43  | 54  | 100                                | 347 |          |           |
| L14                                   | 0                            | 0  | 5  | 30  | 65  | 100                                | 360 |          |           |
| L15                                   | 3                            | 5  | 2  | 37  | 53  | 100                                | 332 |          |           |
| L16                                   | 0                            | 0  | 3  | 31  | 66  | 100                                | 363 | 350.5    | 14.1539   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 13                           | 27 | 36 | 623 | 901 | 1600                               |     |          |           |

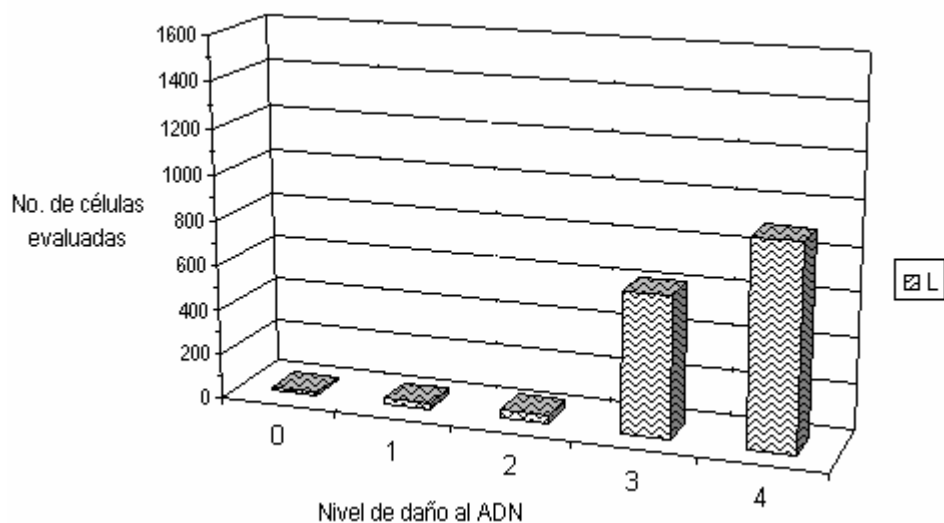


Figura 9. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN, del control interno de corrida de electroforesis: linfocitos humanos (L) tratados con  $H_2O_2$   $50 \mu M/10$  min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrída. Se evaluaron 100 células/laminilla.

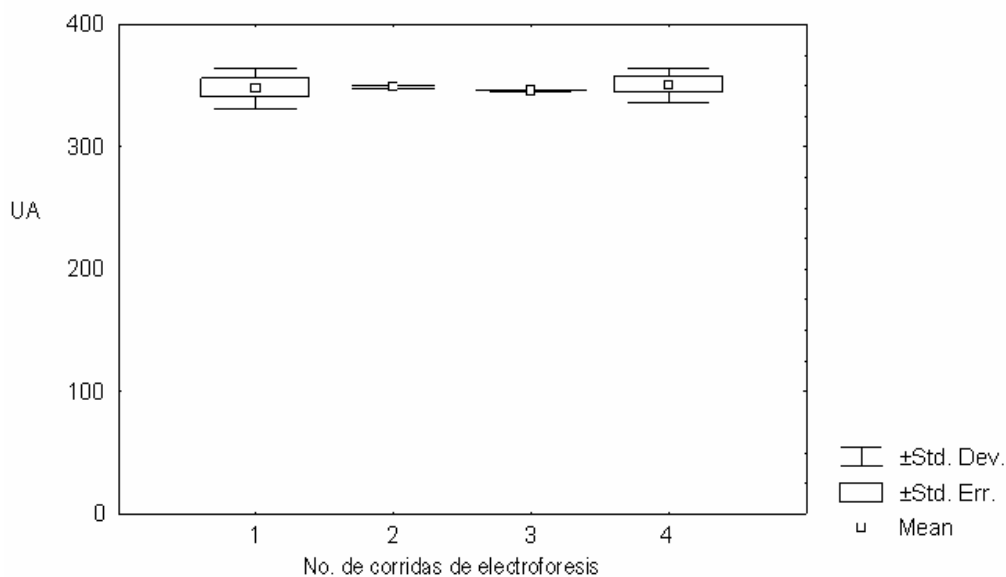


Figura 10. Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) del control interno de corrida de electroforesis: linfocitos humanos (L) tratados con  $H_2O_2$   $50 \mu M/10$  min. a temperatura ambiente. 4 corridas, 4 laminillas/corrída.

## 6. 2. Experimento II

Como puede observarse en el experimento I los resultados no fueron satisfactorios ya que la mayoría de las células evaluadas mostraban un aparente efecto genotóxico. Por lo que se decidió averiguar cual era la variable que estaba induciendo daño al ADN durante el procesamiento de las muestras. Primeramente se decidió intentar descartando la centrifugación. En este segundo experimento de manera semejante al anterior se utilizaron 4 organismos (aclimatados y con un periodo de depuración de 15 días aprox.) y 4 laminillas por tejido. Se utilizó un método para extracción de hemolinfa realizando un corte en las valvas del ostión, evitando la contracción del músculo aductor. Por lo que se sumó un tejido mas al experimento, dando un total de 4 tejidos. Además, se incluyó el tratamiento con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M/10 min. a temperatura ambiente.

Primeramente se determinaron las viabilidades celulares, las que pueden observarse en las figuras 11 y 12. Los 4 tejidos (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia) presentaron porcentajes de viabilidad congruentes con y sin tratamiento de peróxido de hidrógeno mediante el método de tinción dual CFDA-Br Et. Enseguida se procedió a la elaboración de las laminillas, una vez listas se sometieron a un proceso de lisis durante 1 h, un desenrollamiento de 5 min (para los 4 tejidos), mientras que la duración de la electroforesis para hemolinfa y glándula digestiva fue de 10 min y de 15 min para los tejidos de manto y branquia. Esto debido a que en el primer experimento se percibió un halo alrededor del ADN de estos 2 últimos tejidos. Por este motivo se probó aumentar la duración de la electroforesis para obtener cometas mejor definidos.

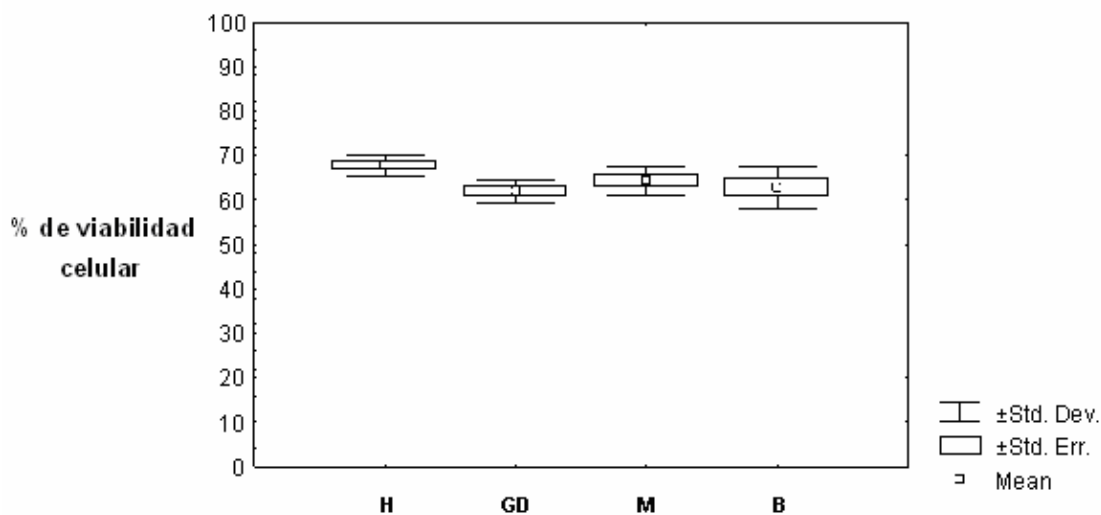


Figura 11. Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos de *C. gigas*. Sin centrifugación.

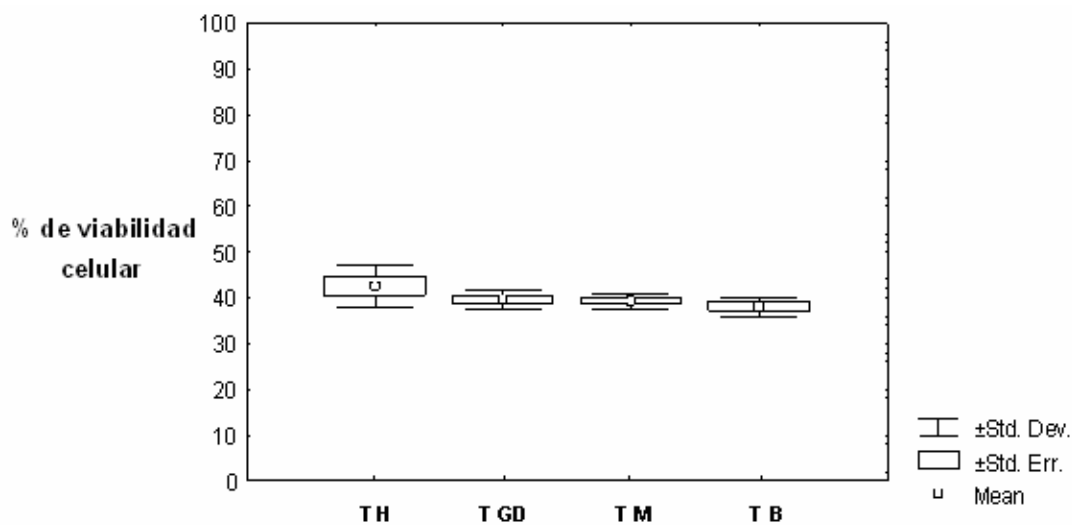


Figura 12. Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos de *C. gigas* tratados con peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación.

En las tablas que comprenden los números VI y hasta el XIII se observan los resultados obtenidos en los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia incluyendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Los resultados fueron satisfactorios, ya que las células sin ningún tratamiento se ubicaron en los niveles más bajos de la escala de daño al ADN, mientras que las células de los tejidos tratados con peróxido de hidrógeno observaron el nivel más alto.

Tabla VI. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H), 4 organismos, 4 laminillas/organismo

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4  |                                    |     |          |           |
| 1H1                                   | 22                           | 31  | 30  | 9   | 8  | 100                                | 150 |          |           |
| 1H2                                   | 20                           | 33  | 26  | 12  | 9  | 100                                | 157 |          |           |
| 1H3                                   | 22                           | 32  | 30  | 10  | 6  | 100                                | 146 |          |           |
| 1H4                                   | 23                           | 30  | 31  | 12  | 4  | 100                                | 144 | 149.25   | 5.7373    |
| 2H1                                   | 25                           | 31  | 27  | 10  | 7  | 100                                | 143 |          |           |
| 2H2                                   | 32                           | 29  | 22  | 9   | 8  | 100                                | 132 |          |           |
| 2H3                                   | 27                           | 33  | 23  | 12  | 5  | 100                                | 135 |          |           |
| 2H4                                   | 30                           | 26  | 22  | 13  | 9  | 100                                | 145 | 138.75   | 6.2383    |
| 3H1                                   | 28                           | 32  | 26  | 11  | 3  | 100                                | 129 |          |           |
| 3H2                                   | 26                           | 32  | 28  | 11  | 3  | 100                                | 133 |          |           |
| 3H3                                   | 28                           | 30  | 29  | 9   | 4  | 100                                | 131 |          |           |
| 3H4                                   | 27                           | 29  | 27  | 10  | 7  | 100                                | 141 | 133.5    | 5.2599    |
| 4H1                                   | 30                           | 29  | 22  | 10  | 9  | 100                                | 139 |          |           |
| 4H2                                   | 29                           | 33  | 20  | 9   | 9  | 100                                | 136 |          |           |
| 4H3                                   | 27                           | 27  | 30  | 13  | 3  | 100                                | 138 |          |           |
| 4H4                                   | 23                           | 31  | 28  | 14  | 4  | 100                                | 145 | 139.5    | 3.8729    |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 419                          | 488 | 421 | 174 | 98 | 1600                               |     |          |           |

Tabla VII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |   |   |     |      | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|---|---|-----|------|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1 | 2 | 3   | 4    |                                    |     |          |           |
| T1H1  | 0                            | 0 | 1 | 34  | 65   | 100                                | 364 |          |           |
| T1H2  | 0                            | 1 | 2 | 30  | 67   | 100                                | 363 |          |           |
| T1H3  | 0                            | 1 | 1 | 32  | 66   | 100                                | 363 |          |           |
| T1H4  | 0                            | 1 | 0 | 32  | 67   | 100                                | 365 | 363.75   | 0.9574    |
| T2H1  | 0                            | 1 | 0 | 29  | 70   | 100                                | 368 |          |           |
| T2H2  | 0                            | 0 | 1 | 28  | 71   | 100                                | 370 |          |           |
| T2H3  | 0                            | 0 | 2 | 29  | 69   | 100                                | 367 |          |           |
| T2H4  | 0                            | 0 | 0 | 32  | 68   | 100                                | 368 | 368.25   | 1.2583    |
| T3H1  | 0                            | 0 | 0 | 33  | 67   | 100                                | 367 |          |           |
| T3H2  | 0                            | 0 | 0 | 34  | 66   | 100                                | 366 |          |           |
| T3H3  | 0                            | 0 | 1 | 30  | 69   | 100                                | 368 |          |           |
| T3H4  | 0                            | 1 | 0 | 32  | 67   | 100                                | 365 | 366.5    | 1.2909    |
| T4H1  | 0                            | 1 | 0 | 33  | 66   | 100                                | 364 |          |           |
| T4H2  | 0                            | 0 | 1 | 32  | 67   | 100                                | 366 |          |           |
| T4H3  | 0                            | 0 | 0 | 29  | 71   | 100                                | 371 |          |           |
| T4H4  | 0                            | 1 | 0 | 35  | 64   | 100                                | 362 | 365.75   | 3.8622    |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 0                            | 7 | 9 | 504 | 1080 | 1600                               |     |          |           |

