

**ESTIMADOS DE DAÑOS GENÉTICOS EN LA RANA DE DESARROLLO
DIRECTO *ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI* (ANURA:
ELEUTHERODACTYLIDAE) MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

LAURA CAROLINA VALENCIA OTERO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2010

**ESTIMADOS DE DAÑOS GENÉTICOS EN LA RANA DE DESARROLLO
DIRECTO *ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI* (ANURA:
ELEUTHERODACTYLIDAE) MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

LAURA CAROLINA VALENCIA OTERO

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga

DIRECTOR:

JORGE LUIS FUENTES, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph.D.

CO-DIRECTOR:

MARTHA PATRICIA RAMÍREZ PINILLA, BIÓLOGO, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA**

2010

A mis padres Martha y Alvaro que con su apoyo incondicional contribuyeron en mi formación académica y personal, y a mis hermanos por su compañía.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Extensión de la UIS por la financiación de este proyecto.

Al Parque de las Orquídeas por facilitarme el espacio para coleccionar los ejemplares usados en éste trabajo.

Al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis ambiental y a todos sus integrantes, en especial a Molkary, Lina, Sergio, Natalia Olivar, Natalia Quintero y Adriana por su compañerismo y colaboración.

Al laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados, por facilitarme sus instalaciones y equipos.

Al profe Jorge Luis, por la dirección de este trabajo, por sus consejos y su disposición, por darme la oportunidad de no solo compartir en el campo laboral sino como persona.

A la profesora Martha Patricia Ramírez Pinilla, codirectora del trabajo, por su accesoria y comentarios en el desarrollo de esta tesis.

A Gustavo Torres y Ezequiel Gonzales quienes me ayudaron en las colectas.

A mi Familia, por creer en mí, por su paciencia y comprensión a lo largo de la carrera.

A mis amigos: Johana, Liliana, Jorman, Jhazaira, Sergio, Mónica, Sergio Bolívar, Erika y Fede, por darme ánimo en los momentos difíciles y por estar conmigo todo este tiempo.

A todas las personas que colaboraron y participaron en la realización de este proyecto, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

| | PÁG. |
|---|-------------|
| INTRODUCCIÓN | 14 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 17 |
| 1.1 LOS ANFIBIOS COMO MODELOS BIOLÓGICOS | 17 |
| 1.2 ENSAYO COMETA | 18 |
| 1.3 ENSAYO DE DIFUSIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA | 19 |
| 1.4 LA BLEOMICINA | 20 |
| 2. METODOLOGÍA | 22 |
| 2.1 COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES | 22 |
| 2.2 COLECTA DE SANGRE Y CONTEO CELULAR | 22 |
| 2.3 EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS AL MUTÁGENO | 23 |
| 2.4 ENSAYO COMETA | 23 |
| 2.5 ESTIMADOS DE DAÑOS GENÉTICOS | 25 |
| 2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 26 |
| 3. RESULTADOS | 27 |
| 3.1 ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES ALCALINAS | 27 |
| 3.2 MODIFICACIÓN DEL ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES ALCALINAS. | 30 |
| 3.3. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR PARA ENSAYO COMETA | 34 |
| 3.4. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA PARA <i>E. JOHNSTONEI</i> | 36 |
| 3.5. ESTIMADOS <i>IN VITRO</i> DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR LA BLEOMICINA EN <i>E. JOHNSTONEI</i> MEDIANTE EL ENSAYO COMETA | 38 |

| | |
|----------------------|----|
| 4. DISCUSIÓN GENERAL | 41 |
| 5. CONCLUSIONES | 44 |
| 6. RECOMENDACIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFIA | 46 |
| ANEXOS | 68 |

LISTA DE FIGURAS

| | PÁG. |
|--|-------------|
| Figura 1. Respuesta a la tinción con nitrato de plata de las células sanguíneas nucleadas de la rana <i>E. johnstonei</i> . | 28 |
| Figura 2. Efecto del pH (10-13) y del tiempo de incubación en la lisis alcalina de las células sanguíneas de <i>E. johnstonei</i> . | 29 |
| Figura 3. Células sometidas a diferentes tratamientos de lisis. | 31 |
| Figura 4. Células sometidas a diferentes tiempos de lisis alcalina después de un tratamiento con 3 mg/mL de Proteinasa K durante 10 minutos a 4-8°C. | 32 |
| Figura 5. Células tratadas con 3 mg/mL de Proteinasa K e incubadas a 37 °C durante toda la noche | 33 |
| Figura 6. Células tratadas con diferentes concentraciones de Proteinasa K e incubadas a 4°C durante el tiempo de gelificación. | 34 |
| Figura 7. Efecto de la densidad celular de <i>E. johnstonei</i> en la resolución de Cometas por campo (10X). | 36 |
| Figura 8. Esquema del protocolo del ensayo cometa establecido para <i>E. johnstonei</i> . | 37 |
| Figura 9. Relación dosis-efecto observada por la exposición a Bleomicina de las células de <i>E. johnstonei</i> . | 39 |
| Figura 10. Relación entre la dosis de bleomicina y las clases de daño. Desviación estandar calculada a partir de la media de 3 experimentos independientes. | 39 |
| Figura 11. Curva dosis-efecto inducida por bleomicina. Las barras representan la desviación estandar calculada de la media de 3 experimentos independientes. | 40 |

LISTA DE ANEXOS

| | PÁG. |
|---|------|
| ANEXO 1. RECuento DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON LA CÁMARA NEUBAUER EN <i>E. JOHNSTONEI</i> . | 68 |
| ANEXO 2. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES ALCALINAS SEGÚN SINGH <i>ET AL.</i> (1988) CON LAS MODIFICACIONES HECHAS POR DÍAZ <i>ET AL.</i> (2009). | 70 |
| ANEXO 3. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA MODIFICADO PARA <i>E. JOHNSTONEI</i> . | 80 |
| ANEXO 4. EFECTO DEL PH Y EL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA LISIS ALCALINA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE <i>E. JOHNSTONEI</i> EN EL ENSAYO COMETA. LOS DATOS SON MOSTRADOS COMO MEDIA \pm ERROR ESTÁNDAR (N=60). | 89 |

RESUMEN

TITULO: ESTIMADOS DE DAÑOS GENÉTICOS EN LA RANA DE DESARROLLO DIRECTO *ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE) MEDIANTE EL ENSAYO COMETA*

AUTOR: LAURA CAROLINA VALENCIA OTERO**

PALABRAS CLAVE: Ensayo cometa, Bleomicina, ruptura del ADN, ensayo de Difusión de ADN, eritrocitos, *Eleutherodactylus johnstonei*.

El propósito de este estudio fue establecer el ensayo Cometa para la medición de daño genético en la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus johnstonei*. El ensayo se realizó siguiendo el protocolo estándar de Singh *et al.*, (1988) con algunas modificaciones. Nuestros datos muestran que la solución amortiguadora de lisis alcalina no elimina las membranas citoplasmática y nuclear de células sanguíneas de *E. johnstonei*. La lisis alcalina fue sustituida por una digestión enzimática con proteinasa K (0,19 µg/mL) lo que permitió la obtención de núcleos desnudos. Se estimó el daño inducido por la bleomicina en el ADN de células sanguíneas de *E. johnstonei*, en ensayos con diferentes concentraciones (4,75 a 152 µg/mL) y diferentes tiempos de incubación (1 a 12 horas). Los resultados muestran que altas dosis de bleomicina y largos tiempos de exposición (12 horas) son necesarios para inducir daño genético en *E. johnstonei*, contrastando con lo observado en otras especies de ranas y en humanos. Se describe un protocolo de ensayo Cometa estandarizado para células sanguíneas de *E. johnstonei*. Con base en los datos obtenidos con el ensayo de Difusión de ADN nuclear, se detectó un número consistentemente bajo de núcleos apoptóticos/necróticos (5,7%), manteniendo niveles basales mínimos de daño. Los resultados sugieren que el ensayo Cometa puede ser un método preciso para determinar el daño genético en *E. johnstonei*, que resultan de la exposición a xenobióticos ambientales.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.) y Co-Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla (Ph.D.)

ABSTRACT

TITLE: ESTIMATES OF GENETIC DAMAGE IN THE DIRECT-DEVELOPING FROG *ELEUTHERODACTYLUS JOHNSTONEI* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE) BY THE COMET ASSAY*

AUTHOR: LAURA CAROLINA VALENCIA OTERO**

KEYWORDS: Comet assay, Bleomycin, DNA break, DNA Diffusion assay, erythrocytes, *Eleutherodactylus johnstonei*.

The purpose of this study was to establish the Comet assay for measuring genetic damage in the direct-developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*. The assay was performed following standard protocol Singh *et al.* (1988) with a few modifications. Our data show that the alkaline lysis buffer does not eliminate cytoplasmic and nuclear membranes of blood cells of *E. johnstonei*. Alkaline lysis was replaced by an enzymatic digestion with proteinase K (0.19 µg/mL) that allowed to obtain bare nuclei. We estimated the bleomycin-induced damage in the blood cell DNA of *E. johnstonei*, in assays with different concentrations (4.75-152 µg/ml) and different incubation times (1-12 hours). The results show that higher doses of bleomycin and long exposure times (12 hours) are necessary to induce genetic damage in *E. johnstonei*, contrasting with observations in other species of frogs and humans. We described a protocol of comet assay standardized for blood cells of *E. johnstonei*. Based on the data obtained with nuclear DNA Diffusion assay, was detected a consistently low number of apoptotic/necrotic nuclei (5.7%), maintaining minimal basal levels of damage. The results suggest that the Comet assay can be an accurate method to determine the genetic damage in *E. johnstonei* that result from exposure to environmental xenobiotics.

* Basic Science thesis.

** Faculty of Science, Biology School, Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.) and Co-Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla (Ph.D.)

INTRODUCCIÓN

Los estudios de biomonitoreo dirigidos a evaluar el impacto genotoxicológico de los xenobióticos ambientales cobran cada día mayor relieve (Laffon *et al.*, 2006; Kim y Hyun, 2006; Kosmehl *et al.*, 2008; Lacaze *et al.*, 2010). Esta clase de sustancias, no solo impactan el genoma de los organismos que habitan los ambientes contaminados, sino que además pueden tener un efecto negativo sobre el desarrollo y supervivencia de estos organismos (Steinert, 1999; Kim y Lee, 2004; Hook y Lee, 2004).