Tabla VIII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo,<br>Tejido y No.<br>laminilla | Escala visual de daño al<br>ADN |     |     |     |    | No. de células<br>evaluadas/laminilla | UA  | Prom.<br>UA | Desv.<br>Est |
|---|---------------------------------|-----|-----|-----|----|---------------------------------------|-----|-------------|--------------|
|   | 0                               | 1   | 2   | 3   | 4  |                                       |     |             |              |
| 1GD1  | 26                              | 19  | 40  | 7   | 8  | 100                                   | 152 |             |              |
| 1GD2  | 27                              | 21  | 40  | 8   | 4  | 100                                   | 141 |             |              |
| 1GD3  | 26                              | 18  | 38  | 10  | 8  | 100                                   | 156 |             |              |
| 1GD4  | 25                              | 20  | 41  | 9   | 5  | 100                                   | 149 | 149.5       | 6.3508       |
| 2GD1  | 25                              | 22  | 40  | 9   | 4  | 100                                   | 145 |             |              |
| 2GD2  | 23                              | 22  | 43  | 12  | 0  | 100                                   | 144 |             |              |
| 2GD3  | 26                              | 23  | 40  | 10  | 1  | 100                                   | 137 |             |              |
| 2GD4  | 21                              | 22  | 41  | 10  | 6  | 100                                   | 158 | 146         | 8.7559       |
| 3GD1  | 27                              | 21  | 40  | 6   | 6  | 100                                   | 143 |             |              |
| 3GD2  | 27                              | 20  | 39  | 7   | 7  | 100                                   | 147 |             |              |
| 3GD3  | 25                              | 21  | 40  | 7   | 7  | 100                                   | 150 |             |              |
| 3GD4  | 29                              | 19  | 38  | 8   | 6  | 100                                   | 143 | 145.75      | 3.4034       |
| 4GD1  | 23                              | 19  | 43  | 9   | 6  | 100                                   | 156 |             |              |
| 4GD2  | 26                              | 20  | 42  | 6   | 6  | 100                                   | 146 |             |              |
| 4GD3  | 28                              | 19  | 42  | 6   | 5  | 100                                   | 141 |             |              |
| 4GD4  | 24                              | 18  | 40  | 10  | 8  | 100                                   | 160 | 150.75      | 8.7702       |
| <b>Total de células<br/>evaluadas</b>       | 408                             | 324 | 647 | 134 | 87 | 1600                                  |     |             |              |



Tabla IX. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula (GD) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 μM/10 min a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, Tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| T1GD1   | 3                            | 9   | 17  | 48  | 23  | 100                                | 279 |          |           |
| T1GD2   | 2                            | 7   | 17  | 47  | 27  | 100                                | 290 |          |           |
| T1GD3   | 5                            | 8   | 19  | 47  | 21  | 100                                | 271 |          |           |
| T1GD4   | 3                            | 8   | 21  | 40  | 28  | 100                                | 282 | 280.5    | 7.8528    |
| T2GD1   | 5                            | 8   | 18  | 47  | 22  | 100                                | 273 |          |           |
| T2GD2   | 4                            | 5   | 20  | 43  | 28  | 100                                | 286 |          |           |
| T2GD3   | 1                            | 10  | 16  | 48  | 25  | 100                                | 286 |          |           |
| T2GD4   | 4                            | 9   | 18  | 47  | 22  | 100                                | 274 | 279.75   | 7.2284    |
| T3GD1   | 4                            | 7   | 20  | 41  | 28  | 100                                | 282 |          |           |
| T3GD2   | 0                            | 8   | 19  | 41  | 32  | 100                                | 297 |          |           |
| T3GD3   | 3                            | 8   | 21  | 39  | 29  | 100                                | 283 |          |           |
| T3GD4   | 2                            | 8   | 25  | 42  | 23  | 100                                | 276 | 284.5    | 8.8881    |
| T4GD1   | 0                            | 4   | 25  | 43  | 28  | 100                                | 295 |          |           |
| T4GD2   | 1                            | 5   | 24  | 40  | 30  | 100                                | 293 |          |           |
| T4GD3   | 1                            | 1   | 26  | 43  | 29  | 100                                | 298 |          |           |
| T4GD4   | 0                            | 5   | 27  | 40  | 28  | 100                                | 291 | 294.25   | 2.9860    |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 38                           | 110 | 333 | 696 | 423 | 1600                               |     |          |           |

Tabla X. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo,<br>Tejido y No.<br>laminilla | Escala visual de daño al<br>ADN |     |     |    |    | No. de células<br>evaluadas/laminilla | UA  | Prom.<br>UA | Desv.<br>Est |
|---|---------------------------------|-----|-----|----|----|---------------------------------------|-----|-------------|--------------|
|   | 0                               | 1   | 2   | 3  | 4  |                                       |     |             |              |
| 1M1   | 48                              | 23  | 17  | 9  | 3  | 100                                   | 96  |             |              |
| 1M2   | 46                              | 22  | 18  | 9  | 5  | 100                                   | 105 |             |              |
| 1M3   | 49                              | 25  | 19  | 7  | 0  | 100                                   | 84  |             |              |
| 1M4   | 48                              | 24  | 17  | 7  | 4  | 100                                   | 95  | 95          | 8.6023       |
| 2M1   | 47                              | 32  | 18  | 2  | 1  | 100                                   | 78  |             |              |
| 2M2   | 49                              | 35  | 14  | 2  | 0  | 100                                   | 69  |             |              |
| 2M3   | 47                              | 32  | 13  | 3  | 5  | 100                                   | 87  |             |              |
| 2M4   | 50                              | 34  | 11  | 3  | 2  | 100                                   | 73  | 76.75       | 7.7620       |
| 3M1   | 47                              | 33  | 15  | 2  | 3  | 100                                   | 81  |             |              |
| 3M2   | 47                              | 35  | 15  | 2  | 1  | 100                                   | 75  |             |              |
| 3M3   | 45                              | 34  | 14  | 3  | 4  | 100                                   | 87  |             |              |
| 3M4   | 45                              | 32  | 12  | 5  | 6  | 100                                   | 95  | 84.5        | 8.5440       |
| 4M1   | 50                              | 31  | 12  | 6  | 1  | 100                                   | 77  |             |              |
| 4M2   | 49                              | 35  | 10  | 5  | 1  | 100                                   | 74  |             |              |
| 4M3   | 47                              | 31  | 11  | 6  | 5  | 100                                   | 91  |             |              |
| 4M4   | 45                              | 36  | 10  | 5  | 4  | 100                                   | 87  | 82.25       | 8.0570       |
| <b>Total de células<br/>evaluadas</b>       | 759                             | 494 | 226 | 76 | 45 | 1600                                  |     |             |              |

Tabla XI. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, Tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |   |     |      | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|---|-----|------|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2 | 3   | 4    |                                    |     |          |           |
| T1M1  | 1                            | 4  | 1 | 42  | 52   | 100                                | 340 |          |           |
| T1M2  | 2                            | 3  | 2 | 28  | 65   | 100                                | 351 |          |           |
| T1M3  | 2                            | 2  | 1 | 30  | 65   | 100                                | 354 |          |           |
| T1M4  | 2                            | 1  | 0 | 31  | 66   | 100                                | 358 | 350.75   | 7.7190    |
| T2M1  | 0                            | 1  | 1 | 33  | 65   | 100                                | 362 |          |           |
| T2M2  | 0                            | 0  | 0 | 32  | 68   | 100                                | 368 |          |           |
| T2M3  | 0                            | 0  | 1 | 30  | 69   | 100                                | 368 |          |           |
| T2M4  | 0                            | 5  | 0 | 31  | 64   | 100                                | 354 | 363      | 6.6332    |
| T3M1  | 2                            | 0  | 0 | 31  | 67   | 100                                | 361 |          |           |
| T3M2  | 0                            | 3  | 0 | 29  | 68   | 100                                | 362 |          |           |
| T3M3  | 0                            | 0  | 1 | 32  | 67   | 100                                | 366 |          |           |
| T3M4  | 0                            | 1  | 0 | 34  | 65   | 100                                | 363 | 363      | 2.1602    |
| T4M1  | 0                            | 1  | 0 | 30  | 69   | 100                                | 367 |          |           |
| T4M2  | 0                            | 0  | 1 | 36  | 63   | 100                                | 362 |          |           |
| T4M3  | 1                            | 0  | 0 | 37  | 62   | 100                                | 359 |          |           |
| T4M4  | 0                            | 0  | 1 | 31  | 68   | 100                                | 367 | 363.75   | 3.9475    |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 10                           | 21 | 9 | 517 | 1043 | 1600                               |     |          |           |

Tabla XII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B), 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |     |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3   | 4  |                                    |     |          |           |
| 1B1                                   | 30                           | 23  | 35  | 9   | 3  | 100                                | 132 |          |           |
| 1B2                                   | 33                           | 22  | 31  | 9   | 5  | 100                                | 131 |          |           |
| 1B3                                   | 29                           | 25  | 36  | 10  | 0  | 100                                | 127 |          |           |
| 1B4                                   | 30                           | 24  | 33  | 9   | 4  | 100                                | 133 | 130.75   | 2.6299    |
| 2B1                                   | 28                           | 26  | 37  | 8   | 1  | 100                                | 128 |          |           |
| 2B2                                   | 32                           | 25  | 31  | 9   | 3  | 100                                | 126 |          |           |
| 2B3                                   | 27                           | 23  | 35  | 10  | 5  | 100                                | 143 |          |           |
| 2B4                                   | 29                           | 26  | 37  | 6   | 2  | 100                                | 126 | 130.75   | 8.2209    |
| 3B1                                   | 27                           | 24  | 35  | 11  | 3  | 100                                | 139 |          |           |
| 3B2                                   | 30                           | 23  | 38  | 8   | 1  | 100                                | 127 |          |           |
| 3B3                                   | 25                           | 24  | 37  | 10  | 4  | 100                                | 144 |          |           |
| 3B4                                   | 31                           | 23  | 35  | 10  | 1  | 100                                | 127 | 134.25   | 8.6168    |
| 4B1                                   | 33                           | 27  | 33  | 6   | 1  | 100                                | 115 |          |           |
| 4B2                                   | 34                           | 25  | 34  | 6   | 1  | 100                                | 115 |          |           |
| 4B3                                   | 29                           | 26  | 36  | 6   | 3  | 100                                | 128 |          |           |
| 4B4                                   | 30                           | 28  | 37  | 5   | 0  | 100                                | 117 | 118.75   | 6.2383    |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 477                          | 394 | 560 | 132 | 37 | 1600                               |     |          |           |

Tabla XIII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 4 organismos, 4 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |    |      |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|----|------|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2  | 3    | 4   |                                    |     |          |           |
| T1B1  | 1                            | 4  | 1  | 53   | 41  | 100                                | 329 |          |           |
| T1B2  | 1                            | 4  | 2  | 64   | 29  | 100                                | 316 |          |           |
| T1B3  | 2                            | 3  | 1  | 66   | 28  | 100                                | 315 |          |           |
| T1B4  | 1                            | 4  | 1  | 61   | 33  | 100                                | 321 | 320.25   | 6.3966    |
| T2B1  | 0                            | 0  | 1  | 66   | 33  | 100                                | 332 |          |           |
| T2B2  | 1                            | 0  | 0  | 67   | 32  | 100                                | 329 |          |           |
| T2B3  | 0                            | 1  | 1  | 68   | 30  | 100                                | 327 |          |           |
| T2B4  | 2                            | 5  | 0  | 64   | 29  | 100                                | 313 | 325.25   | 8.4212    |
| T3B1  | 1                            | 0  | 0  | 66   | 33  | 100                                | 330 |          |           |
| T3B2  | 0                            | 2  | 1  | 68   | 29  | 100                                | 324 |          |           |
| T3B3  | 0                            | 0  | 1  | 67   | 32  | 100                                | 331 |          |           |
| T3B4  | 0                            | 0  | 0  | 67   | 33  | 100                                | 333 | 329.5    | 3.8729    |
| T4B1  | 0                            | 2  | 0  | 69   | 29  | 100                                | 325 |          |           |
| T4B2  | 1                            | 0  | 0  | 65   | 34  | 100                                | 331 |          |           |
| T4B3  | 0                            | 1  | 0  | 67   | 32  | 100                                | 330 |          |           |
| T4B4  | 1                            | 0  | 1  | 69   | 29  | 100                                | 325 | 327.75   | 3.2015    |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 11                           | 26 | 10 | 1047 | 506 | 1600                               |     |          |           |

Las figuras 13 y 14 muestran las gráficas de distribución de frecuencias de daño al ADN en los 4 tejidos y el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observando muy claramente el efecto del peróxido de hidrógeno sobre cada uno de estos tejidos. En la figura 13 las células están ubicadas en los primeros niveles (0, 1 y 2), un efecto inverso presentan las tratadas con peróxido de hidrógeno (gráfica 14), entrando en los niveles 3 y 4. Solo glándula digestiva presento una variación, ya que aproximadamente 200 células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ubicaron en el nivel 2.

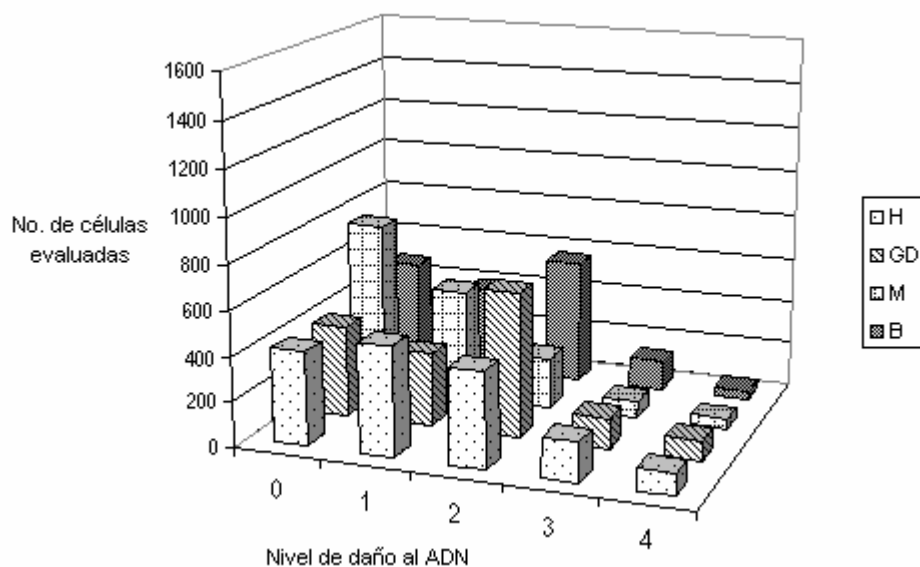


Figura 13. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos de *C. gigas* (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación.

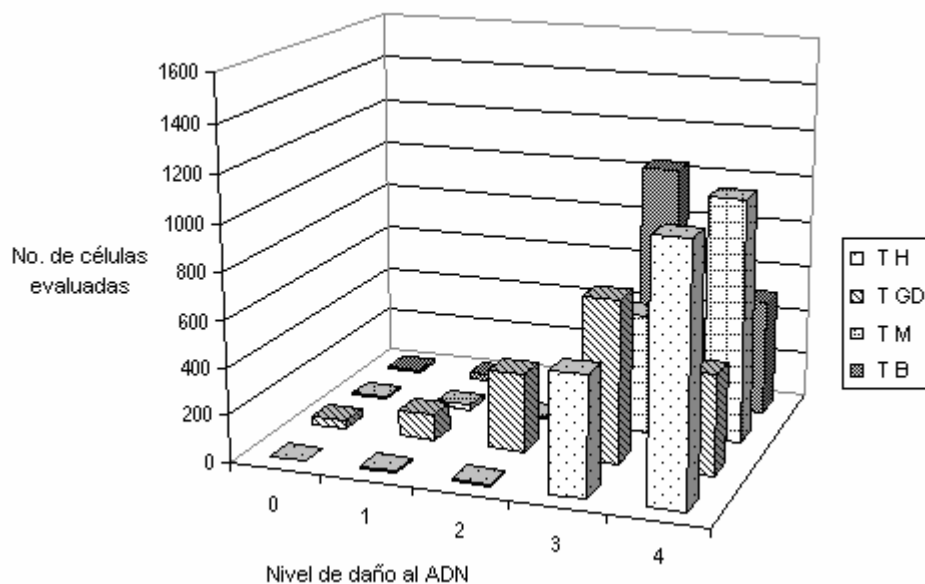


Figura 14. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 4 organismos de *C. gigas* tratados con  $H_2O_2$  50  $\mu M$ /10 min. a temperatura ambiente (4 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación.

La figura número 15 es un gráfico de comparación entre los 4 tejidos y el tratamiento con peróxido de hidrógeno en UA de daño al ADN. En el gráfico se aprecian diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tejidos normales y los tratados con peróxido de hidrógeno. Los tejidos sin ningún tratamiento se ubican cerca de las 100 y 150 UA, y los tratados con peróxido de hidrógeno están entre las 290 y 380 UA. Por otro lado, se logró apreciar cometas mejor definidos en los tejidos de manto y branquia. Esto se atribuyó al aumento de 5 min en la duración de la electroforesis.

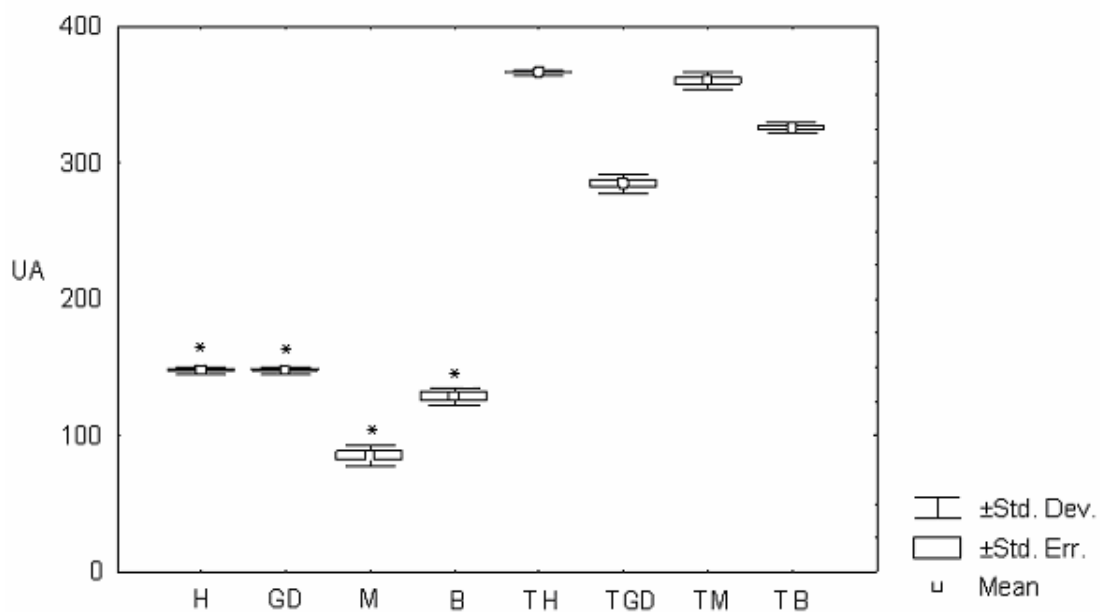


Figura 15. Comparación del daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 4 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B) de *C. gigas* y los tratados con peróxido de hidrógeno. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con  $H_2O_2$ .

### 6.3. Experimento III

Este experimento se realizó con la finalidad de corroborar los resultados del segundo. En esta ocasión se utilizaron solo 3 organismos (aclimatados y con un periodo de depuración de 15 días aprox.), 4 tejidos y 3 laminillas/tejido. Además, se realizó una filtración de las suspensiones celulares (GD, M y B) a través de una gasa doble, se determinó la viabilidad celular mediante 2 métodos: tinción dual CFDA-Br Et y tinción con azul tripano; las determinaciones se realizaron a los tejidos con y sin tratamiento de peróxido de hidrógeno (50  $\mu$ M durante 10 minutos a temperatura ambiente). Las graficas 16 y 17 con los porcentajes de viabilidad celular según los métodos CFDA-Br Et y Azul Tripano, son muy semejantes dado que el porcentaje de células viables disminuye con el tratamiento de peróxido de hidrógeno de forma similar en ambos gráficos.

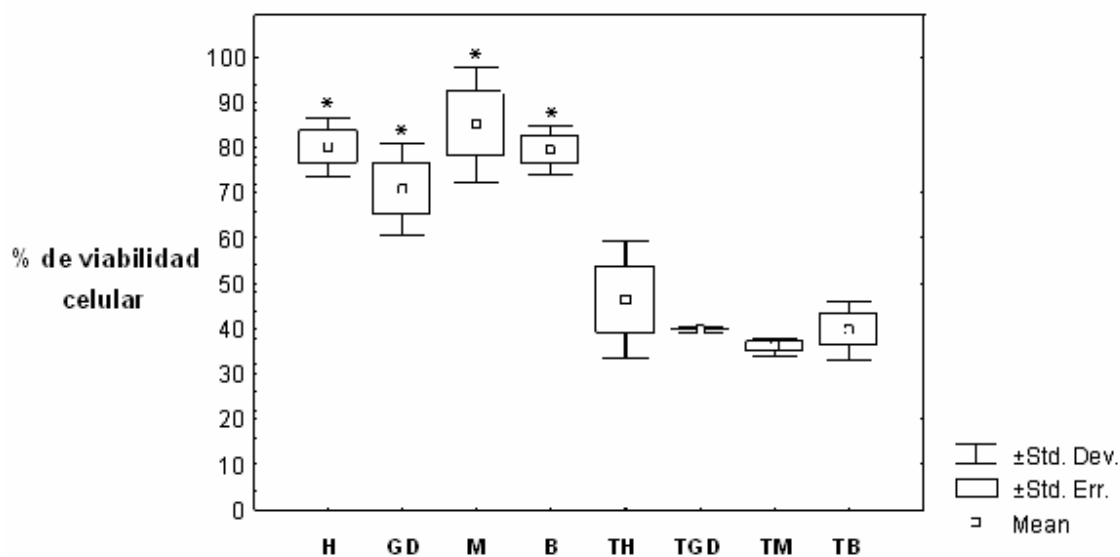


Figura 16. Porcentajes de viabilidad celular (tinción dual CFDA-Br Et) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos de *C. gigas* y los tratados con peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con  $H_2O_2$ .



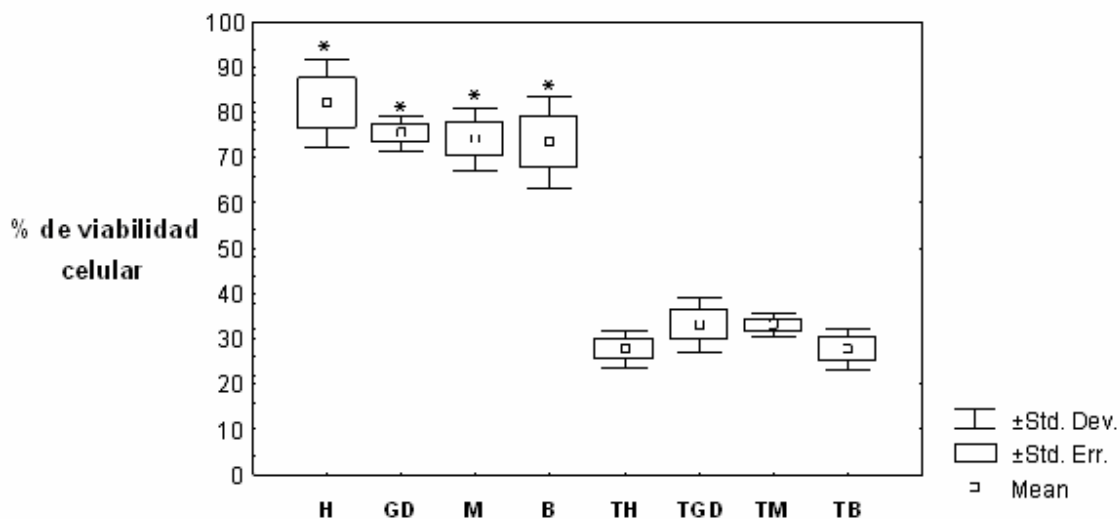


Figura 17. Porcentajes de viabilidad celular (tinción Azul tripano) en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos *C. gigas* y los tejidos tratados de peróxido de hidrógeno. Sin centrifugación. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con  $H_2O_2$ .

A partir de la tabla XIV y hasta la XXI, se reportan los resultados obtenidos en los 3 organismos y los 4 tejidos procesados, incluyendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno. En tales tablas es posible observar un comportamiento uniforme y congruente en todos los tejidos, lo cual es bien ilustrado en la graficas 18 y 19 de distribución de frecuencias de daño al ADN. En el caso del primer gráfico (figura 18) el mayor número de las células en los 4 tejidos se hallaron en los niveles 0 y 1, mientras que en el segundo gráfico (figura 19), el tratamiento con peróxido de hidrógeno ubicó la gran mayoría de las células en los niveles 3 y 4. Los gráficos 20 y 21 muestran las alteraciones del ADN en UA, donde los 4 tejidos se ubicaron por debajo de las 130 UA (figura 20) y por arriba de las 270 UA (figura 21).