Se ha planteado que los anfibios son buenos bio-indicadores, ya que estos pueden revelar el estado de conservación del medio que habitan (Blaustein *et al.*, 1994; Blaustein y Wake, 1995; Ralph *et al.*, 1996; Zoll-Moreux y Ferrier, 1999; Rajaguru *et al.*, 2001; Blaustein y Johnson, 2003; Goulet y Hontela, 2003; Linzey *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007). Los estudios que hacen uso de anuros como modelos para medir el impacto de xenobióticos ambientales, se han centrado fundamentalmente en la utilización de la fase larval de ranas bifásicas de especies como *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana* y *Bufo americanus* (Berrill *et al.*, 1994; Ralph *et al.*, 1996; Ralph y Petras, 1997, 1998; Clements *et al.*, 1997; Linzey *et al.*, 2003; Relyea, 2004ab; Rohr y Crumrine, 2005; Huang *et al.*, 2007). En Colombia, una buena parte de la diversidad de anuros está representada por ranas con desarrollo directo (Frost, 2008) y no existen estudios que utilicen este tipo de ranas como bioindicador de exposición ambiental.

Eleutherodactylus johnstonei (Anura: Eleutherodactylidae) es una especie de rana de desarrollo directo originaria de las Antillas Menores (Kaiser, 1997; Henderson y Powell, 2001; Frost, 2008) reportada por primera vez en Colombia en la ciudad de Barranquilla (Ruiz-Carranza *et al.*, 1996), y hoy se le puede encontrar en otras

ciudades como Cali y Bucaramanga (Kaiser *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2001, 2005). La especie *E. johnstonei* muestra particularidades reproductivas y ecológicas como son: i) especie con desarrollo directo, ii) poseer flexibilidad reproductiva, y iii) poseer alta adaptabilidad ambiental; por lo que se considera como una especie invasora exitosa (Ovaska, 1991; Kaiser y Wagenseil, 1995; Bourne, 1998; Kaiser, 1997; Kaiser *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2005). Estas características, hacen de esta especie un interesante modelo que podría utilizarse como bioindicador de exposición en estudios de evaluación del impacto genotoxicológico de xenobióticos ambientales.

Entre los muchos biomarcadores que existen para evaluar el daño genético producto de la exposición a genotóxicos ambientales, el ensayo Cometa es un biomarcador de exposición que mide el nivel de fragmentación del ADN nuclear tanto *in vitro* como *in vivo* (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003, 2004). La técnica permite detectar daños genéticos con una alta sensibilidad en cualquier tipo de célula eucariota, requiere de pocas células, y genera una respuesta temprana ocasionada por agentes contaminantes (Olive *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 1999; Collins, 2004).

El objetivo general de la presente tesis fue establecer el ensayo Cometa para la medición de daños genéticos en la especie de rana de desarrollo directo *E. johnstonei*. Para cumplir este objetivo general nos trazamos los siguientes objetivos específicos:

- Establecer un procedimiento para la medición de daños genéticos mediante el ensayo Cometa en la rana *E. johnstonei*.
- Estimar la reproducibilidad del ensayo Cometa mediante curvas dosis-respuesta en células de *E. johnstonei* tratadas con el mutágeno Bleomicina.

- Estimar la contribución de eventos celulares como la apoptosis y la necrosis en los estimados de daño genético obtenidos con el ensayo cometa en *E. johnstonei* por medio del ensayo de Difusión de ADN en Gel de Agarosa.

El presente estudio permitió establecer el ensayo Cometa para la medición de daños genéticos en la rana de desarrollo directo *E. johnstonei*. A tales fines, se desarrollaron modificaciones en los pasos de lisis celular del protocolo descrito por Singh *et al.*, (1988). La principal modificación consistió en la sustitución de la lisis alcalina por un paso de lisis enzimática usando Proteinasa K. El protocolo modificado es trazable y sensible para la detección *in vitro* del daño genético inducido por el mutágeno Bleomicina. Se constató una mínima contribución de eventos celulares como apoptosis y necrosis en los estimados de daños medido con el ensayo. Los resultados son discutidos considerando el potencial uso de la rana de desarrollo directo *E. johnstonei* como bioindicador de exposición durante estudios de biomonitoreo dirigidos a evaluar el impacto genotoxicológico de xenobióticos ambientales.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LOS ANFIBIOS COMO MODELOS BIOLÓGICOS

Los anfibios son empleados como bioindicadores ya que son un modelo sensible al estrés y a los cambios ambientales que pueden afectar la diversidad genética de las poblaciones (Alford y Richards, 1999; Semlitsch *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2001; Van Straalen y Timmermans, 2002; Marquis *et al.*, 2009). El poder predictivo de la calidad ambiental de estos organismos, se basa en sus características biológicas como la respiración cutánea, que les atribuye su alta permeabilidad a contaminantes, y su adaptación a hábitats tanto acuáticos como terrestres (Duellman y Trueb, 1994; Wells, 2007).

La fase larval de los anfibios es usada en muchos estudios de monitoreo ambiental, dado que permite realizar estudios tanto *in situ* como al nivel de laboratorio bajo condiciones controladas (Relyea, 2005; Mouchet *et al.*, 2006). Estos organismos poseen relevancia ecotoxicológica y son usados en estudios que evalúan la genotoxicidad de diversas sustancias por medio de biomarcadores tales como: el ensayo de micronúcleos y el ensayo Cometa; dos métodos que comparado con otros son sensibles, rápidos y sus metodologías son ajustables sobre varios modelos (Mouchet *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2009).

Los anfibios se han consolidado como organismos centinela por su presencia en ambientes agrícolas, lo que ha permitido evaluar el impacto ecotoxicológico de pesticidas tales como la atrazina, el glifosato, el malatión y el endosulfán, entre otros. Se ha comprobado que algunas de estas sustancias actúan directamente causando mortalidad en la población, mientras otras presentan manifestación subletales que afectan el desarrollo, la reproducción y el material genético (Relyea,

2005; Hayes *et al.*, 2006; Peltzer *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2009; Lawrence y Isioma, 2010; Maselli *et al.*, 2010).

1.2 ENSAYO COMETA

La electroforesis en gel de células individuales (SCGE), o como comúnmente se le conoce ensayo Cometa, fue desarrollada inicialmente por Rydberg y Johanson (1978) para la detección de daño en el ADN en células nucleadas. Östling y Johanson (1984) introdujeron una modificación al ensayo que permitió la detección de rompimientos de cadena doble bajo condiciones de pH neutro y, posteriormente Singh *et al.* (1988) modificó nuevamente el ensayo para la detección de rompimiento de cadena simple y doble bajo condiciones alcalinas; versión que ha sido la más usada hasta hoy.

En la versión alcalina del ensayo Cometa, células nucleadas son embebidas en un gel de agarosa sobre láminas para microscopía, lisadas y sometidas a electroforesis bajo condiciones alcalinas. Las células que muestran daño en el ADN son detectadas por el incremento de la cantidad de ADN fragmentado que forma una cola a partir del núcleo, cuyo tamaño es proporcional al nivel de daño del ADN nuclear. El nivel de rompimiento del ADN de los núcleos puede estimarse en categorías al observarlos directamente por microscopio o mediante el análisis de imágenes computarizadas (Olive *et al.*, 1990; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1995).

El amplio uso de esta técnica en estudios de biomonitorio ambiental se debe a su simplicidad, bajo costo y amplia sensibilidad para detectar el daño producido por una extensa variedad de xenobióticos cuando es comparado con otras técnicas (Mitchelmore y Chipman, 1998; Cotelle y Ferard, 1999; Lee y Steinert, 2003; Faust *et al.*, 2004). La alta sensibilidad de la técnica permite la detección de roturas en el

ADN de simple y doble cadenas, sitios en el ADN lábiles a los álcalis, la reparación por escisión del ADN y otros eventos donde se presenta fragmentación del ADN como la apoptosis y la necrosis celular (Godard *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2000; Roser *et al.*, 2001; Bihari *et al.*, 2002). Teóricamente, este ensayo permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales y puede ser aplicado a cualquier tipo de célula eucariota haciendo posible determinar la heterogeneidad del daño entre diferentes tejidos (Prieto y Llópiz, 1999; Pavlica *et al.*, 2001; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005).

La detección del daño genético con el ensayo Cometa puede verse afectado por diferentes factores intrínsecos de la técnica como: la concentración de agarosa en el gel, el pH, la temperatura y las condiciones de la electroforesis; motivo por el cual es necesario trabajar con protocolos normalizados para obtener una adecuada reproducibilidad de los resultados (Hughes *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Duez *et al.*, 2003).

1.3 ENSAYO DE DIFUSIÓN DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Un aspecto crítico a considerar en el ensayo Cometa son aquellos eventos celulares caracterizados por procesos de fragmentación del ADN como es el caso de la apoptosis y la necrosis; los cuales pueden conducir a sobre estimados del daño genético (Olive *et al.*, 1993; Olive y Banáth, 1995; Steinert, 1996; Henderson *et al.*, 1998; Godard *et al.*, 1999; Tice *et al.*, 2000; Roser *et al.*, 2001; Hartmann *et al.*, 2001; Wada *et al.*, 2003; Frenzilli *et al.*, 2009).

Algunos xenobióticos inducen daño genético por mecanismos apoptóticos (Sweet *et al.*, 1999), además se ha indicado que otros factores como el estrés físico pueden inducir apoptosis por un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Concordet y Ferry, 1993; Hartmann *et al.*, 1994; Møller *et*

al., 2001). Por tal razón, los estudios ecotoxicológicos requieren de pruebas histopatológicas o pruebas de viabilidad celular, con el fin de establecer el grado de muerte celular en una población de células (Hartmann *et al.*, 2003; Jha, 2008).

El ensayo Cometa no es un buen estimador de apoptosis debido a que una fragmentación prolongada del ADN generada después de la electroforesis puede llevar a la pérdida de las células apoptóticas, y por tanto, se ve afectada su cuantificación en el ensayo (Vasquez y Tice, 1997; Henderson *et al.*, 1998; Florent *et al.*, 1999; Meintières *et al.*, 2003). Es por ello, que se recomienda el uso simultáneo de ensayos relacionados como el de Difusión en Gel de Agarosa (DGA) que permitan medir el nivel de fragmentación de ADN asociado con tales eventos celulares. El ensayo DGA es muy similar en procedimiento al ensayo Cometa, solo que se elimina el paso de electroforesis alcalina (Singh, 2000ab, 2005; Zeljezic *et al.*, 2006).

También cabe anotar, que algunos factores intrínsecos del ensayo pueden generar daño y conducir a sobrestimados del daño. Por ejemplo, excesiva exposición a la luz visible y largos tiempos de procesamiento de la muestra, pueden generar degradación del ADN, haciendo que incluso células normales se presenten como células con apoptosis/necrosis (Singh, 2005). Es importante tener en cuenta, que aunque este ensayo puede detectar eventos de apoptosis y necrosis, este no permite distinguir entre estos dos procesos celulares (O'Callaghan *et al.*, 2001; Wilkins *et al.*, 2002; Gichner *et al.*, 2005).