Tabla XIV. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |    |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|----|----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3  | 4  |                                    |     |          |           |
| 1H1                                   | 42                           | 20  | 12  | 13 | 13 | 100                                | 135 |          |           |
| 1H2                                   | 48                           | 28  | 16  | 8  | 0  | 100                                | 84  |          |           |
| 1H3                                   | 39                           | 23  | 17  | 10 | 11 | 100                                | 131 | 116.6667 | 28.3607   |
| 2H1                                   | 44                           | 24  | 12  | 12 | 8  | 100                                | 116 |          |           |
| 2H2                                   | 44                           | 26  | 12  | 10 | 8  | 100                                | 112 |          |           |
| 2H3                                   | 45                           | 20  | 16  | 15 | 4  | 100                                | 113 | 118      | 8.8317    |
| 3H1                                   | 48                           | 28  | 20  | 4  | 0  | 100                                | 80  |          |           |
| 3H2                                   | 52                           | 34  | 10  | 2  | 2  | 100                                | 68  |          |           |
| 3H3                                   | 40                           | 27  | 19  | 10 | 4  | 100                                | 111 | 93       | 22.4944   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 402                          | 230 | 134 | 84 | 50 | 900                                |     |          |           |

Tabla XV. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de hemolinfa (H) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| T1H1  | 3                            | 14 | 21  | 27  | 35  | 100                                | 277 |          |           |
| T1H2  | 9                            | 10 | 19  | 22  | 40  | 100                                | 274 |          |           |
| T1H3  | 4                            | 4  | 16  | 16  | 60  | 100                                | 324 | 291.6667 | 28.0416   |
| T2H1  | 8                            | 12 | 18  | 25  | 37  | 100                                | 271 |          |           |
| T2H2  | 6                            | 8  | 16  | 20  | 50  | 100                                | 300 |          |           |
| T2H3  | 5                            | 14 | 15  | 23  | 43  | 100                                | 285 | 295      | 22.6715   |
| T3H1  | 0                            | 4  | 8   | 20  | 68  | 100                                | 352 |          |           |
| T3H2  | 7                            | 10 | 23  | 25  | 35  | 100                                | 271 |          |           |
| T3H3  | 5                            | 12 | 21  | 29  | 33  | 100                                | 273 | 295.25   | 38.3351   |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 47                           | 88 | 157 | 207 | 401 | 900                                |     |          |           |

Tabla XVI. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |    |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|----|----|------------------------------------|----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3  | 4  |                                    |    |          |           |
| 1GD1                                  | 63                           | 21  | 10  | 4  | 2  | 100                                | 61 |          |           |
| 1GD2                                  | 57                           | 27  | 11  | 3  | 2  | 100                                | 66 |          |           |
| 1GD3                                  | 50                           | 22  | 14  | 7  | 7  | 100                                | 99 | 75.33333 | 20.6478   |
| 2GD1                                  | 51                           | 24  | 11  | 8  | 6  | 100                                | 94 |          |           |
| 2GD2                                  | 54                           | 30  | 12  | 2  | 2  | 100                                | 68 |          |           |
| 2GD3                                  | 60                           | 20  | 14  | 3  | 3  | 100                                | 69 | 77       | 14.7309   |
| 3GD1                                  | 56                           | 25  | 10  | 6  | 3  | 100                                | 75 |          |           |
| 3GD2                                  | 62                           | 18  | 10  | 6  | 4  | 100                                | 72 |          |           |
| 3GD3                                  | 55                           | 29  | 8   | 5  | 3  | 100                                | 72 | 73       | 1.7320    |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 508                          | 216 | 100 | 44 | 32 | 900                                |    |          |           |

Tabla XVII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de glándula digestiva (GD) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| T1GD1   | 7                            | 9  | 13  | 15  | 56  | 100                                | 304 |          |           |
| T1GD2   | 7                            | 5  | 10  | 18  | 60  | 100                                | 319 |          |           |
| T1GD3   | 9                            | 11 | 12  | 15  | 53  | 100                                | 292 | 305      | 13.5277   |
| T2GD1   | 5                            | 5  | 12  | 16  | 62  | 100                                | 325 |          |           |
| T2GD2   | 2                            | 6  | 10  | 29  | 53  | 100                                | 325 |          |           |
| T2GD3   | 4                            | 5  | 9   | 33  | 49  | 100                                | 318 | 322.6667 | 4.0414    |
| T3GD1   | 2                            | 5  | 13  | 22  | 58  | 100                                | 329 |          |           |
| T3GD2   | 6                            | 9  | 10  | 25  | 50  | 100                                | 304 |          |           |
| T3GD3   | 8                            | 8  | 11  | 21  | 52  | 100                                | 301 | 311.3333 | 15.3731   |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 50                           | 63 | 100 | 194 | 493 | 900                                |     |          |           |

Tabla XVIII. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |    |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|----|----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3  | 4  |                                    |     |          |           |
| 1M1                                   | 44                           | 24  | 12  | 12 | 8  | 100                                | 116 |          |           |
| 1M2                                   | 36                           | 32  | 16  | 8  | 8  | 100                                | 120 |          |           |
| 1M3                                   | 48                           | 20  | 16  | 12 | 4  | 100                                | 104 | 113.3333 | 8.3266    |
| 2M1                                   | 60                           | 24  | 12  | 4  | 0  | 100                                | 60  |          |           |
| 2M2                                   | 48                           | 28  | 16  | 4  | 4  | 100                                | 88  |          |           |
| 2M3                                   | 52                           | 20  | 20  | 4  | 4  | 100                                | 88  | 78.66667 | 16.1658   |
| 3M1                                   | 48                           | 32  | 16  | 4  | 0  | 100                                | 76  |          |           |
| 3M2                                   | 64                           | 24  | 8   | 4  | 0  | 100                                | 52  |          |           |
| 3M3                                   | 56                           | 20  | 12  | 8  | 4  | 100                                | 84  | 70.66667 | 16.6533   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 456                          | 224 | 128 | 60 | 32 | 900                                |     |          |           |

Tabla XIX. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de manto (M) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |     |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|-----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2   | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| T1M1  | 0                            | 4  | 16  | 20  | 60  | 100                                | 336 |          |           |
| T1M2  | 0                            | 4  | 20  | 24  | 52  | 100                                | 324 |          |           |
| T1M3  | 0                            | 8  | 12  | 16  | 64  | 100                                | 336 | 332      | 6.9282    |
| T2M1  | 0                            | 4  | 12  | 16  | 68  | 100                                | 348 |          |           |
| T2M2  | 4                            | 0  | 12  | 28  | 56  | 100                                | 332 |          |           |
| T2M3  | 4                            | 4  | 8   | 20  | 64  | 100                                | 336 | 338.6667 | 8.3266    |
| T3M1  | 4                            | 0  | 8   | 28  | 60  | 100                                | 340 |          |           |
| T3M2  | 4                            | 4  | 8   | 16  | 68  | 100                                | 340 |          |           |
| T3M3  | 0                            | 0  | 20  | 28  | 52  | 100                                | 332 | 337.3333 | 4.6188    |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 16                           | 28 | 116 | 196 | 544 | 900                                |     |          |           |

Tabla XX. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B), 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |     |     |    |    | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---------------------------------------|------------------------------|-----|-----|----|----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|                                       | 0                            | 1   | 2   | 3  | 4  |                                    |     |          |           |
| 1B1                                   | 52                           | 20  | 12  | 8  | 8  | 100                                | 100 |          |           |
| 1B2                                   | 40                           | 28  | 20  | 8  | 4  | 100                                | 108 |          |           |
| 1B3                                   | 56                           | 24  | 12  | 4  | 4  | 100                                | 76  | 94.66667 | 16.6533   |
| 2B1                                   | 64                           | 28  | 4   | 4  | 0  | 100                                | 48  |          |           |
| 2B2                                   | 56                           | 28  | 8   | 4  | 4  | 100                                | 72  |          |           |
| 2B3                                   | 60                           | 20  | 12  | 4  | 4  | 100                                | 72  | 64       | 13.8564   |
| 3B1                                   | 56                           | 20  | 16  | 8  | 0  | 100                                | 76  |          |           |
| 3B2                                   | 68                           | 20  | 8   | 4  | 0  | 100                                | 48  |          |           |
| 3B3                                   | 60                           | 28  | 8   | 0  | 4  | 100                                | 60  | 61.33333 | 14.0475   |
| <b>Total de células evaluadas</b>     | 512                          | 216 | 100 | 44 | 28 | 900                                |     |          |           |

Tabla XXI. Resultados obtenidos mediante la técnica SCGE del tejido de branquia (B) tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 µM/10 min. a temperatura ambiente. 3 organismos, 3 laminillas/organismo.

| Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , No. organismo, tejido y No. laminilla | Escala visual de daño al ADN |    |    |     |     | No. de células evaluadas/laminilla | UA  | Prom. UA | Desv. Est |
|---|------------------------------|----|----|-----|-----|------------------------------------|-----|----------|-----------|
|   | 0                            | 1  | 2  | 3   | 4   |                                    |     |          |           |
| T1B1  | 0                            | 0  | 12 | 20  | 68  | 100                                | 356 |          |           |
| T1B2  | 0                            | 4  | 4  | 32  | 60  | 100                                | 348 |          |           |
| T1B3  | 4                            | 4  | 12 | 16  | 64  | 100                                | 332 | 345.3333 | 12.2202   |
| T2B1  | 4                            | 8  | 12 | 24  | 52  | 100                                | 312 |          |           |
| T2B2  | 0                            | 4  | 8  | 28  | 60  | 100                                | 344 |          |           |
| T2B3  | 4                            | 8  | 12 | 20  | 56  | 100                                | 316 | 324      | 17.4356   |
| T3B1  | 4                            | 8  | 12 | 16  | 60  | 100                                | 320 |          |           |
| T3B2  | 4                            | 4  | 8  | 28  | 56  | 100                                | 328 |          |           |
| T3B3  | 4                            | 0  | 8  | 24  | 64  | 100                                | 344 | 330.6667 | 12.2202   |
| <b>Total de células evaluadas</b>   | 24                           | 40 | 88 | 208 | 540 | 900                                |     |          |           |

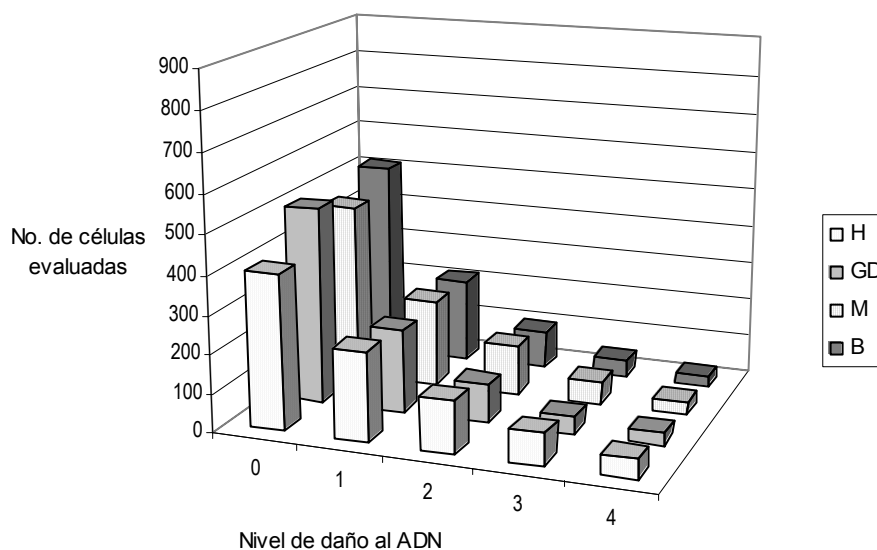


Figura 18. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) de 3 organismos de *C. gigas* (3 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación.

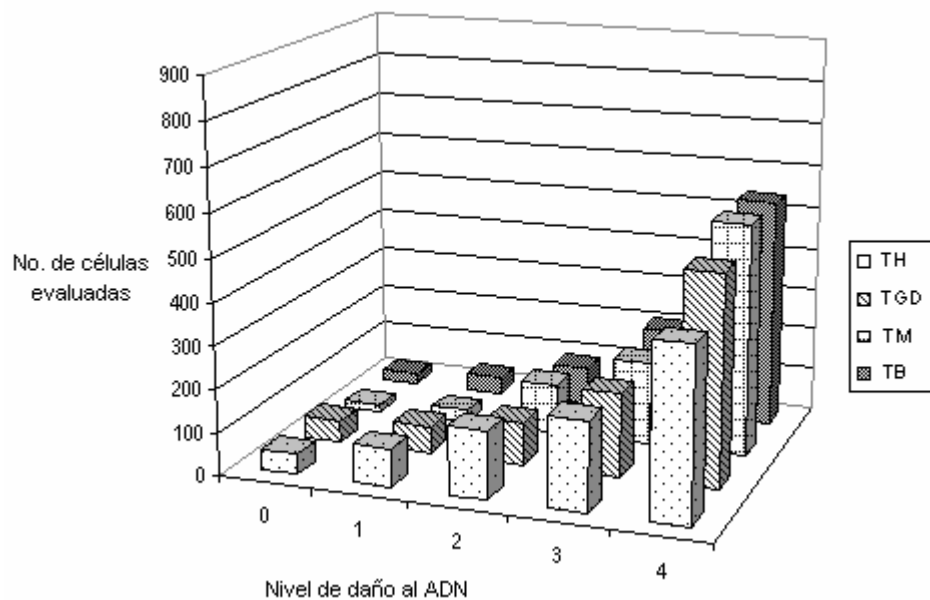


Figura 19. Gráfica de distribución de frecuencias de daño al ADN en los tejidos de hemolinfa (H), glándula digestiva (GD), manto (M) y branquia (B) tratados con  $H_2O_2$  50  $\mu M/10$  min. a temperatura ambiente de 3 organismos de *C. gigas* (3 laminillas/org, se evaluaron 100 cel/laminilla.). Sin centrifugación

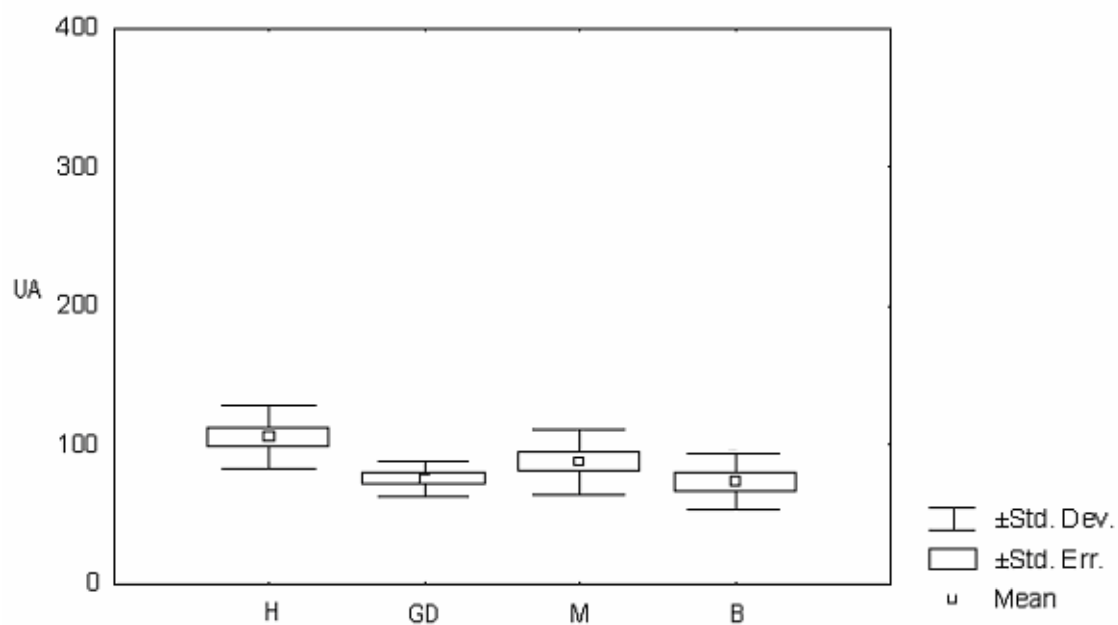


Figura 20. Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 3 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B) 3 laminillas/tejido de *C. gigas*.

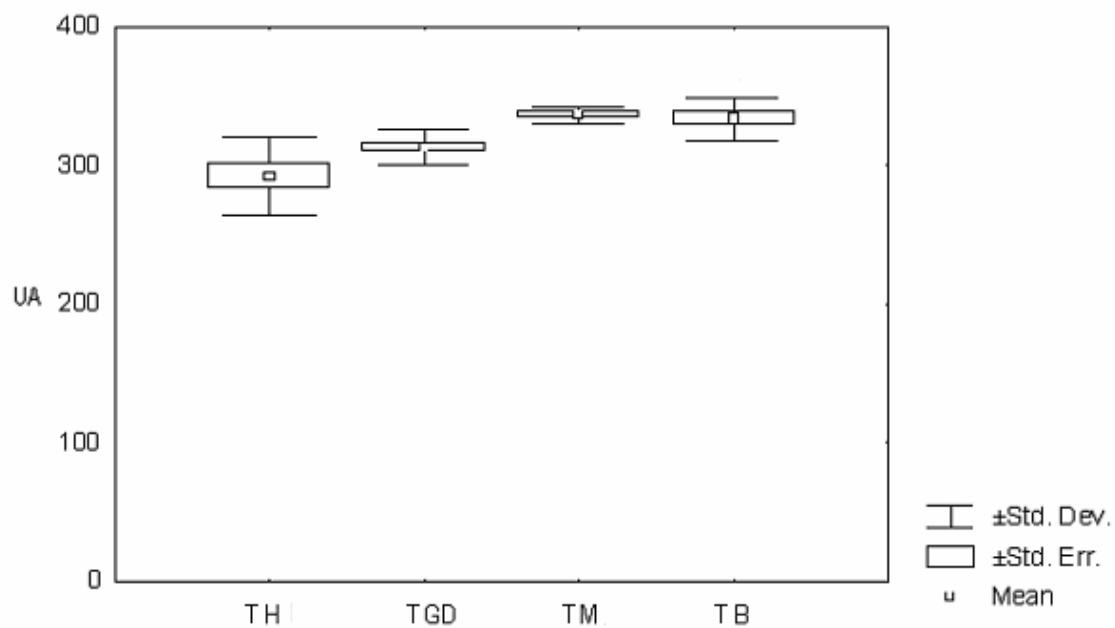


Figura 21. Daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) de 3 organismos en 4 tejidos (H, GD, M y B) 3 laminillas/tejido tratados con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M/10 min. a temperatura ambiente) de *C. gigas*.

#### 6.4. Comparación entre el experimento II y III

Finalmente en el grafico 22 se puede observar que ambos experimentos presentaron un comportamiento muy semejante, aunque con ciertas variaciones.

En los dos casos las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con peróxido de hidrógeno son muy marcadas.

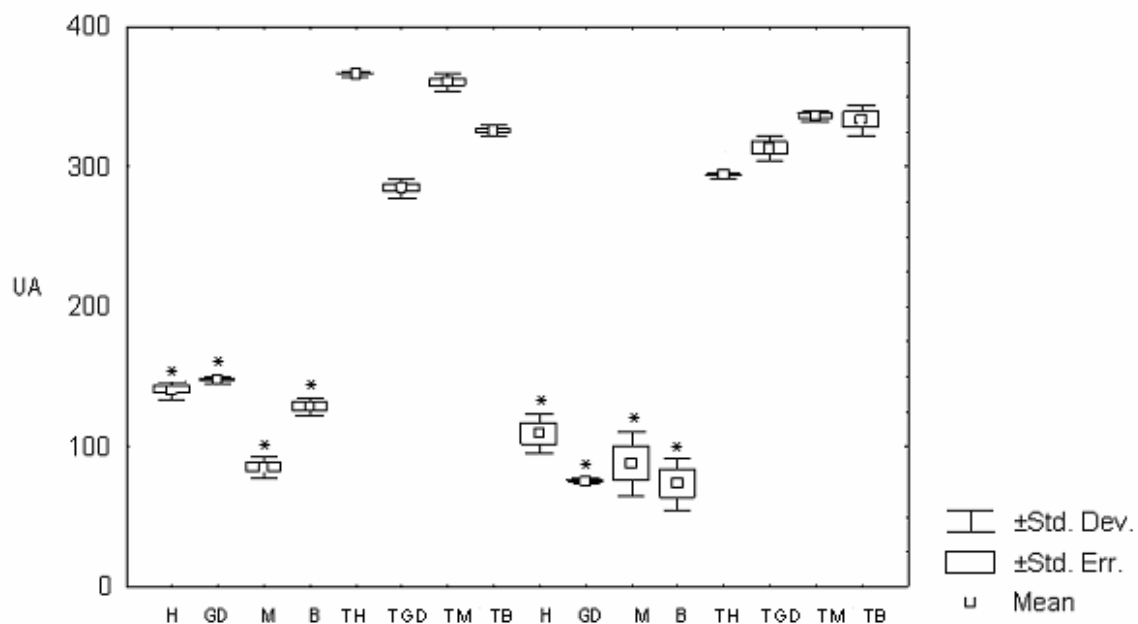


Figura 22. Comparación del daño al ADN en Unidades Arbitrarias (UA) del experimento II y III. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Finalmente en la figura 23 se observa una imagen de la clasificación de los 5 niveles de daño al ADN obtenidos mediante la técnica SCGE  $pH \geq 13$  y tinción con bromuro de etidio.



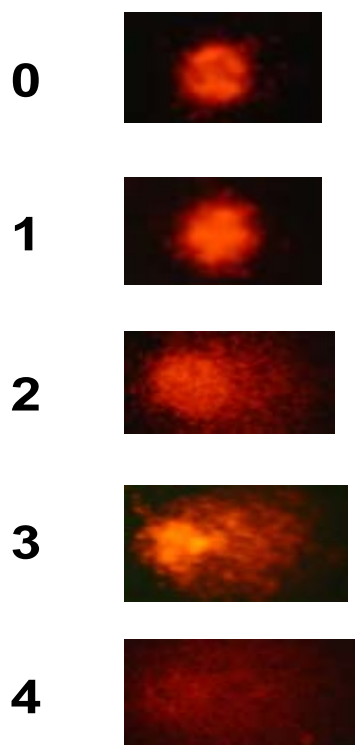


Figura 23. Imagen de la categorización de los diferentes niveles de daño del ADN en células de *C. gigas* mediante la técnica SCGE tinción con bromuro de etidio. La escala va del 0-4, el nivel 0 representa células sin daño, mientras que el nivel 4 indica células con el mayor grado de daño (también denominadas nubes). Las fotografías se realizaron a 400 X.

## VII. DISCUSIONES

La técnica SCGE es muy versátil, y puede ser estandarizada de acuerdo a las necesidades de cada estudio. Hoy en día es empleada en genotoxicología, área clínica, estudios de reparación del ADN, así como en biomonitoreos ambientales y humanos en distintos lugares del mundo (Rojas et al, 1999). En tales estudios se han utilizado organismos tan diversos como lo son: bacterias, peces, plantas, células humanas e invertebrados (Dixon et al, 2002).

En lo que respecta a especies marinas, se han realizado trabajos en organismos provenientes de áreas contaminadas por compuestos químicos de los cuales se conoce o presume potencial genotóxico. Entre las especies estudiadas se encuentran peces, crustáceos e invertebrados; enfocándose principalmente en *Mytilus edulis* (Mitchelmore et al, 1998a, Mitchelmore et al, 1998b; Wilson et al, 1998; Pruski and Dixon, 2002, Hartwig, 1998; Kitchin, 2001), además de otras especies de moluscos bivalvos como *Crassostrea virginica* (Nacci et al, 1996; Gielazyn et al, 2001), *Mytilus galloprovincialis* (Frenzilli et al, 2001) y *Tapes japonica* (Sasaki et al, 1997).

Es importante considerar que en un contexto toxicológico una gran mayoría de las lesiones del ADN y los rompimientos de cadena sencillos son rápidamente reparados por unión o escisión de bases. En contraste, los rompimientos de cadena doble tienen efectos mas serios y forman la base para muchas aberraciones cromosomales y moleculares (por ejemplo la regulación génica), teniendo graves consecuencias para la célula ya que el daño puede

ocasionar muerte celular o llegar hasta la transformación neoplásica. Los rompimientos de cadena doble pueden ser visualizados con la versión neutra (pH 8.3) de la técnica SCGE. Este pH ha probado ser muy eficiente en el caso de organismos bivalvos y poliquetos, en lo que se ha reportado poseen una alta incidencia natural de sitios lábiles al álcali (Dixon, 2002).

Los sitios álcali lábiles (tales como sitios apurinico/apirimidínicos) se observan como rompimientos de cadena simple o de una sola cadena a  $\text{pH} \geq 12.5$  (Fortini et al, 1996) la versión alcalina estándar del ensayo no permite la discriminación entre la ocurrencia natural de los sitios álcali lábiles y los rompimientos de cadena inducidos. Sin embargo, el perfeccionamiento de la metodología ha demostrado que es posible discriminar entre sitios álcali lábiles naturales ( $\text{pH} \geq 13$ ) y rompimientos de cadena simple ( $\text{pH} 12.1$ ). El desarrollo de varias versiones de esta técnica se ha traducido en una mayor habilidad para discriminar entre estos tres diferentes tipos de rompimientos de cadena, incrementándose enormemente la sensibilidad y la utilidad del método. Por esta razón la versión más recomendable en primera instancia es la que se realiza a  $\text{pH} \geq 13$ , ya que permite la detección de un amplio espectro de daños al ADN (Dixon, 2002), aunque cabe aclarar que la elección de una de estas 3 versiones dependerá principalmente de los objetivos de cada estudio.

Por otro lado, a pesar de ser esencialmente un método para medir rompimientos en el ADN, la introducción de un paso más en la metodología que consiste en el empleo de endonucleasas lesión específicas permite la detección de, por ejemplo: dímeros de pirimidina inducidos por luz UV, bases oxidadas y daño ocasionado por agentes

alquilantes. Las bases oxidadas pueden ser detectadas con la endonucleasa III FPG en células que han sido tratadas con  $H_2O_2$  (Collins, 2004); siendo corroborada por varios autores en diferentes especies (Lee and Steinert, 2003 Dusinska, M. 2000)

Otra de las alteraciones que es posible detectar mediante la técnica SCGE es la presencia de inter cruzamientos ADN-ADN y/o ADN-proteína; lo que se evidencia por una disminución en la migración del ADN. El incremento en la duración de la electroforesis facilita la detección de inter cruzamientos mediante la comparación entre células control y las estudiadas. Otro método para detectar inter cruzamientos esta basado en el empleo de rayos X con la finalidad de romper inter cruzamientos, comparando la migración del ADN con y sin tratamiento de rayos X (Lee and Steinert, 2003).