1.4 LA BLEOMICINA

La Bleomicina es un glicopéptido con propiedades antibióticas, antivirales y antitumorales (Rudders, 1972; Umezawa *et al.*, 1972; Asakura *et al.*, 1975; Claussen y Long, 1999; Georgiou *et al.*, 2004), que induce rupturas de doble y

simple cadena, pérdida de bases y sitios lábiles al álcali en el ADN (Suzuki *et al.*, 1970; Povirk *et al.*, 1977; D'Andrea y Haseltine, 1978; Povirk, 1996; Yu y Anderson, 1997). Este antibiótico, tiene efecto sobre los iones Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} que al unirse con O_2 forma un complejo que se liga al ADN y generan un ataque nucleofílico a nivel de pares de bases (Sausville *et al.*, 1978; Takeshita *et al.*, 1978; Hsie *et al.*, 1986; Mir *et al.*, 1996; Burger, 1998; Hecht, 2000; Chen y Stubbe, 2004).

Por la similitud de su mecanismo de acción al de la radiación ionizante, la Bleomicina es conocida como un compuesto radiomimético. Este compuesto, se considera un agente altamente clastogénico y mutagénico (Russell *et al.*, 1996; Shelby *et al.*, 1993; Ferguson y Denny, 1995; Kosinska *et al.*, 2002). Además, puede tener efecto citotóxico promoviendo la muerte celular por un mecanismo de apoptosis (Tounekti *et al.*, 1993; Keyer *et al.*, 1995; Higuchi y Matsukawa, 1997; Lee *et al.*, 2004; Wallach-Dayana *et al.*, 2006).

El ensayo cometa se ha empleado en varios estudios que investigan la sensibilidad celular a la Bleomicina. Estos estudios han mostrado que la migración del ADN es dependiente de la dosis y que los resultados varían dependiendo del tipo de célula (Anderson *et al.*, 1994; Miyamae *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 2008). La alta variabilidad de respuestas celulares al tratamiento con Bleomicina se ha asociado con las limitaciones que supone su tamaño molecular, lo que limita su penetración a través de la membrana celular. En tal sentido, se ha sugerido usar altas concentraciones en los tratamientos así como largos periodos de exposición para producir daños genéticos (Tounekti *et al.*, 1993; Kasamatsu *et al.*, 1996; Pron *et al.*, 1999; Frenzilli *et al.*, 2000; Rajae-Bebahani *et al.*, 2001).

2. METODOLOGÍA

2.1 COLECTA Y MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Los especímenes de *E. johnstonei* fueron capturados en varios sitios del área metropolitana del municipio de Bucaramanga, Santander, Colombia (07° 07' 47" N, 73° 07' 33" W), a una altitud promedio de 960 m y una temperatura de 24°C. La identificación del sexo de los animales se efectuó de acuerdo con el dimorfismo sexual, así como por el canto emitido por los machos.

Las ranas fueron mantenidas en terrarios de vidrio con ventilación, simulando condiciones de humedad e iluminación similares a las de su hábitat. La dieta base de las ranas consistió de moscas, grillos, arácnidos, hormigas y zancudos capturados en el campus de la Universidad Industrial de Santander.

2.2 COLECTA DE SANGRE Y CONTEO CELULAR

Los ejemplares fueron colocados en bolsas de colecta y mantenidos entre 4 y 8°C durante un periodo entre 20 a 30 minutos. Posteriormente, las muestras de sangre fueron colectadas por punción al corazón del animal utilizando una jeringa de insulina, para lo cual se realizó una disección del tórax de los ejemplares con el fin de visualizar el corazón y realizar la colecta de la sangre periférica. Las muestras se mantuvieron en tubos Eppendorff previamente heparinizados a una temperatura entre 4 y 8°C.

Para establecer la densidad celular óptima del ensayo se realizó para cada individuo el recuento de células sanguíneas usando una Cámara de Neubauer.

Este procedimiento consistió en tomar 2 μL de sangre que se diluyeron en 40 μL de 0.9% de NaCl. De la mezcla anterior, se dispensaron 11 μL en la cámara para efectuar el conteo en cinco campos. La concentración celular se ajustó diluyendo la sangre en 0.9 % de NaCl (ver **Anexo 1**).

2.3 EXPOSICIÓN DE LAS CÉLULAS AL MUTÁGENO

Se tomaron 4 μL de la suspensión celular preparada a una concentración de 3.55×10^6 células/mL (ver acápite 3.4) y se mezclaron con 20 μL de Bleomicina preparada en un rango de concentración entre 0.59-152 $\mu\text{g/mL}$. En todos los ensayos se incluyó un control negativo del experimento, el cual consistió en células suspendidas en 0.9 % de NaCl. Las curvas dosis-respuesta se ensayaron considerando diferentes tiempos de exposición al mutágeno entre 1 y 12 horas. Todos los tratamientos se realizaron a una temperatura de 4°C con el fin de minimizar el daño celular no asociado con el mutágeno.

2.4 ENSAYO COMETA

El ensayo se realizó inicialmente siguiendo el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con las modificaciones propuestas por Díaz *et al.* (2009). Los detalles de este ensayo Cometa con lisis alcalina, pueden ser consultados en el **Anexo 2**. Para el desarrollo del ensayo Cometa a partir de células sanguíneas (Claver y Quaglia, 2009) de *E. johnstonei*, se requirieron modificaciones adicionales al protocolo descrito en el **Anexo 2**, las cuales son descritas a continuación.

Las células fueron centrifugadas a 10.000 rpm y el pellet se re-suspendió en 20 μL de una solución de Proteinasa K preparada a diferentes concentraciones (entre 0.19 - 3.0 mg/mL) en Buffer PK (50mM Tris-HCl, 10mM CaCl_2 , pH 8). La

suspensión celular fue mezclada con 75 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (1%) y se dispensaron sobre portaobjetos previamente cubierto con una capa de 400 μ L de 1.3% de agarosa de grado molecular. Las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos (22 x 40 mm) y colocadas en la nevera por 10 minutos. Posteriormente, los cubreobjetos fueron retirados y las láminas colocadas a 4°C en cámara de electroforesis que contiene el buffer de corrida (0.3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) durante aproximadamente 25 minutos. A continuación, se desarrolló la electroforesis a 300 mA y 25 V durante 30 minutos. Las láminas fueron colocadas en frascos Coplins con solución neutralizante (0.4 M TRIS, pH 7.5) durante 5 minutos y finalmente, fueron lavadas con agua destilada y secadas en la incubadora a 37°C.

Después de la neutralización, se desarrolló la tinción con Nitrato de Plata siguiendo el protocolo descrito por Díaz *et al.* (2009). Las láminas fueron colocadas en frascos Coplins que contenían la solución de fijación (15% Ácido Tricloroacético, 5% Sulfato de Zinc heptahidratado, 5 % Glicerol) durante 10 minutos. Posteriormente, estas se lavaron dos veces con agua destilada y fueron incubadas a 37°C durante 3 horas. Después de la fijación, las láminas fueron rehidratadas en agua destilada por 5 minutos para llevar a cabo la tinción de los núcleos. La solución de tinción se preparó al momento de utilizarse, y consistió de una mezcla de 66 mL de la solución 1 (5 % Carbonato de Sodio) con 34 mL de la solución 2 (0.1% Nitrato de Amonio, 0.2% Nitrato de Plata, 0.125% Ácido Tungstofosfórico, 0.2% Formol). Las láminas fueron incubadas en el frasco Coplin con la solución final de tinción protegida de la luz durante 20 minutos, posteriormente, lavadas dos veces con agua destilada. La tinción fue detenida en una solución de 1% de Ácido Acético durante 5 minutos y finalmente se secaron a temperatura ambiente.

La detección de citotoxicidad asociada con eventos de apoptosis o necrosis se llevó a cabo usando el ensayo de Difusión de ADN en Gel de Agarosa (Singh,

2000a). En este ensayo, se realizan básicamente los mismos pasos del ensayo cometa, pero se excluye el paso de electroforesis alcalina. Los núcleos que mostraron una alta dispersión del ADN nuclear (diámetro 3 veces al del núcleo promedio del control negativo no tratado), fueron considerados como núcleos apoptóticos o necróticos (Nigro *et al.*, 2002).

2.5 ESTIMADOS DE DAÑOS GENÉTICOS

Las láminas se analizaron usando un microscopio Nikon Eclipse E200 con objetivo de 40X. Se contaron siempre 100 células por lámina y se montaron dos láminas por cada tratamiento. Para las curvas dosis efecto con el mutágeno, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con dos replicas (láminas) por tratamientos. El nivel de daño en el ADN fue determinado visualmente con la tipificación de los núcleos en cinco categorías de daño (0–4) según lo indicado por Collins *et al.* (1997). El daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias totales (AU_T) de la siguiente manera: $AU_T = N_0 \times 0 + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4$; donde N_i es el número de núcleos en cada categoría (Collins, 2002). Dado que los estimados de daño genéticos pueden ser sobre estimado por la existencia de eventos celulares como la apoptosis y necrosis, el porcentaje de núcleos con apoptosis o necrosis ($\%N_{A/N}$) fue considerado en los estimados de daños genéticos según lo indicado en la siguiente fórmula por Díaz *et al.* (2009):

$$AU_R = AU_T - \frac{\%N_{A/N} \times AU_T}{100}$$

Las unidades arbitrarias remanentes (AU_R) por tratamientos se promediaron y el criterio de daño fue el siguiente: *i*) no hay daño (entre 0-100 AU_R), *ii*) poco daño (entre 101-200 AU_R), *iii*) daño moderado (entre 201-300 AU_R) y, *iv*) daño severo (entre 301-400 AU_R). Para mayor detalle de la forma en que se tipifican los núcleos en cada categoría consultar el **Anexo 3**.

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en cada tratamiento fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas con el fin de establecer qué tipo de análisis estadístico se debe emplear (paramétrico o no paramétrico). Se desarrolló un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias entre tratamientos. Se efectuó un análisis de correlación producto momento de Pearson para determinar la relación entre el estimado de daño genético y las concentraciones del mutágeno. Los análisis estadísticos se realizaron por medio del programa STATISTICA V.6 (STATSOFT, Inc, 2003) con una significación $p < 0.05$.

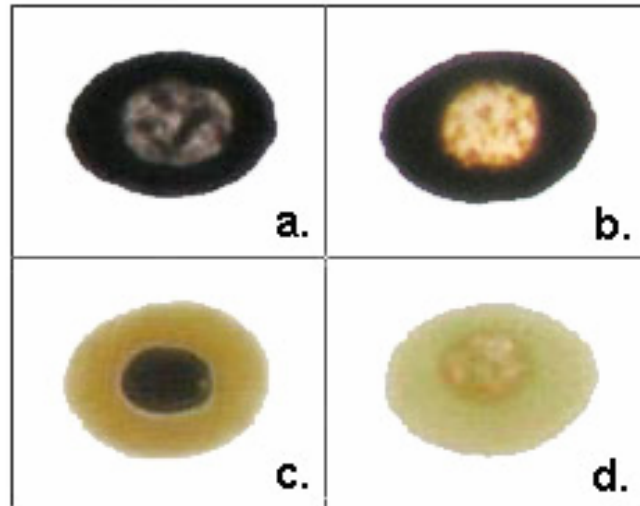
3. RESULTADOS

3.1 ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES ALCALINAS

En el presente estudio, se usó el procedimiento propuesto por Singh *et al.* (1988) para la determinación de roturas en el ADN celular bajo condiciones alcalinas (ver **Anexo 2**) con el fin de determinar daños genéticos en células sanguíneas de la especie de rana *E. johnstonei*. Bajo las condiciones estándar de este procedimiento, las células embebidas en geles de agarosa son sometidas a una lisis celular bajo condiciones alcalinas que debe conducir a núcleos desnudos, luego estos son sometidos a una electroforesis que debe separar por migración fragmento de ADN, si el mencionado núcleo ha sido dañado mediante algún tratamiento, y por último, los núcleos son visualizados mediante tinción de ADN nuclear.