Entre los puntos débiles de esta técnica se han reportado niveles significativos de variabilidad entre individuos, incluyendo la variabilidad temporal la cual influye en la respuesta tanto en estudios de laboratorio como de campo. Recientemente, en un trabajo realizado con mejillones de un sitio contaminado no se encontró daño significativo en comparación con el sitio de referencia. Esto ha sido interpretado como una respuesta adaptativa (previniendo efectos dañinos sobre el ADN), en poblaciones crónicamente expuestas a contaminación (Shaw et al, 2000; Large, 2002). Otro punto igualmente importante es que el daño al ADN puede surgir como resultado de procesos no relacionados con la exposición a mutágenos y clastogenicidad. Por ejemplo, los estresores físicos y químicos (luz solar, alta temperatura e incremento en la salinidad) son conocidos como causantes de daño al ADN a través de procesos ligados a la desestabilización enzimática

lisosomal como parte de una respuesta general de estrés. En estos casos, el daño es usualmente reversible y reparado una vez que los organismos regresan a sus condiciones normales (Dixon et al, 2002). Además existen otras propiedades de las células capaces de influir sobre los resultados, incluyendo el estado del ciclo celular, por ejemplo, células que están en fase S contienen horquillas de replicación, comportándose como un rompimiento de cadena simple, lo cual genera falsos positivos al “incrementar” el nivel de daño observado en el ADN (Olive, 1999).

Así mismo, es igualmente importante considerar la reparación del ADN (sobre la cual pueden influir la variabilidad temporal en los niveles de enzimas de desintoxicación, el estado reproductivo y los procesos de envejecimiento) y la muerte celular programada (Speit y Hartmann, 1995; Choucroun et al, 2001).

Por otro lado, las variaciones en el protocolo entre un laboratorio y otro pueden incrementar las diferencias en los resultados. La elección de la composición del buffer de lisis, la duración del desenrollamiento y electroforesis son importantes variables que pueden modificar el resultado final. Otro elemento crítico es el procedimiento de disociación celular elegido. Se ha reportado una reducción en la integridad del ADN en células tratadas con tripsina, enzima utilizada comúnmente en los procesos de disociación de tejidos. Sin embargo, algo similar ocurre cuando no se emplea un método enzimático para aislar las células de branquia, encontrándose un incremento en el daño al ADN después de largos periodos de disociación.

Otra limitante de la técnica lo representa la criopreservación, ya que mientras las células criopreservadas han sido usadas exitosamente en estudios con mamíferos; el contenido de

sal en células de invertebrados marinos (equivalente a 3.5% de sal) trae como consecuencia altos niveles de daño celular ocurridos durante el congelamiento (Dixon et al, 2002). Similarmente, la transportación de animales vivos puede por si misma aumentar los niveles de daño al ADN, como resultado de los efectos del estrés, por ejemplo, desestabilización lisosomal. Además la elaboración de laminillas y electroforesis idealmente deben ser realizados al tiempo de la recolección de los organismos, lo cual hace más compleja la aplicación de este método en estudios de campo (Dixon et al, 2002). Las laminillas una vez elaboradas pueden conservarse en solución de lisis a 4° C hasta por 3 meses sin ningún incremento aparente en el daño al ADN. Sin embargo, las condiciones de cada laboratorio son determinantes pudiendo influir negativamente sobre los resultados (Steinert et al, 1998a; Tice et al, 2000).

Como ya se ha mencionado, la técnica SCGE ha sido aplicada en numerosos estudios para determinar alteraciones en el ADN en organismos acuáticos expuestos a genotóxicos tanto *in vivo* como *in vitro*, incluyendo biomonitoreos. En años recientes, al efectuar una revisión acerca de la validez de este método en estudios de laboratorio y monitoreo ambiental, se encontró que las guías para el uso de la SCGE han sido bien definidas en genotoxicología de mamíferos (Tice et al, 2000). Mientras que en el caso de invertebrados marinos los protocolos no han sido bien estandarizados. La principal dificultad al utilizar esta metodología en trabajos ambientales es la comparación de los resultados con otros estudios, ya que se emplean diferentes protocolos. Por este motivo, es necesario realizar estudios mas profundos (incluyendo la estandarización del protocolo), para que la técnica SCGE sea usada como un biomarcador estándar en ambientes acuáticos (Lee and Steinert, 2003).

El propósito del presente trabajo es la estandarización de la técnica SCGE para evaluar alteraciones en el ADN del ostión japonés *C. gigas*. Durante este estudio se comparó la sensibilidad, confiabilidad y eficacia de 4 diferentes tejidos (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia), utilizando un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente estresor. Para cumplir con tales objetivos, se realizaron 3 experimentos, a través de los cuales se probó la viabilidad de varios procedimientos para estandarizar la técnica SCGE en 4 tejidos de *C. gigas*. Solo en los experimentos II y III se realizó un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **7.1. Experimento I**

En este experimento, se utilizaron 4 organismos (con 24 hrs. de aclimatación), 3 tejidos (glándula digestiva, manto y branquia) 4 laminillas por tejido. El protocolo contempló la obtención de la suspensión celular en una solución salina al 3% estéril y a 4° C que actuara como una solución isotónica manteniendo la integridad celular. A partir de cada suspensión celular se tomó un volumen (500 µL de glándula digestiva y 800 µL de manto y branquia) y se realizó una centrifugación a 300 g a 4° C/ 5 min. para obtener un botón celular y preparar una suspensión más concentrada.

El siguiente paso es la determinación del porcentaje de viabilidad celular y densidad celular (se requieren entre 10 000 y 50 000 cel/laminilla). En el caso de este primer experimento la determinación de viabilidad celular se efectuó mediante el método de tinción dual FDA-BrEt, el cual mostró la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los 3 tejidos, ya que el tejido de glándula digestiva presentó un 70%, manto 60%, mientras que branquia un 30% de viabilidad celular respectivamente. El siguiente paso fue embeber las células en 75 µL de agarosa LMP 0.5%, la densidad celular empleada fue de 20 000 cel/laminilla, y

colocarlas sobre una laminilla con una capa de agarosa R 0.5 % (las condiciones ambientales pueden influir sobre la capacidad de adherencia de la agarosa a las laminilla, determinando la concentración del gel (Rojas y Valverde com. pers.), se dejó solidificar en refrigeración y posteriormente se aplicó una tercera capa de agarosa LMP 0.5%. Esto dió lugar a la formación de una especie de sándwich (formado por 3 capas de agarosa) sobre un portaobjetos o laminilla. El número de capas de agarosa pueden variar, generalmente a consideración de cada investigador, algunos aseguran que una tercera capa de agarosa puede influir negativamente en la evaluación de las laminillas por la formación de ruido de fondo. Sin embargo, es conveniente aclarar que la aplicación de una tercera capa de agarosa brinda protección a la capa donde se encuentran las células, por lo que en la metodología aquí empleada se consideraron las 3 capas (Rojas et al, 1999).

Continuando con el desarrollo del experimento, las células fueron lisadas, a partir de este momento todos los pasos se realizan bajo luz amarilla, para evitar que la luz blanca genere daño al ADN. La lisis se lleva a cabo empleando detergentes y altas concentraciones salinas (pH 10) durante al menos 1 h (la lisis remueve los contenidos celulares excepto el material del núcleo resultando ADN superenrollado en presencia de una pequeña cantidad de proteínas no histonas). En el siguiente paso, las laminillas son sometidas a un ambiente alcalino, con lo que se propicia el desenrollamiento del ADN, periodo que constó de 5 min. al finalizar este se efectúa la electroforesis realizada bajo condiciones alcalinas y con una duración de 10 min. aplicándose 25 V, 300 mA. Se recomienda aplicar 0.5-1 V/cm. en función de las medidas de la cámara de electroforesis empleada (Tice et al, 2000). Es conveniente aclarar que los tiempos de desenrollamiento y electroforesis deben ser



estandarizados cada vez que se trabaje con un tejido u organismo diferente. Después de la electroforesis, la solución alcalina en los geles es neutralizada por lavados con Tris base pH 7.5 y están listas para ser observadas al microscopio (Rojas et al, 1999); o bien pueden ser deshidratadas en alcohol absoluto y secarse al aire para almacenarse a temperatura ambiente (Klaude et al, 1996). Facilitándose de esta forma su análisis y revisión posterior.

El análisis de las laminillas en este trabajo se realizó clasificando 100 células de acuerdo a una escala visual de daño al ADN, y mediante la determinación de unidades arbitrarias (UA) tiñendo con bromuro de etidio (por su alta especificidad con los ácidos nucleicos). En otros trabajos la colección de datos se efectúa de forma muy similar tiñendo las células con bromuro de etidio o bien otro colorante apropiado (ioduro de propidio, DAPI, naranja de acridina o tinción con plata, cada uno de ellos con sus respectivas ventajas y desventajas) y visualizándolas bajo un microscopio de fluorescencia. La evaluación se realiza manualmente a partir de 50-100 células por laminilla o bien usando un programa especializado como lo son: Kinetic Imaging software, Comet Analysis, etc. solo por mencionar algunos de ellos. Existen alrededor 34 parámetros supervisados los programas computacionales, no obstante los más usados son el % de ADN de la cola (tail DNA %), la longitud de la cola en micrómetros  $\mu\text{m}$  (tail length), y el “olive tail moment” (Olive et al, 1990b citado por Tice et al, 2000).

Una de las formas de efectuar el conteo manual es clasificando 100 cometas en una escala visual de 0-4, dependiendo de la integridad del núcleo y de la longitud de la cola de los cometas, siendo 0 ausencia de daño y 4 el mayor daño, de tal manera que el nivel de daño (en Unidades Arbitrarias) por cada muestra puede variar entre 0 y 400 (Collins, 2004).

Realizada la colección de datos el siguiente paso es el análisis de los mismos, los métodos estadísticos a emplear deben ser definidos inicialmente, durante el diseño del experimento (Mitchelmore et al, 1998). En otros casos, es posible realizar un análisis exploratorio de los datos para probar normalidad. En función de estos resultados se determinará la aplicación de un método paramétrico o no paramétrico (Lee and Steinert, 2003; Pandrangi et al, 1995). En el caso del presente trabajo se realizó un análisis de varianza, seguida de la prueba de Tukey (Programa Statistica versión 5.0) para evaluar la significancia estadística de las diferencias encontradas entre los distintos tipos celulares y el tratamiento con peróxido de hidrógeno.

En el primer experimento utilizando tejido de glándula digestiva, manto y branquia de 4 organismos y de las 4 laminillas elaboradas por cada animal; la cantidad de células evaluadas por laminilla fue de 100, sumando un gran total de 1600. En los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia procesados mediante el protocolo que incluye los pasos de centrifugación no hay un comportamiento uniforme ya que existen grandes diferencias en la distribución de frecuencias de daño al ADN y UA, lo cual se hizo más evidente con las desviaciones estándar. Esto puede explicarse de la siguiente manera, la fuerza centrífuga aplicada produjo la disociación celular (Nolasco Soria, 2004), de forma que los ácidos nucleicos se vuelven más susceptibles a la acción de nucleasas. Efecto que de ocurrir podría ser incrementado por el efecto de la fase lítica de la técnica o bien generado por ésta.

En la distribución de frecuencias de daño al ADN y en UA respectivamente, la mayoría de

las células se encuentran en los niveles más altos de daño al ADN en los 3 tejidos. Sin embargo, específicamente en UA las diferencias entre los 4 organismos en cuanto al comportamiento de cada tejido son muy marcadas, ya que mientras la glándula digestiva del organismo 1 se encuentra en las 270 UA, y el organismo 2 en 210 UA, los organismos 3 y 4 están arriba de las 350 UA. En lo que respecta al manto, el organismo 1 está ubicado en las 210 UA, los organismos 2, 3 y 4 presentaron un comportamiento muy similar, alrededor de las 300 UA. En cuanto a las branquias los organismos 1 y 2 presentaron diferencias muy marcadas, ya que el primero está en 200 y el segundo en 300 UA. Los organismos 3 y 4 se encontraron arriba de las 350 UA. En este sentido, Rojas y colaboradores (1999) mencionan que es muy frecuente encontrar alta variabilidad entre tejidos y organismos; y que es muy importante que cada paso en la metodología se adapte a cada tipo de célula estudiada.

#### **7.1.1. Control interno: linfocitos humanos**

Para obtener un control en cada corrida de electroforesis que actuara como un indicador de que la metodología es seguida adecuadamente, se aislaron linfocitos humanos (85 % viabilidad con CFDA -Et Br) y se trataron con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M/10 min. Se elaboraron 16 laminillas y se corrieron 4 de ellas en cada corrida, realizándose un total de 4 corridas; en forma similar a lo reportado en otros estudios (Collins, 2004). Los resultados mostraron que el comportamiento de las células sometidas a este tratamiento es congruente, ya que la mayoría de las células se ubicaron dentro de los niveles 3 y 4 de daño al ADN y entre 345 y 350 UA, existiendo mínimas variaciones, dando como resultado un patrón muy uniforme en las 4 corridas.