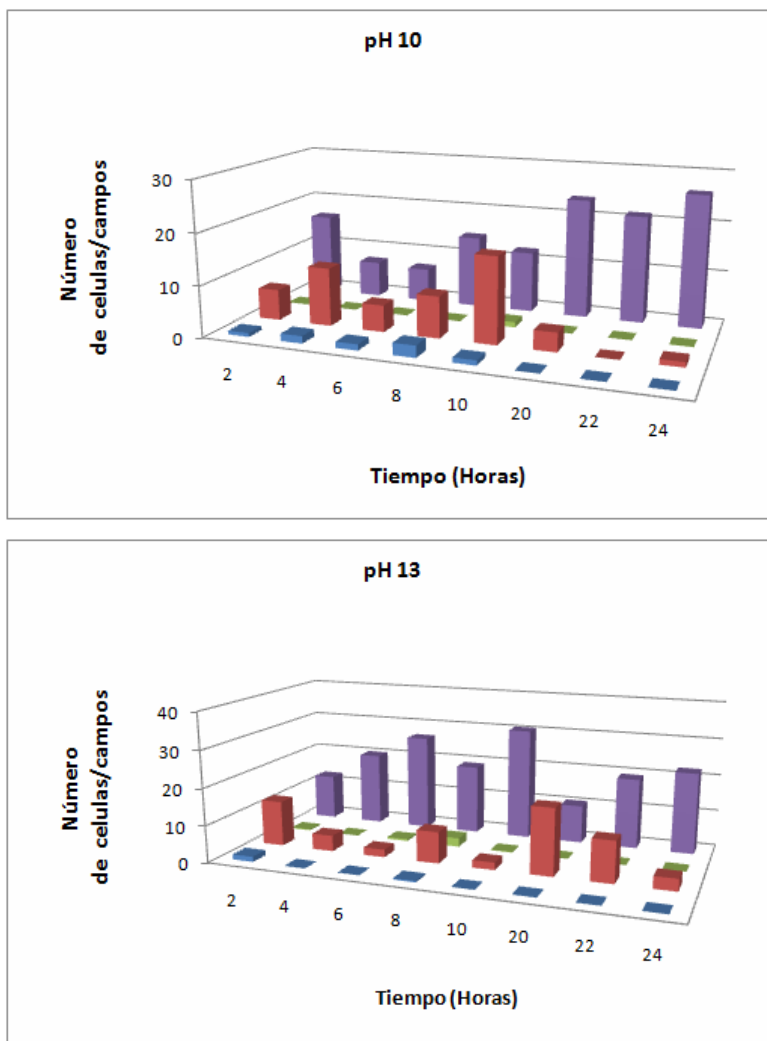
Los resultados mostrados en la **Figura 1**, nos indican que el mencionado procedimiento no es efectivo para la determinación de daños en células sanguíneas de *E. johnstonei*; dado que no se obtienen núcleos desnudos bajo las condiciones experimentales ensayadas. Por el contrario, se observaron cuatro posibles respuestas luego de la tinción con Nitrato de Plata: a) células completamente teñidas, b) células con solo el citoplasma teñido, c) células con solo el núcleo teñido y d) células no teñidas.

Figura 1. Respuesta a la tinción con nitrato de plata de las células sanguíneas nucleadas de la rana *E. johnstonei*. a) Célula completamente teñida; b) célula con solo el citoplasma teñido; c) célula con solo el núcleo teñido; d) célula no teñida.



Con el objetivo de comprobar si el pH del buffer de lisis era un factor a tener en cuenta durante la lisis celular alcalina, se ensayaron diferentes pH (rango entre 10 y 13) y tiempos de lisis celular (rango entre 2 y 24 horas). Los resultados obtenidos en estos ensayos (ver **Anexo 4**), no mostraron un efecto significativo del pH en la lisis células sanguíneas de *E. johnstonei*. En ninguno de los tratamientos se obtuvieron núcleos desnudos. Los resultados obtenidos para los pH extremos del rango ensayados (pH 10 y 13), indican que la afinidad del colorante por los diferentes compartimentos celulares (citoplasma y núcleo) puede variar dependiendo del pH y el tiempo de lisis (**Figura 2**). En general, el número observado de núcleos teñidos fue consistentemente bajo, sugiriendo la limitada accesibilidad del colorante al núcleo celular bajo las condiciones experimentales ensayadas.

Figura 2. Efecto del pH (10-13) y del tiempo de incubación en la lisis alcalina de las células sanguíneas de *E. johnstonei*. Número de células por campo con respuesta a la tinción con nitrato de plata. Células completamente teñidas (barras en azul); células con solo el citoplasma teñido (barras en rojo); células con solo el núcleo teñido (barras en verde); célula no teñidas (barras en morado). Datos son mostrados como la media (n=60).

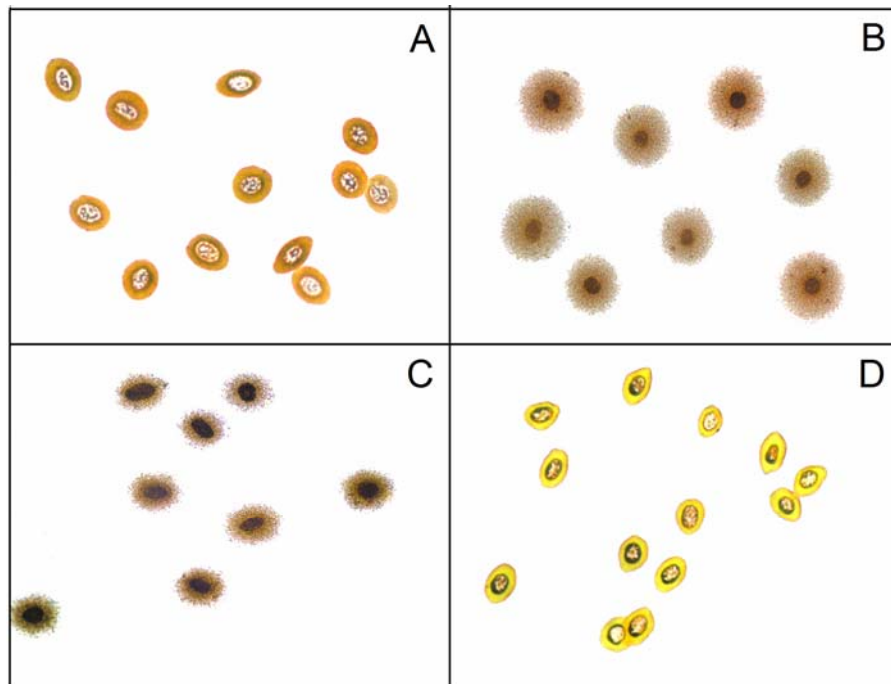


3.2 MODIFICACIÓN DEL ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES ALCALINAS.

Dada la imposibilidad de obtención de núcleos desnudos a partir de células sanguíneas de *E. johnstonei*, se desarrollaron modificaciones al procedimiento propuesto por Singh *et al.* (1988). Una primera modificación consistió en ensayar variantes de lisis más agresivas para las paredes celulares. A tales fines, se ensayaron tratamientos enzimáticos usando Proteinasa K y combinaciones de lisis alcalina y enzimática; y posteriormente se constató el efecto de los tratamientos mediante una variante del ensayo Cometa que no incluye el paso de electroforesis; el Ensayo de Difusión de ADN en Gel de Agarosa (Singh, 2005).

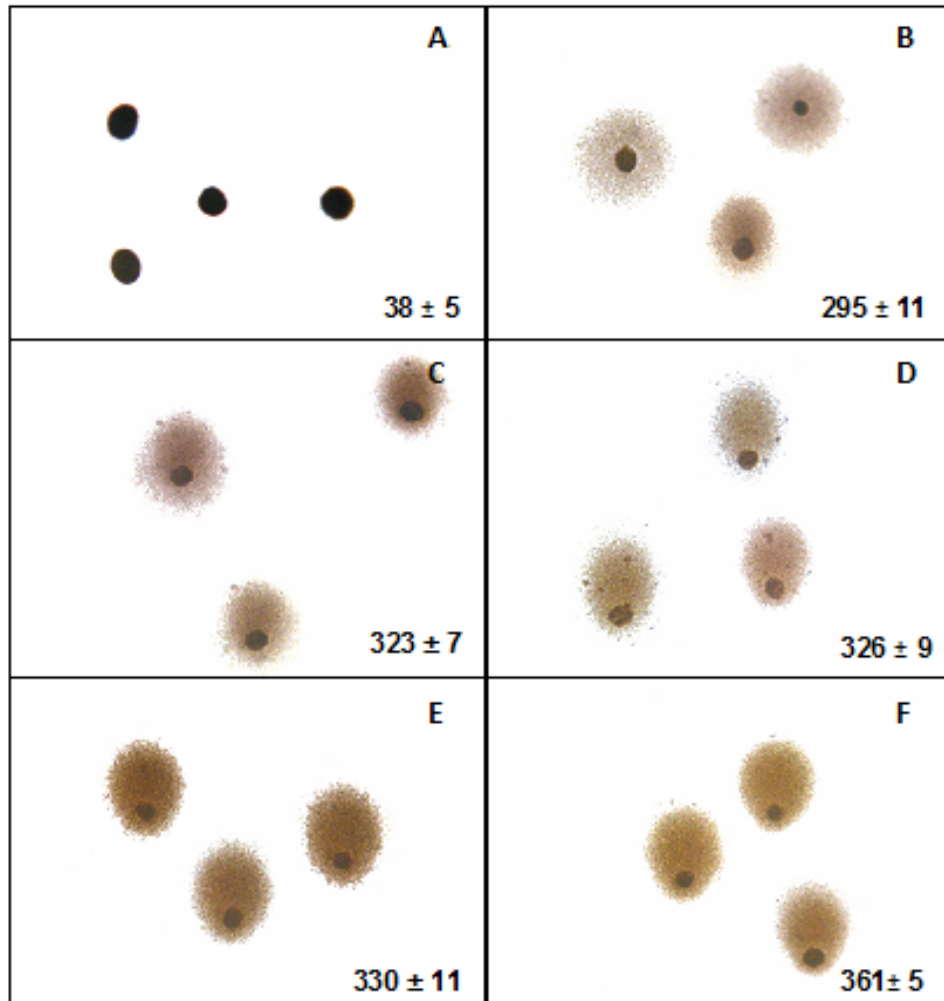
La **Figura 3**, muestra los resultados obtenidos con los tratamientos de lisis celular ensayados. Como se puede observar los tratamientos celulares que usan Proteinasa K (tratamientos B y C) producen núcleos desnudos que responden adecuadamente a la tinción con Nitrato de Plata, contrastando con los resultados observados con la lisis alcalina (tratamiento A).