## 7.2. Experimento II

En este experimento se utilizaron 4 organismos (aclimatados y con un periodo de depuración de 15 días aprox.) y 4 laminillas por tejido. Se utilizó un método para extracción de hemolinfa realizando un corte en las valvas del ostión, logrando de esta manera evitar la contracción del músculo aductor (lo que había provocado el fracaso de otros intentos, ya que al separar completamente las valvas de organismo su músculo se contrae no permitiendo la obtención de la hemolinfa), por lo que se sumó un tejido mas al experimento, dando un total de 4 tejidos. Además se incluyó el tratamiento con  $H_2O_2$  50  $\mu$ M/10 min. a temperatura ambiente para los 4 tejidos.

Primeramente se determinaron las viabilidades celulares de los 4 tejidos (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia) presentando entre el 60 y 70 %, mediante el método de tinción dual CFDA-Et Br. Enseguida se procedió a la elaboración de las laminillas (densidad celular de 20 000 cel/laminilla), una vez listas se sometieron a un proceso de lisis durante 1 h y desenrollamiento de 5 min. (para los 4 tejidos), mientras que la duración de la electroforesis para hemolinfa y glándula digestiva fue de 10 min. y de 15 min. para los tejidos de manto y branquia. Esto debido a que en el primer experimento se percibió un halo alrededor del ADN de estos 2 últimos tejidos. Por este motivo se probó aumentar la duración de la electroforesis para obtener cometas mejor definidos.

Los resultados obtenidos en los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia incluyendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno fueron satisfactorios, ya que las células sin ningún tratamiento se ubicaron en los niveles más bajos de la escala de daño al ADN, mientras que las células de los tejidos tratados con peróxido de hidrógeno observaron el nivel mas alto. Lo mismo ocurrió con la distribución de frecuencias de daño

al ADN en los 4 tejidos y el tratamiento con  $H_2O_2$ , reflejando muy claramente el efecto del peróxido de hidrógeno sobre cada uno de estos tejidos. Las células se ubicaron en los primeros niveles (0, 1 y 2), mientras que las tratadas con peróxido de hidrógeno presentaron un efecto inverso, entrando en los niveles 3 y 4. Solo glándula digestiva presentó una variación, ya que aproximadamente 200 células tratadas con  $H_2O_2$  se ubicaron en el nivel 2, quizá el hecho de que se trate de un tejido involucrado directamente en la desintoxicación del organismo influyó en la respuesta ante este agente químico.

La comparación entre los 4 tejidos y el tratamiento con peróxido de hidrógeno en UA de daño al ADN permitió apreciar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre éstos. Los tejidos sin ningún tratamiento se ubicaron cerca de las 100 y 150 UA, y los tratados con peróxido de hidrógeno están entre las 290 y 480 UA. Por otro lado, se logró apreciar cometas mejor definidos en los tejidos de manto y branquia. Esto se atribuyó al aumento de 5 min. en la duración de la electroforesis.

### **7.3. Experimento III**

Este experimento se realizó con la finalidad de corroborar los resultados del segundo. En esta ocasión se utilizaron solo 3 organismos (aclimatados y con un periodo de depuración de 15 días aprox.), 4 tejidos y 3 laminillas/tejido. Dentro de las recomendaciones para realizar la técnica SCGE se menciona el incluir un mínimo de 4 - 5 organismos por cada grupo experimental. Dependiendo del número de tejidos a evaluar y del número de laminillas o réplicas por cada tejido. Así mismo, mencionan que puede usarse un menor número de organismos por grupo experimental, siempre y cuando sea justificado (Wiklund and Agurell, 2002 citado por Hartmann, 2003).

En este mismo experimento se realizó una filtración de las suspensiones celulares (en los tejidos de glándula digestiva, manto y branquia) a través de una gasa doble, para eliminar los excedentes celulares, ya que estos dificultaban la manipulación de la suspensión celular en los anteriores experimentos. En este caso también se observaron resultados favorables al disminuir considerablemente tales excedentes.

La determinación de la viabilidad celular mediante tinción dual CFDA-Et Br y tinción con azul tripano; tuvieron resultados muy semejantes dado que el porcentaje de células viables en los tejidos disminuyó con el tratamiento de peróxido de hidrógeno de forma similar en ambos casos. Se consideró incluir los 2 métodos ya que la determinación de viabilidad celular, es un requisito importante para la realización de la técnica SCGE porque permite distinguir entre daño citotóxico o genotóxico. El método de tinción por exclusión con azul tripano; es rutinariamente utilizado en muchos laboratorios. Esta técnica, sin embargo, no mide la viabilidad celular, simplemente indica la integridad de la membrana. De tal forma que células con membrana dañada son azul tripano – positivas, pero estas pueden recuperarse y sobrevivir, otras por el contrario pueden presentar una membrana aparentemente íntegra y encontrarse muertas (Collins, 2004). Esto ha motivado el uso del método de tinción dual CFDA- Et Br, muy útil en la determinación de células metabólicamente competentes y/o con una membrana celular comprometida. Se consideran como aceptables porcentajes de viabilidad  $\geq 70-80\%$  (Tice et al, 2000). En el presente trabajo se encontró una disminución en la viabilidad celular a través de los dos diferentes métodos de utilizados. Mientras que en otros trabajos la viabilidad celular solo se determina empleando el método de tinción con azul tripano al trabajar con concentraciones de 0- 200

$\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y a  $4^\circ\text{C}$  no reportando disminución en el porcentaje de células viables (Mitchelmore et al, 1998b).

En el caso de la distribución de frecuencias de daño al ADN, los resultados obtenidos en los 3 organismos y los 4 tejidos procesados, incluyendo el tratamiento con peróxido de hidrógeno, observan un comportamiento uniforme y congruente en todos los tejidos. La gran mayoría de las células en los 4 tejidos se hallaron en los niveles 0 y 1; mientras que el tratamiento con peróxido de hidrógeno ubicó un gran porcentaje de células en los niveles 3 y 4. Obteniendo similar comportamiento en UA de alteraciones del ADN. En este aspecto, bajos porcentajes de viabilidad celular por lo general se traducen en efectos no genotóxicos. Sin embargo, no debe dejarse de considerar el efecto de la temperatura (tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $50\ \mu\text{M}/10\ \text{min.}$  y a temperatura ambiente,  $25^\circ\text{C}$  aprox.) ya que el aumento de la misma pudo haber incrementado la acción del peróxido de hidrógeno. Otro factor que podría haber influido es la edad de los organismos, ya que se ha comprobado que la edad interfiere en la respuesta y reparación de daño al ADN (Dixon et al, 2002). Aunque dentro del presente trabajo no se haya evaluado la reparación del ADN, los resultados reportados por Dixon y colaboradores proporcionan una idea a cerca de la susceptibilidad de los organismos adultos ante la exposición al peróxido de hidrógeno y los xenobióticos.

Como ya antes se menciona, muchos son los factores que pueden influir en la confiabilidad y reproducibilidad de los resultados al trabajar con la técnica SCGE.

Para analizar los resultados obtenidos en este experimento (III), es necesario tener en mente que los organismos tuvieron un proceso de aclimatación y depuración de 15 días aprox.; considerar además que las alteraciones observadas en el ADN mediante la técnica SCGE,

pueden ser debidas a efectos citotóxicos o bien a lesiones ocurridas durante la reparación del mismo y por apoptosis. En este sentido, la disminución de la viabilidad celular observada a través de las 2 técnicas empleadas después del tratamiento con  $H_2O_2$ , y dado que las células apoptóticas aparentemente no son distinguibles por los métodos comúnmente empleados en la determinación de viabilidad celular, y que el peróxido de hidrógeno se encuentra entre los agentes conocidos por inducir apoptosis y necrosis (Singh, 2000); es probable que los altos niveles de daño observados en este experimento se deban a uno de estos eventos. Ahora bien, algunos autores citan que las células apoptóticas se observan en forma de nubes, considerando lo anterior como un útil indicador de cualquier heterogeneidad en la respuesta celular (Hartmann, 2000). Por el contrario otras fuentes reportan que estas células no pueden ser consideradas como apoptóticas (manejaando este proceso como irreversible), y que en células observadas como nubes (por ejemplo, células tratadas con  $H_2O_2$  en concentraciones subletales) el daño en su ADN puede ser reparado. Además, se menciona que la apoptosis se caracteriza por la fragmentación del ADN, de tal manera que los fragmentos pequeños de ADN generalmente desaparecen durante la lisis o electroforesis. Algunas veces las células apoptóticas pueden presentar pequeños porcentajes de ADN normal, lo cual se atribuye a la presencia de residuos de ADN de alto peso molecular (Collins et al, 1997). La apoptosis resulta en la formación extensiva de rompimientos de cadena doble. Las células apoptóticas muestran fragmentación masiva de ADN, de tal manera que al realizar la técnica SCGE el ADN se encuentra casi por completo fuera del núcleo celular. Se ha encontrado una excelente correlación entre la concentración de células apoptóticas determinadas mediante SCGE y otros métodos utilizados para la determinación de apoptosis. Con el propósito mejorar la sensibilidad de



la SCGE en la detección de células apoptóticas, se ha modificado el protocolo omitiendo la electroforesis. Los pequeños fragmentos de ADN forman un halo alrededor del núcleo. Dicha modificación a la técnica SCGE, es denominada the halo assay (Lee y Steinert, 2003) también conocida como ensayo de difusión radial del ADN (DNA diffusion assay), en el que las células son embebidas en agarosa y lisadas, en forma semejante que la técnica SCGE; solo que en lugar de electroforesis el ADN es precipitado con etanol. Las células apoptóticas presentan un halo alrededor del núcleo, debido al ADN difundido en la agarosa y las células necróticas se observan considerablemente grandes, además de que poseen un pobre y muy poco definido borde externo (Sestili y Cantoni, 1999). Una de las versiones comerciales de esta técnica es la DASH Comet assay (Diffusion Apoptosis Slide Halo) puesta en el mercado por Trevigen, Inc. en el 2004. Retomando el concepto de apoptosis, es importante considerar que es un proceso dependiente de energía, por lo tanto requiere la participación de proteínas y otras macromoléculas celulares y aparentemente puede ser inducida mediante un estímulo genotóxico. Sin embargo, cuando la intensidad del estímulo se incrementa, la muerte celular programada se desvía a necrosis. Esto debido a que la intensidad del estímulo genotóxico daña las proteínas (o los genes que las codifican) y otras macromoléculas las cuales son requeridas para la apoptosis (Singh, 2000). Esto sugiere que bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo (experimento III) el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$  50  $\mu$ M/10 min. y a temperatura ambiente) podría haber generado necrosis en los 4 tejidos tratados (hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia). Sin embargo, es necesario efectuar estudios posteriores para corroborar tales resultados

#### **7.4. Comparación entre el experimento II y III**

Finalmente la comparación entre el experimento I y II permitió observar un comportamiento muy semejante en ambos experimentos, aunque con ciertas variaciones. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de los tejidos normales con respecto al tratamiento con peróxido de hidrógeno son muy evidentes en los dos casos.

En lo que se refiere a los tejidos utilizados, cabe aclarar que en los 4 tipos pueden encontrarse resultados muy interesantes en el aspecto genotóxico. Sin embargo, hemolinfa y glándula digestiva producen resultados más fácilmente reproducibles, ya que la obtención de suspensiones celulares a partir de estos tejidos es sencilla y rápida. En el caso de manto y branquia, es difícil su disociación por que son tejidos que se caracterizan por ser más rígidos que los anteriores, así que es necesario invertirles más tiempo. Algunos autores citan que la branquia posee niveles basales de daño muy altos, posiblemente debido a que está mas directamente expuesta al ambiente y por lo tanto está expuesta a agentes dañinos (Rigonato et al, 2005).

Particularmente la hemolinfa puede ser considerada como el mejor tejido, ya que el método utilizado para la obtención de la muestras es menos invasivo, por lo que podría ser utilizado para efectuar estudios de reparación del ADN. Esto no es posible al trabajar con glándula digestiva, manto y branquia, porque para ello hay que sacrificar al animal.

## VIII. CONCLUSIONES

Se estableció una metodología estándar para la técnica SCGE al trabajar con *C. gigas* determinándose:

- Incluir el método de tinción con azul tripano y tinción dual CFDA-Et Br para la determinación de viabilidad celular
- Duración del desenrollamiento del ADN:
  - 5 min. para los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia a 4 ° C aprox.
- Duración de la electroforesis:
  - 10 min. para los tejidos de hemolinfa y glándula digestiva
  - 15 min. para los tejidos de manto y branquia.
  - Cámara de electroforesis grande: 2.5 L de solución amortiguadora de electroforesis, 25 V y 300 mA.
  - Mantener una temperatura constante de 4° C.
- Los tejidos de hemolinfa, glándula digestiva, manto y branquia de *C. gigas* son sensibles y confiables para la determinación de genotoxicidad mediante la técnica de SCGE.
- Se seleccionó a la hemolinfa como el mejor tejido para la realización de la técnica SCGE en *C. gigas*, ya que su obtención es menos invasiva y su manipulación más rápida y sencilla.