Figura 3. Células sometidas a diferentes tratamientos de lisis. A) Células tratadas por lisis alcalina, B) células tratadas con 3 mg/mL de Proteínasa K y posteriormente por lisis alcalina, C) células tratadas solo con 3 mg/mL de Proteínasa K, D) células no tratadas (control negativo). Todos los tratamientos con Proteínasa K se desarrollaron en células embebidas en gel de agarosa e incubadas durante toda la noche a 37°C.



Adicionalmente, los tratamientos B y C mostraron que bajo tales condiciones de lisis la integridad nuclear puede ser afectada; especialmente en el tratamiento B que muestra núcleos pequeños con un alto nivel de difusión de ADN a su alrededor. Este efecto fue observado aún cuando la lisis alcalina se desarrollaba durante tiempos cortos en el ensayo Cometa (**Figura 4**). Como tales niveles de daño nuclear, pueden afectar los estándares de niveles basales de daño en el ensayo Cometa se descartó el uso de tratamiento B en futuros ensayos.

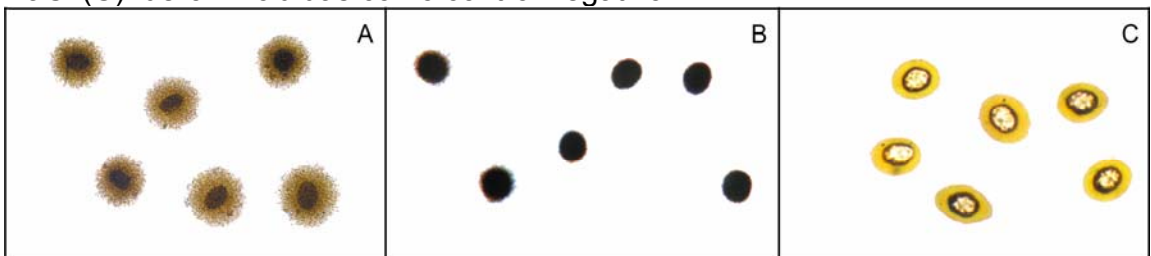
Figura 4. Celulas sometidas a diferentes tiempos de lisis alcalina despues de un tratamiento con 3 mg/mL de Proteinas K durante 10 minutos a 4-8oC. Sin lisis alcalina (A), con lisis alcalina durante 5 (B), 10 (C), 15 (D), 30 (E) y 45 (F) minutos. Se presentan además, los valores medios de unidades arbitrarias por tratamientos y su correspondiente desviación estándar.



Aunque el tratamiento de lisis celular usando únicamente Proteinas K (tratamiento C, **Figura 3**) afectó en menor grado la integridad nuclear que el tratamiento combinado (tratamiento B, **Figura 3**), los niveles de daño nuclear observados puede también afectar los estándares de niveles basales de daño en el ensayo Cometa. Por tal razón, fue necesario evaluar si la temperatura era un factor que afectaba la integridad nuclear de células sanguíneas de *E. johnstonei*.

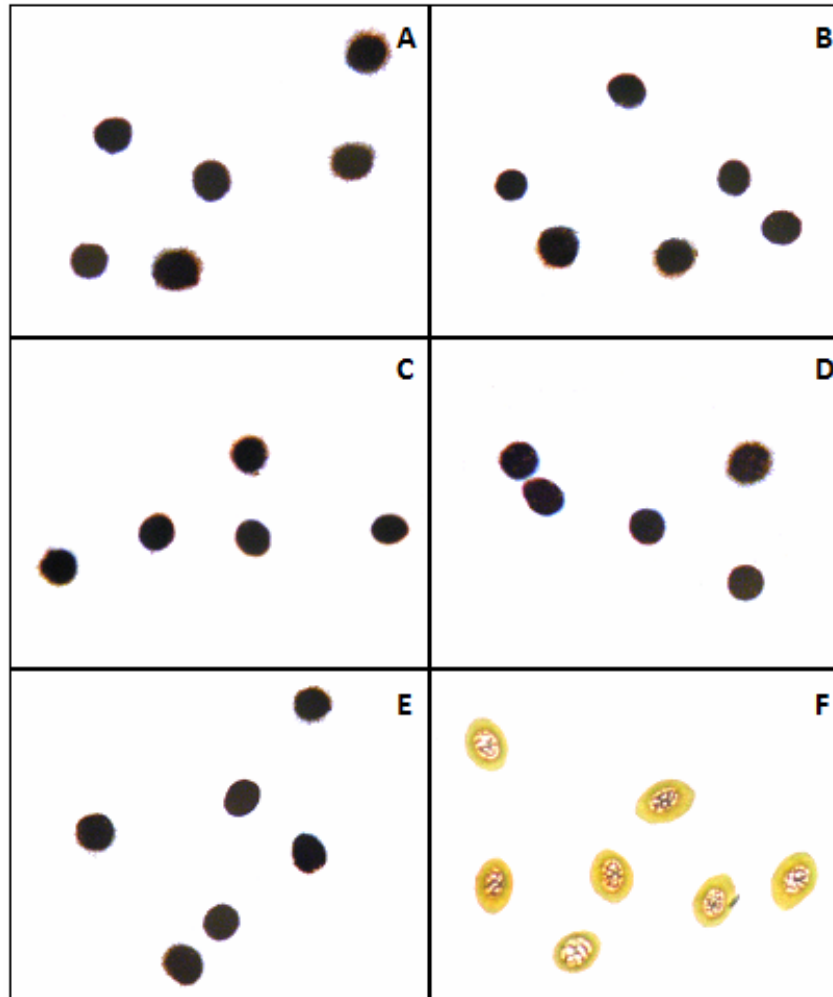
En la **Figura 5** se muestra el efecto de la incubación a 37°C durante toda la noche sobre la integridad nuclear de las células. Como se esperaba, tales condiciones de incubación conducen a daños nucleares que son evidenciados mediante el Ensayo de Difusión en Gel de Agarosa, razón por la que en adelante las células fueron lisadas entre 4-8°C durante el tiempo de gelificación de las laminillas (10 minutos).

Figura 5. Células tratadas con 3 mg/mL de Proteinasa K e incubadas a 37 °C durante toda la noche (A) o mantenidas entre 4-8°C durante la gelificación (10 minutos) (B). Células no tratadas con Proteinasa K pero mantenidas en 0.9 % de NaCl (C) fueron incluidas como control negativo.



Adicionalmente, se evaluó el efecto de la concentración de la Proteinasa K para un rango de concentración en solución entre 0.19 y 3.0 mg/mL (**Figura 6**). Los resultados mostraron que concentraciones de 0.19 mg/mL son suficientes para obtener núcleos desnudos intactos en el modelo genético en estudio.

Figura 6. Células tratadas con diferentes concentraciones de Proteinasa K e incubadas a 40C durante el tiempo de gelificación. La lisis enzimática se desarrolló con 3.0 (A), 1.5 (B), 0.75 (C), 0.37 (D) y 0.19 (E) mg/mL de Proteinasa K. Células no tratadas (F) pero mantenidas en 0.9 % de NaCl fueron incluidas como control negativo.



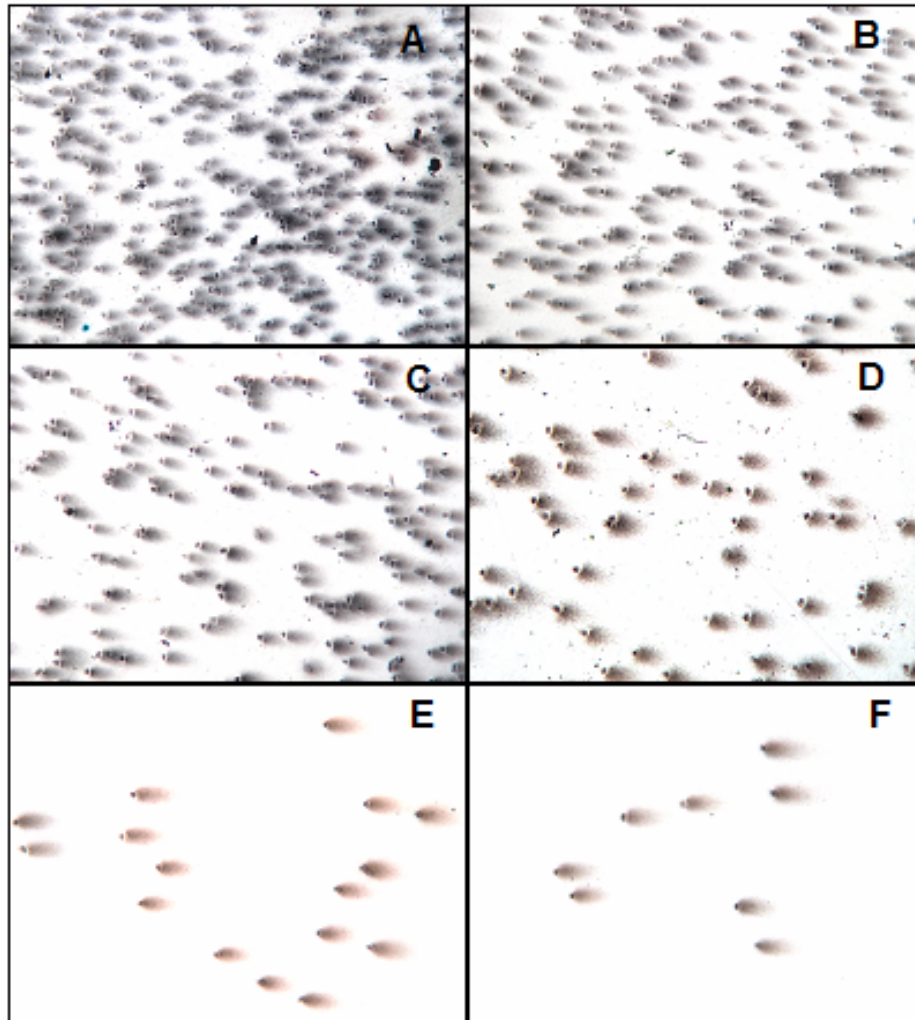
3.3. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR PARA ENSAYO COMETA

Los primeros ensayos desarrollados para determinar daños genéticos en células sanguíneas de *E. johnstonei* mediante el ensayo Cometa, evidenciaron la

necesidad de establecer la densidad celular para visualizar adecuadamente los cometas.

Para cumplir con este objetivo, se determinó la densidad celular de cada muestra sanguínea según lo descrito en el **Anexo 1** y se desarrolló el ensayo Cometa usando diferentes concentraciones celulares (entre 2.66 y 6.77×10^6 células/mL), siguiendo el procedimiento descrito en el próximo acápite (acápite 3.5). Se determinó que una concentración de 3.55×10^6 células/mL es óptima para desarrollar el ensayo Cometa con células sanguíneas de *E. johnstonei* (**Figura 7**). Una detallada descripción de las diferentes categorías de daños que pueden ser detectadas con el ensayo Cometa a esta concentración celular pueden consultarse en el **Anexo 3**.

Figura 7. Efecto de la densidad celular de *E. johnstonei* en la resolución de Cometas por campo (10X). Las concentraciones ensayadas fueron: 6.77×10^6 (A), 5.73×10^6 (B), 4.66×10^6 (C), 4.14×10^6 (D), 3.55×10^6 (E) y 2.66×10^6 (F) células/mL.

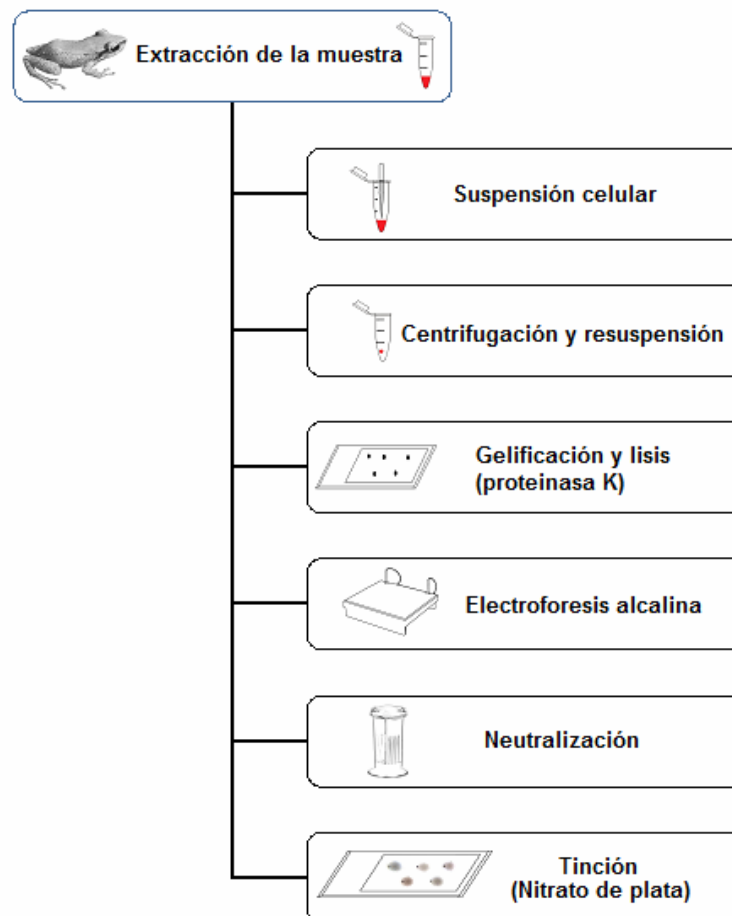


3.4. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA PARA *E. JOHNSTONEI*

Con base en el ensayo cometa alcalino propuesto por Singh *et al.* (1988) y los protocolos estandarizados en espermatozoides de diferentes especies de mamíferos; se logró establecer una metodología apropiada para la detección *in vitro* del daño inducido por el mutágeno Bleomicina en células sanguíneas de *E.*

johnstonei (**Figura 8**). La modificación desarrollada, reemplaza la lisis celular bajo condiciones alcalinas por una digestión enzimática con Proteinasa K que remueve proteínas asociadas a membranas y permite obtener núcleos desnudos (**Anexo 3**). En el protocolo establecido para *E. johnstonei*, la lisis celular ocurre directamente en el gel de agarosa y no en tampón de lisis enzimática, como ha sido frecuentemente desarrollada en modificaciones anteriores que usan digestión enzimática con Proteinasa K (Hughes *et al.*, 1999, Duty *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2008). El resto de pasos del ensayo original (**Anexo 2**), son mantenidos íntegramente en el presente protocolo.

Figura 8. Esquema del protocolo del ensayo cometa establecido para *E. johnstonei*.



3.5. ESTIMADOS *IN VITRO* DEL DAÑO GENÉTICO INDUCIDO POR LA BLEOMICINA EN *E. JOHNSTONEI* MEDIANTE EL ENSAYO COMETA

El procedimiento establecido fue usado para medir el daño genético inducido en células sanguíneas de *E. johnstonei* por el agente mutagénico Bleomicina. Para tal fin, se estudió un rango de concentración del mutágeno entre 4.75 y 152 µg/mL, y se ensayaron diferentes tiempos de exposición celular.

Los resultados presentados en la **Figura 9** claramente demuestran una relación dosis-efecto para el rango de dosis y tiempos de exposición celular ensayados. La curva dosis-efecto desarrollada para un tiempo de exposición celular de 12 horas, mostró un relación directa entre la dosis del mutágeno con la presencia de núcleos con niveles de daños del tipo 2, 3 y 4; y una relación inversa con núcleos del tipo 0 y 1 (**Figura 10**). Cuando el daño genético se expresó como AU_R (**Figura 11**), se observaron valores significativos a partir de una dosis de 4.75 µg/mL ($p \leq 0.05$) y una clara correlación entre los estimados de daños y la concentración del mutágeno ($R = 0.88$, $p \leq 0.05$). La trazabilidad en los estimados de daño genético en el modelo estudiado fue consistentemente alta con valores de errores estándar y coeficientes de variación consistentemente bajos ($CV \leq 12.7\%$). El porcentaje de núcleos con apoptosis o necrosis ($\%N_{AN}$) observado en *E. johnstonei* estuvo entre el 3 y el 8 %, con un valor promedio del 5.7 % (datos no mostrados).

Figura 9. Relación dosis-efecto observada por la exposición a Bleomicina de las células de *E. johnstonei*. Son presentados diferentes tiempos de exposición para cada dosis. C⁻ (control negativo).

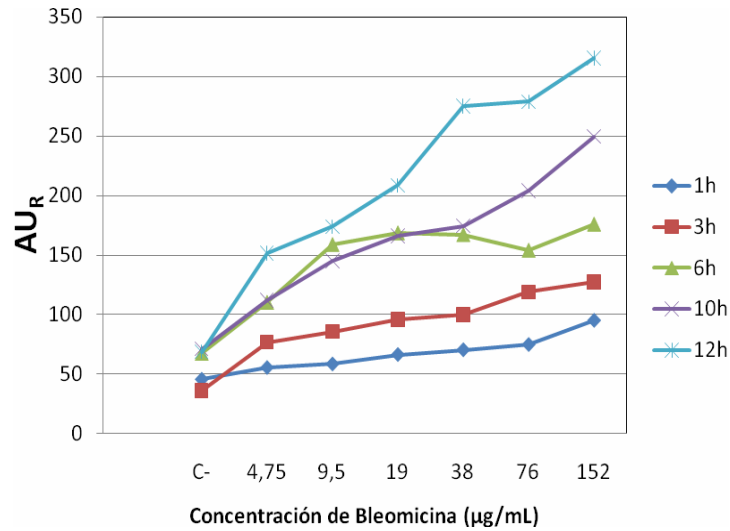


Figura 10. Relación entre la dosis de bleomicina y las clases de daño. Desviación estandar calculada apartir de la media de 3 experimentos independientes. C-) Control negativo. La bleomicina se ensayó a las siguientes concentraciones: A) 4.75 µg/mL; B) 9.5 µg/mL; C) 19 µg/mL; D) 38 µg/mL; E) 76 µg/mL y F) 152 µg/mL.

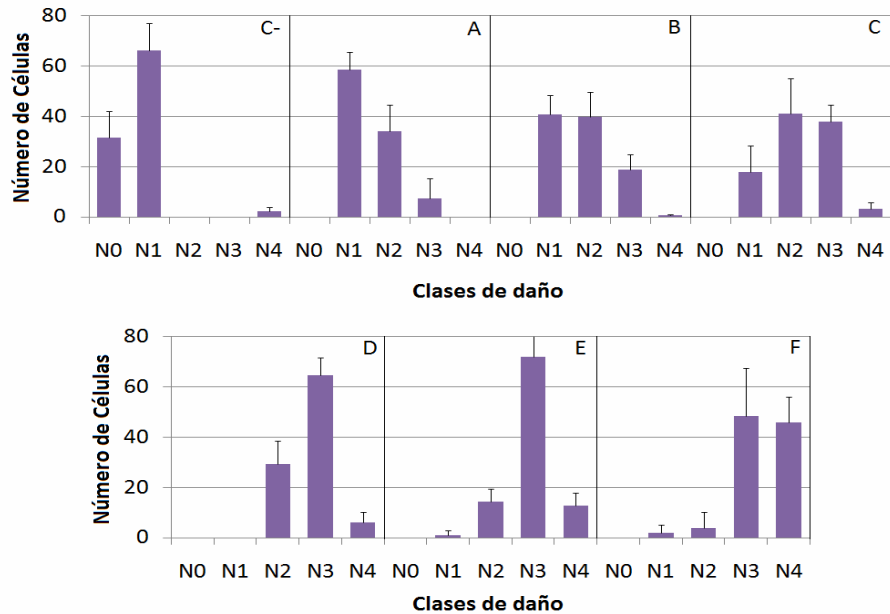
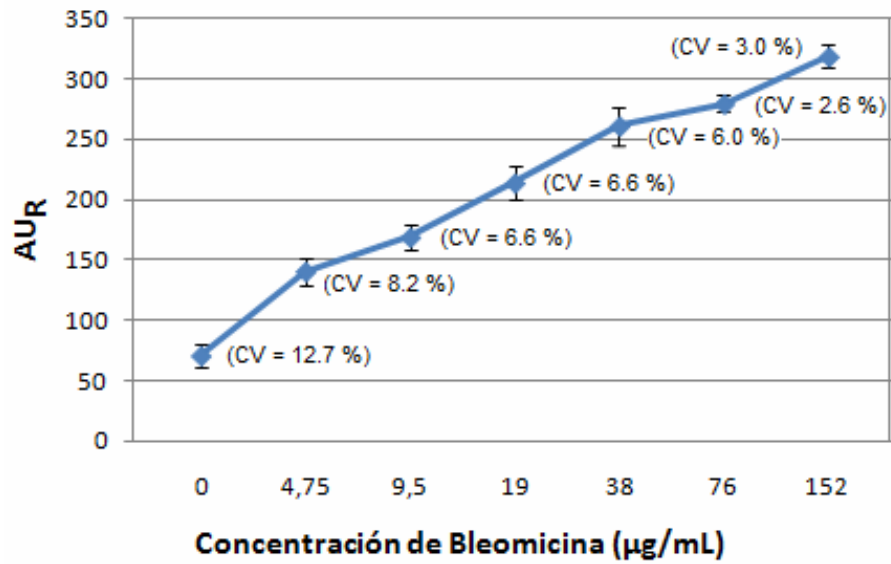


Figura 11. Curva dosis-efecto inducida por bleomicina. Las barras representan la desviación estandar calculada de la media de 3 experimentos independientes.