## IX. LITERATURA CITADA

- Ahmed, M.**; 1975. Speciation in living oysters. *Adv. Mar. Biol.* (13): 357-397.
- Bayne, B. L.**, 1976. *Marine Mussels: Their Ecology and Physiology*, International Biological Programmer Vol. 10. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Bihari, N.**, Batel, R., Zahn, R.K., 1990. DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo [a] pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquat. Toxicol.* (18): 13-22.
- Bolognesi, C.**, Parrini, M., Roggieri, P., Ercolini, C., Pellegrino, C.; 1992. Carcinogenic and mutagenic pollutants: impact on marine organisms. *Mar. Tech. Rep. Ser.*, (69): 113-121.
- Boutet, I.**, Tanguy A., and Moraga, D. 2004. Molecular identification and expression of two non-P450 enzymes, monoamine oxidase A and flavin-containing monooxygenase 2, involved in phase I of xenobiotic biotransformation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochimica et Biophysica Acta* (1697): 29-36.
- Brunetti, R.**, Majone, F., Gola, I., Beltrame, C.; 1988. The micronucleus test: examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44: 65-68.
- Brusick, D. J.**, 1978. Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection. *Environ. Health Perspect.*, (24):105-112.
- Butler, P. A.**, Kennedy C. D, Schutzmann R. L 1978 Pesticide residues in estuarine mollusks, 1977 versus 1972--National Pesticide Monitoring Program. *Pestic. Monit J.* Dec; 12 (3):99-101.
- Choucroun, P.**, Gillet, D., Dorange, G., Sawicki, B., Dewitte, J. D.; 2001. Comet assay

and early apoptosis. *Mutat. Res.*, (478): 89-96.

**Collins, A. R.** 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotech.*, Vol. (26): 249-261.

**Collins, J.A.**, Schandl, C.A., Young, K. K., Vesely, J., Willingham, M. C.; 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 45 (7): 923-934.

**Comet Assay Forum.** Workshop on Comet Assay: Applications in Toxicology and Molecular Epidemiology held at Industrial Toxicology Research Centre, Lucknow, under the sponsorship of CSIR, ITRC, DST, EMSI and AAEMS during February 7-11, 2003. 2005. Disponible en línea: <http://comet.itrcindia.org>

**Corona Vadillo, D.** 2005. Evaluación de alteraciones biológicas en cangrejo violinista *Uca princeps* (Smith, 1870) expuesto a sedimentos contaminados. Tesis CIAD, Mazatlán, México.

**Corral Palomares, M. J.** 2003. Evaluación del desarrollo larvario, éxito de metamorfosis y crecimiento juvenil en dos poblaciones de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg 1873). Tesis Instituto Tecnológico Agropecuario 21, Block 611, Bácum, Son. México.

**Cotelle, S.**, Ferard, J. F. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review, *Environ. Mol. Mutagen.* (34): 246-255.

**Coughlan, B.M.**, Hartl, M.G.J., O'Reilly, S.J., Sheehan, D., Morthersill, C., van Pelt, F. N. A. N., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., 2002. Detecting genotoxicity using the Comet assay following chronic exposure of Manila clam *Tapes semidecussatus* to polluted estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin* (44): 1359-1365.

- Dixon, D. R.**, Pruski, A.M., Dixon, L.R.J. and Jha, A. N. 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* vol. 17, (6): 495-507.
- Dusinska, M.** 2000. The comet assay. Modified for detection of oxidized bases with the use of bacterial repair endonucleases. Workshop on comet assay held during February (7)-11, 2003.
- Esclapés, M. M.**, 1999. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas y terrestres. Versión 2.0. PDVSA INTEVEP.
- Everaarts J. M.**, 1994. Molecular responses as indicator of marine pollution: DNA damage and enzyme induction in *Limanda limanda* and *Asterias rubens*. *Environ. Health Perspect.* 102 (12) 37-43.
- Farias, A.**, Uriarte I. 2002. Nutrición Acuícola. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancún, Quintana Roo, México.
- Forget J.**, Pavilion J.F., Beliaeff B., Bocquene G. 1998. Joint action of combinations of pollutants (pesticides and metals) on LC50 values and acetylcholinesterase activity of *Tigriopus brevicornis*. *Envir. Toxicol. Chem.*
- Fortini, P.**, Raspaglio, G., Falchi, M. and Dogliotti, E.; 1996. Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. *Mutagenesis*, (11): 169-175.
- Freire, J.**, Fernández L., 2003. Impacto ambiental de la marea negra del Prestige: efectos sobre los ecosistemas marinos y los recursos pesqueros. Informe técnico. Universidad de Coruña. España.
- Frenzilli, G.**, Nigro, M., Scarcelli, V. Gorbi, S. and Regoli F. 2001. DNA integrity and total oxyradical scavenging capacity in the Mediterranean mussel, *Mytilus*

*galloprovincialis*: a field study in highly eutrophicated coastal lagoon. Aquatic Toxicology, (53): 19-32.

- Gardner, G. R.**, Yevich, P.P., Harshbarger, J.C. Malcolm, A. R.; 1991. Carcinogenicity of Black Rock Harbour sediment to the Eastern Oyster and trophic transfer of Black Rock Harbour carcinogens from the Blue Mussel to the Winter Flounder. Environ. Health Perspect., (90): 53-66.
- Gielazyn, M.L.**, Ringwood, A.H., Stancyk, S. E., Piegorsch, W.W.; 2001. Subcellular effects of in vivo hexavalent chromium exposure on the digestive gland and hemocytes of *C. virginica*, Abstracts of the Semiannual Meeting of the Southeastern Estuarine Research Society, Charleston, SC, p.8.
- Halliwell, B.**, and Aruma, O. I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. (281): 9-19
- Hartmann A.**, Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwabb S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. and Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis Vol. 18. (1): 45-51.
- Hartmann, A.**, 2000. Effects in the comet assay: How can you tell a good comet from a bad comet?. Eur. J. Gen. Mol. Toxicol. January, 1-17.
- Hartwig, A.** 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett., (102/103): 235-239.
- Heaton, P. R.**, Ransley, R., Charlton, J., Mann, S. J., Stevenson, J., Smith, B. H. E., Rawlings, J, H., Harper, E. J.; 2002. Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes.

Presented as part of the Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of age held in Vancouver, Canada, August 6-7, 2001. Supplement by American Society for Nutritional Sciences, 0022-3166/2.

**Hodgson, E.**, Levi P. E. 1987. Modern Toxicology a textbook. Elsevier. New York. 388 pp.

**Kammann U.**, Chaparro Riggers J., Theobald N., Steinhart H., 2000. Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mut. Res.* (467): 161-168.

**Kitchin, K.T.**, 2001. Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal models systems and methylated arsenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (172): 249-261.

**Klaude, M.**, Ericson, S., Nygren, J., Ahnström, G.; 1996. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* (363): 89-96.

**Kleinjans, J. C. S.**, van Schooten, F-J., 2002. Ecogenotoxicology: the evolving field. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (11): 173-179.

**Kruszewski, M.**, Green, M.H.L., Lowe, J. E., Szumiel. I. 1994. DNA strand breakage. Cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide treatment at 4°C and 37°C in L5178Y sublines. *Mutat. Res.* (308): 233-241

**Lara Lara, J. R.**, Álvarez Borrego, S., Small, L. F.; (1980). Variability and tidal exchange of ecological properties in coastal lagoon. *Estuar. Coast. Mar. Sci.* (11): 613-637.

**Large, A.T.**, Shaw, J.P., Peters, L.D., McIntosh, A.D., Webster, L., Mally, A., Chipman, J.K.; 2002. Different levels of mussels (*Mytilus edulis*) DNA strand breaks following chronic field and acute laboratory exposure to polycyclic aromatic



hydrocarbons. Mar. Environ. Res., in press.

**Lee R.F.**, and Steinert S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* (544):43-64.

**Lee, R.F.**, Steinert, S.A., Nakayama, K., Oshima, Y.; 1999. Use of DNA damage (comet assay) and embryo development defects to assess contaminant exposure by blue crab (*C. sapidus*) embryos, in: D. S. Henshel, M.C. Black, M.C. Harrass (Eds.). 1999. *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*. ASTM STP 1364, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken. (8): 341-349.

**Livingstone, DR.** 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, (57), 195-211.

**Livingstone, DR.** 1996. Cytochrome P450 in pollution monitoring: Use of cytochrome P450 (CYP1A) as a biomarker of organic pollution in aquatic and other organisms. In *Environmental Xenobiotics*. 143-160.

**Mitchelmore, C. L.**, Birmerlin, C., Livingstone, D.R., Chipman, J.K., 1998b. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the comet assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, (41): 51-58.

**Mitchelmore, C.L.**, Birmelain, C., Chipman, J. K. and Livingstone, D.R. 1998a. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo (a) pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus*

- edulis* L.) digestive gland cells. *Aquat. Toxicol.* (4):51-58.
- Nacci, D. E.**, Cayula, S., Jackim, E. 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* vol. 35, (3-4):197-210.
- Nigro, M.**, Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F.; 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.* (54): 517-520.
- Nolasco Soria, H.**, 2004. Métodos básicos en investigación experimental. Manual Teórico-Practico. México.
- Olive, P. L.**, 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *Int. J. Radiat. Biol.*, (75): 395-405.
- Östling O.**, Johanson K.J. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:291.
- Pandrangi R.**, Petras M., Ralph S., and Vrzoc M., 1995. Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* (26): 345-356.
- Pastor Benito, S.**; 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronucleos. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Pruski, A. M.** and Dixon, D. R. 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic. Toxicol.*, (57), 127-137.
- Repetto M.**; 1997. Toxicología fundamental. Ediciones Días de Santos, S.A. 3era edición. Madrid. 523 pp.

- Rigonato, J.**, Mantovani, M. S., Quinzani Jordão, B.; 2005. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for detection of genotoxicity. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 28, (3): 464-468.
- Rodríguez Perón, J. M.**, Menéndez López, J. R., Trujillo López, Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med. Militar*; vol. 30, (1):36-44.
- Rodríguez-Navarro R., J.**, Aguilar-Tirado E., Chávez-Aguilar M., Contreras-Márquez A. E., Reyes- Valdéz M. D. L., Aguilera-Coronado, J.; 1994. Cultivo de ostión americano. Colección Nacional de Manuales de Capacitación. Dirección general de organización y capacitación pesqueras. Delegación federal de pesca en Veracruz. Secretaria de Pesca. 36pp.
- Rojas, E.**, López, M. C., Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, (722): 225-254.
- Sasaki, U. F.**, Izumiyama, F., Nishidate, E., Ishibashi, S., Tsuda, S., Matsusaka, N., Asano, N., Saotome, K., Sofuni, T., Hayashi, M. 1997. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single- cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutat. Res.*, (393): 133-139.
- Sasaki, Y.F.**, Sofuni, T. and Hayashi, M. 1999. A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutat. Res.*, (446): 121-127.
- Schiewe H.**, Weber D., Myers M., Jacques F., Reichert W., Krone C., Donald C., Bruce B., Lam Cham L., Varanasi U. 1991. Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in english sole *Parophrys vetulus* exposed to an extract of an urban marine sediment. *Can. J. Aquati. Sci.* Vol. 48.
- Schlenk, D.**, 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments.

Marine Pollution Bulletin Vol. 39, (1-1): 48-53.

- Sestili, P.**, y Cantoni, O., 1999. Osmotically driven radial diffusion of single-stranded DNA fragments on an agarose bed as a convenient measure of DNA strand scission. Free radical biology & medicine Vol. 26 (7/8): 1019-1026.
- SETAC, 1998.** Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 19th Annual Meeting, USA.
- Shaw, J. P.**, Large, A. T., Chipman, J. K., Livingston, D. R., Peters, L.D. 2000. Seasonal variation in mussel *Mytilus edulis* digestive gland cytochrome P4501A-and 2E-immunoidentified protein levels and DNA strand breaks (Comet assay). Mar. Environ. Res., (50): 405-409.
- Singh, N. P.**, 2000. Rapid communication. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. Experimental Cell Research 256, 328-337.
- Singh, N. P.**, McCoy. M. T., Tice, R. R., and Scheider E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. (237): 123-130.
- Singh, N.P.**; 2002. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutat. Res., (455): 111-127.
- Solé, M.**, Porte, C., Biosca, X., Mitchelmore, C. L. Chipman, J. Living-Stone, DR., and Albaiges, J. 1996. Effects of the “Aegean Sea” oil spill on biotransformation enzymes, oxidative stress and DNA-adducts in digestive gland of the mussel (*Mytilus edulis*) Comp. Biochem. Physiol. C (113): 257-265.
- Speit, G.**, Hartmann, A.; 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). Mutagenesis, (10): 555-559.

- Steinert S.A.**, Streib-Montee R., Leather D.B., Chadwick. 1998. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat. Res.*, (399): 65-85.
- Steinert, S. A.** 1996. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells, *Mar. Environ. Res.* (42): 253-259.
- Svenson, B.**, Halberg, T., Nilsson, A.; 1994. Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Vol. 65. 351-358.
- Thomas, R. S.**, Rank, DR., Penn, S. G., Zastrow, G. M., Hayes, K. R., Pande, K.; Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Mol Pharmacol* 2001; (60): 1189-94.
- Tice, R. R.** Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B. Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, JC., and Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo Genetic Toxicology Testing. *Eviron. Mol. Mut.* (35): 206-221.
- Truhaut, R.**; 1969. Dangers of the chemical era. *Pure Appl Chem.*; 18 (1):111-28.
- Waliszewski, S. M.**, Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., Siliceo, J.; 2000. Carry-over of persistent organochlorine pesticide through placenta to fetus. *Salud Pública de México.* Vol. (42): 384-390.
- Wilson, J. T.**, Pascoe, P. L., Parry, J. M., Dixon, D. R. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis L.* (Mollusca, Pelecypoda). *Mutat. Res.*, (399): 87-95.