4. DISCUSIÓN GENERAL

En el presente estudio, se desarrolló una modificación del ensayo Cometa bajo condiciones alcalinas propuesto por Singh *et al.* (1988), con el fin de contar con un biomarcador del daño genético en la rana de desarrollo directo *E. johnstonei*. La principal modificación consistió en la sustitución de la lisis alcalina por un paso de lisis enzimática usando Proteinasa K; lo cual fue determinante para la obtención de núcleos desnudos y la detección de roturas en el ADN nuclear.

Diferentes estudios, han incorporado con resultados exitosos la digestión enzimática con Proteinasa K al ensayo Cometa bajo condiciones alcalinas (Hughes *et al.*, 1999; Duty *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2005). La Proteinasa K digiere proteínas asociadas al ADN nuclear y es de especial utilidad en el caso de células espermáticas de mamíferos, donde el ADN es altamente condensado. Adicionalmente, esta enzima elimina los enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteínas que generan ciertos compuestos genotóxicos, permitiendo la migración electroforética del ADN dañado (Merk y Speit, 1998; Tice *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2000b). Bajo las condiciones experimentales aquí ensayadas, la combinación del tratamiento alcalino y enzimático resultaron agresivos para la integridad nuclear de células sanguíneas de *E. johnstonei* (**Figura 3**); lo que motivó el uso únicamente de la lisis enzimática.

La temperatura durante la lisis celular es una variable importante que afecta la sensibilidad y el poder predictivo del ensayo (Speit *et al.*, 1999; Banáth *et al.*, 2001). En el presente estudio (ver **Figura 5**), se constató que largos periodos de incubación con Proteinasa K a 37°C afectan la integridad nuclear, contrastando con lo observados en los trabajos realizados con espermatozoides (Hughes *et al.*, 1996; Duty *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2008). Se ha sugerido, que ciertas proteínas

nucleares presentes en los espermatozoides (las protaminas) son las responsables de su alta tolerancia a digestiones enzimáticas, razón por la que se requieren temperaturas (37°C) y pH (pH 8) óptimos durante la digestión enzimática para lograr una adecuada descondensación del ADN nuclear (Hughes *et al.*, 1996; Boe-Hansen *et al.*, 2005). En nuestro caso, digestiones enzimáticas a bajas temperaturas fueron suficientes para obtener núcleos desnudos en el modelo bajo estudio.

Otros estudios que utilizan el ensayo Cometa para la medición del daño genético en anuros (*Bufo americanus*, *Rana hexadactyla*, *Rana clamitans*, *Xenopus laevis*), no requirieron variaciones en el parámetro de la lisis celular alcalina (Ralph *et al.*, 1996; Rajaguru *et al.*, 2001; Mouchet *et al.*, 2006). Todos esos estudios tienen en común que son ranas de desarrollo bifásico que utilizan el estado larval durante la exposición y que miden el daño en células sanguíneas. Los requerimientos en término de condiciones experimentales para la obtención de núcleos desnudos observada en el presente estudio, sugieren que las células de *E. johnstonei* contienen factores adicionales (posiblemente proteínas nucleares) que contribuyen a una mayor integridad nuclear. Una hipótesis interesante por demostrar en futuros estudios, es si esta supuesta estabilidad genómica puede o no estar relacionada con el alto nivel de adaptabilidad fisiológica y ambiental observada en la especie *E. johnstonei* (Kaiser y Henderson 1994; Kaiser 1997).

El presente estudio demostró que el ensayo Cometa puede proporcionar un buen estimado del daño genético en la especie *E. johnstonei*. Los niveles basales de daño genético detectados están en correspondencia con los estándares para el ensayo (Collins *et al.*, 1997). El ensayo resultó altamente trazable durante la estimación del daño genético en el modelo estudiado. Adicionalmente, este mostró un bajo porcentaje de núcleos con apoptosis o necrosis (valor promedio de %N_{AN} = 5.7%), contrastando con lo observado en modelos de mamíferos como humanos (Tice *et al.*, 2000), leones marinos (El-Zein *et al.*, 2006) y delfines (Díaz *et al.*,

2009). Estos hallazgos sugieren, que el ensayo Cometa puede resultar un método preciso para determinar daño producto de la exposición a xenobióticos ambientales en *E. johnstonei*.

Los datos obtenidos claramente evidenciaron que la Bleomicina es un potente inductor de roturas en el ADN nuclear de células sanguíneas de *E. johnstonei*, como ha sido previamente mostrado en linfocitos de anuros como *Xenopus laevis* y *Xenopus tropicalis* (Banner *et al.*, 2006) y de humanos (Rajae-Bebahani *et al.*, 2001; Schmezer *et al.*, 2001; Gleib y Pool-Zobel, 2006; Weng *et al.*, 2008). Comparado con los estudios previamente mencionados, las células sanguíneas de *E. johnstonei* requirieron tiempos de exposición al mutágeno más largos (12 horas) para evidenciar daño genético producto de la Bleomicina. Se ha planteado que la Bleomicina tiene limitada permeabilidad celular (Pron *et al.*, 1999); lo que justificaría los prolongados tiempos de exposición requeridos en nuestro estudio. Sin embargo, es claro que otros factores como tipos celulares (Claver y Quaglia, 2009) y diferentes condiciones durante la exposición al mutágeno (Ej. Exposición previa a la lisis celular o no, exposición en tampón de lisis o embebida en el gel, etc.), pueden además afectar los niveles de daño genético inducidos por la Bleomicina en diferentes especies de anuros.

5. CONCLUSIONES

El ensayo Cometa bajo condiciones alcalinas (Singh *et al.*, 1988) no resulta adecuado para la medición de daño genético en la especie *E. johnstonei*.

La lisis celular bajo condiciones alcalinas durante el ensayo Cometa con células sanguíneas de *E. johnstonei*, puede ser sustituida por una lisis celular enzimática (Proteinasa K) con resultados satisfactorios. Sin embargo, tratamientos combinados de lisis celular enzimática y condiciones alcalinas resultan agresivos para el núcleo de células sanguíneas de *E. johnstonei*, lo que conduce a niveles basales de daños consistentemente altos.

Tiempos prolongados de digestión enzimática con Proteinasa K a 37°C, conducen a roturas de ADN nuclear que afectan los estándares de niveles basales de daño en el ensayo Cometa.

El ensayo Cometa desarrollado *in vitro* con células sanguíneas de *E. johnstonei* es altamente trazable y muestra un porcentaje de células con apoptosis/necrosis consistentemente bajo (5.7%).

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la importancia de factores externos como la edad y el sexo en los estimados de daño genético en *E. johnstonei* usando el ensayo cometa.

Se recomienda normalizar el ensayo para condiciones *in vivo*, con el fin de utilizar esta especie de rana en estudios ecotoxicológicos.

Se recomienda el estudio de otros mutágenos que induzcan daño en los eritrocitos de *E. johnstonei* mediante mecanismos de acción diferentes al de la Bleomicina.

Se recomienda desarrollar estudios en los eritrocitos de esta rana para establecer que estructuras confieren su alta estabilidad en la lisis celular alcalina.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERTINI, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463, 111-172.
- ALFORD, R.A., Richards, S.J. 1999. Global Amphibian Declines: A problem in applied ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30, 133-165.
- ANDERSON, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P. 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutation Research* 307, 261-271.
- ASAKURA, H., Hori, M., Umezawa, H. 1975. Characterization of bleomycin action on DNA. *The Journal of Antibiotics* 28(7), 537-42.
- BANÁTH, J.P., Kim, A., Olive, P.L. 2001. Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline Comet assay. *Radiation Research* 155, 564-571.
- BANNER, S.H., Ruben, L.N., Johnson, R.O. 2006. Bleomycin-induced DNA Damage and Repair in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Journal of Experimental Zoology* 305A, 1-7.

- BERRILL, M., Bertram, S., McGillivray, L., Kolohon, M., Paull, B. 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpole. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 657-664.
- BIHARI, N., Batel, R., Jakšić, Z., Müller, W.E.G., Waldmann, P., Zahnc, R. K. 2002. Comparison between the Comet assay and fast micromethod for measuring DNA damage in HeLa cells. *Croatica Chemica Acta* 75, 793-804.
- BLAUSTEIN, A.R., Wake, D.B., Sousa, W.P. 1994. Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology* 8, 60-71.
- BLAUSTEIN, A.R., Johnson, P.T. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in the Ecology and Environment* 1, 87-94.
- BLAUSTEIN, A.R., Wake, D.B. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American* 272, 52-57.
- BOE-HANSEN, G.B., Morris, I.D., Ersbøll, A.K., Greve, T., Christensen, P. 2005. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology* 63, 1789-1802.
- BOURNE, G.R. 1998. Reproductive behavior of terrestrial breeding frogs *Eleutherodactylus johnstonei* in Guyana. *Behavioral Ecology* 9, 1-7.
- BRENDLER-SCHWAAB, S., Hartmann, A., Pfuhler, S, Speit, G. 2005. The in vivo Comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-254.

- BURGER, R.M. 1998. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chemical reviews* 98(3), 1153-1169.
- CHEN, J., Stubbe, J. 2004. Bleomycins: new methods will allow reinvestigation of old issues. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 175-181.
- CLAUSSEn, C.A., Long, E.C. 1999. Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chemical reviews* 99(9), 2797-2816.
- CLAVER, J.A., Quaglia, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* Volume 18(2), 87-97.
- CLEMENTS, C., Ralph, S., Petras, M. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 277-288.
- COLLINS, A.R., Dobson, V.L., Dusinská, M., Kennedy, G., Stětina, R. 1997. The Comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research* 375, 183-193.
- COLLINS, A.R. 2002. The comet assay, principles, applications and limitations. In: Didenko VV (ed) *In Situ Detection of DNA Damage. Methods and Protocols*. V. 203. Humana Press Inc., Totowa, 163-177.
- COLLINS, A.R. 2004. The Comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.

- CONCORDET, J-P., Ferry, A. 1993. Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 265, C626-C629.
- COTELLE, S., Férard, J. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34(4), 246-255.
- D'ANDREA, A.D., Haseltine, W.A. 1978. Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 75(8), 3608-3612.
- DÍAZ, A., Carro, S., Santiago, L., Estévez, J., Guevara, C., Blanco, M., Sánchez, L., Sánchez, L., López, N., Cruz, D., López, R., Cuetara, E.B., Fuentes, J.L. 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA Diffusion assays. *Genetics and Molecular Biology* 32(2), 367-372.
- DIXON, R.D., Pruski, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 375-383.
- DUELLMAN, W.E., Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. Baltimore, Maryland. Johns Hopkins University Press.
- DUEZ, P., Dehon, G., Kumps, A., Dubois, J. 2003. Statistics of the Comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18, 159-166.
- DUTY, S.M., Singh, N.P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Huang, T., Hauser, R. 2002. Reliability of the Comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reproduction* 17(5), 1274-1280.

- DUTY, S.M., Singh, N.P., Silva, M.J., Barr, D.B., Brock, J.W., Ryan, L., Herrick, R.F., Christiani, D.C., Hauser, R. 2003. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral Comet assay. *Environmental Health Perspectives* 111(9), 1164-1169.
- EL-ZEIN, R.A., Hastings-Smith, D.A., Ammenheuser, M.M., Trinen-Moslen, M., Gulland, F.M., Ward, Jr.J.B. 2006. Evaluation of two different biomarkers for use in the assessment of toxic chemical exposure in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Pollution Bulletin* (52), 104-120.
- FAIRBAIRN, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. 1995. The Comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37-59.
- FAUST, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V. 2004. The use of the alkaline Comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 566(3), 209-229.
- FERGUSON, L.R., Denny, W.A. 1995. Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilized resource in mutagenesis? *Mutation Research* 331, 1-26.
- FLORENT, M., Godard, T., Ballet, J.J., Gauduchon, P., Sola, B. 1999. Detection by the Comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biology and Toxicology* 15(3), 185-192.
- FRENZILLI, G., Bosco, E., Barale, Roberto. 2000. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research* 468, 93-108.

- FRENZILLI, G., Nigro, M., Lyons, B.P. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 681(1), 80-92.
- FROST, D. R. 2008. Amphibian Species of the World: An online reference. Version 5.2 (20 October, 2008). Base de datos electrónica disponible en <http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA.
- GEORGIU, N.A., van der Bruggen, T., Oudshoorn, M., de Bie, P., Jansen, C.A., Nottet, H.S., Marx, J.J., van Asbeck, B.S. 2004. Mechanism of inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 by the oxygen radical generating agent bleomycin. *Antiviral research* 63(2), 97-106.
- GICHNER, T., Mukherjee, A., Wagner, E.D., Plewa, M.J. 2005. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion assay to detect apoptosis and necrosis. *Mutation Research* 586, 38-46.
- GLEI, M., Pool-Zobel, B.L. 2006. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicology in Vitro* 20, 295-300.
- GODARD, T., Deslandes, E., Lebailly, P., Vigreux, C., Sichel, F., Poul, J-M., Gauduchon, P. 1999. Early detection of staurosporine-induced apoptosis by Comet and annexin V assays. *Histochemistry and Cell Biology* 112, 155-161
- GOULET, B.N., Hontela, A. 2003. Toxicity of cadmium, endosulfan, and atrazine in adrenal steroidogenic cells of two amphibian species, *Xenopus laevis* and *Rana catesbeiana*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2106-2113.

- HARTMANN, A., Plappert, U., Raddatz, K., Griinert-Fuchs, M., Speit, G. 1994. Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9, 269-272.
- HARTMANN, A., Kiskinis, E., Fjaellman, A., Suter, W. 2001. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline Comet assay. *Mutation Research* 497, 199-212.
- HARTMANN, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51.
- HARTMANN, A., Schumacher, M., Plappert-Helbig, U., Lowe, P., Suter, W., Mueller, L. 2004. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis* 19, 51-59.
- HAYES, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M. 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect* 114, 40-50.
- HECHT, S.M. 2000. Bleomycin: new perspectives on the mechanism of action. *Journal of natural products* 63, 158-168.
- HENDERSON, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13, 89-94.

- HENDERSON, R.W., Powell, R. 2001. Responses by the west Indian herpetofauna to human-influenced resources. *Caribbean Journal of Science* 37, 41-54.
- HIGUCHI, Y., Matsukawa, S. 1997. Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances that cause oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 23(1), 90-99.
- HOOK, S.E., Lee, R.F. 2004. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the Comet assay. *Aquatic Toxicology* 66, 1-14.
- HSIE, A.W., Recio, L., Katz, D.S., Lee, C.Q., Wagner, M., Schenley, R.L. 1986. Evidence for reactive oxygen species inducing mutations in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 83(24), 9616-9620.
- HUANG, D., Zhang, Y., Wang, Y., Xie, Z., Ji, W. 2007. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutation Research* 629, 81-88.
- HUGHES, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. 1996. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified Comet assay. *Molecular Human Reproduction* 2(8) 613-619.
- HUGHES, C.M., Lewis, S.E.M., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. 1997. Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 374, 261-268.

- HUGHES, C.M., McKelvey-Martin, V.J, Lewis, S.E. 1999. Human sperm DNA integrity assessed by the Comet and ELISA assays. *Mutagenesis* 14(1), 71-75.
- JHA, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the Comet assay. *Mutagenesis* 23(3), 207-221.
- JOHANSSON, M., Räsänen, K., Merilä, J. 2001. Comparison of nitrate tolerance between different populations of the common frog, *Rana temporaria*. *Aquatic Toxicology* 54, 1-14.
- JONES, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: Lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(9), 1939-1945.
- KAISER, H., Henderson, R.W. 1994. The conservation status of Lesser Antillean frogs. *Herpetological Natural History* 2, 41-56.
- KAISER, H., Wagenseil, R. 1995. Colonization and distribution of *Eleutherodactylus johnstonei* Barbour (Anura: Leptodactylidae) on Dominica, West Indies. *Caribbean Journal of Science* 31, 341-344.
- KAISER, H. 1997. Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation* 6, 1391-1407.
- KAISER, H., Barrio-Amorós, C.L., Trujillo, J.D., Lynch, J.D. 2002. Expansion of *Eleutherodactylus johnstonei* in northern South America: rapid dispersal through human interactions. *Herpetological Review* 33, 290-294.

- KANG, J.H., Hakimov, H., Ruiz, A., Friendship, R.M., Buhr, M., Golovan, S.P. 2008. The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology* 70(8), 1288-1296.
- KASAMATSU, T., Kohda, K., Kawazoe, Y. 1996. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the Comet assay. *Mutation Research* 369, 1-6.
- KEYER, K., Gort, A.S., Imlay, J.A. 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology* 177 (23), 6782-6790.
- KIM, I-Y., Hyun, C-K. 2006. Comparative evaluation of the alkaline Comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
- KIM, G.B., Lee, L.F. 2004. Effects of genotoxic compounds on DNA and development of early and late grass shrimp embryo stages. *Marine Environmental Research* 57, 329-338.
- KOBAYASHI, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun* 3, 103-115.
- KOSINSKA, W., Pelle, E., von Pressentin, M.M., Chen, M., Guttenplan, J.B. 2002. Comparative mutagenicities of bleomycin and ferric-nitritotriacetate in lacZ mice. *Cancer Letters* 187, 41-46.
- KOSMEHL, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H. 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake

(The Philippines) as measured by the Comet assay. *Mutation Research* 650, 1-14.

- LACAZE, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A. 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research* article in Press.
- LAFFON, B., Rábade, T., Pásaro, E., Méndez, J. 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International* 32, 342-348.
- LAWRENCE, E., Isioma, T. 2010. Acute toxic effects of Endosulfan and Diazinon pesticides on adult amphibians (*Bufo regularis*). *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 2(5), 73-78.
- LEE, R.F., Steinert, S. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544, 43-64.
- LEE, R., Kim, Y.J., Lee, Y.J., Chung H.W. 2004. The selective effect of genistein on the toxicity of bleomycin in normal lymphocytes and HL-60 cells. *Toxicology* 195, 87–95.
- LINZEY, D., Burroughs, J., Hudson, L., Marini, M., Robertson, J., Bacon, J., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. 2003. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *International Journal of Environmental Health Research* 13, 125-148.

- MCKELVEy-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutation Research* 288(1), 47-63.
- MANN, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B. Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157, 2903-2927.
- MARQUIS, O., Miaud, C., Ficetola, G.F., Bocher, A., Mouchet, F., Guittonneau, S., Devaux, A. 2009. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquatic Toxicology* 95, 152-161.
- MASELLI, V., Polese, G., Rippa, D., Ligrone, R., Rastogi, R.K., Fulgione, D. 2010. Frogs, sentinels of DNA damage induced by pollution in Naples and the neighbouring provinces. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Article in Press.
- MEINTIÈRES, S., Nessler, F., Pallardy, M., Marzin, D. 2003. Detection of ghost cells in the standard alkaline Comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41, 260-269.
- MERK, O., Speit, G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32, (19) 260-268.
- MIR, L.M., Tounekti, O., Orlowski, S. 1996. Bleomycin: revival of an old drug. *General Pharmacology* 27(5), 745-748.

- MITCHELMORE, C.L., Chipman, J.K. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the Comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 399, 135-147.
- MIYAMAE, Y., Zaizen, K., Ohara, K., Mine, Y., Sasaki, Y.F. 1998. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutation Research* 415, 229-235.
- MØLLER, P., Loft, S., Lundby, C., Olsen, N.V. 2001. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *The FASEB Journal* 15, 1181-1186.
- MOUCHET, F., Gauthier, L., Mailhes, C., Jourdain, M-J., Ferrier, V., Triffault, G., Devaux, A. 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the Comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). *Science of the Total Environment* 355, 232-246.
- NIGRO, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F. 2002. Induction of DNA strands breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research* 54, 517-520.
- O'CALLAGHAN, Y.C., Woods, J.A. O'Brien, N.M. 2001. Limitations of the single-cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7 β -hydroxycholesterol. *Biochemical Pharmacology* 61, 1217-1226.

- OLIVE, P.L., Banáth, J.P., Durand, R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Research* 122(1), 86-94.
- OLIVE, P.L., Wlodek, D., Dufund, R.E. Banáth, J.P. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research* 198, 259-267.
- OLIVE, P.L., Frazer, G., Banáth, J.P. 1993. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. *Radiation Research* 136, 130-136.
- OLIVE, P.L., Banáth, J.P. 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the Comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research* 221, 19-26.
- ORTEGA, J.E., Jerez, A., Ramírez-Pinilla, M.P. 2001. Geographic distribution: *Eleutherodactylus johnstonei*. *Herpetological Review* 32, 269.
- ORTEGA, J.E., Serrano, V.H., Ramírez-Pinilla, M.P. 2005. Reproduction of an introduced population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. *Copeia* 2005, 642-648.
- OSTLING, O., K.J Johanson. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.
- Ovaska, K. 1991. Reproductive phenology, population structure, and habitat use of the frog *Eleutherodactylus johnstonei* in Barbados, West Indies. *Journal of Herpetology* 25, 424-430.

- PAVLICA, M., Klobučar, G.I.V., Mojaš, N., Erben, R., Papeš, D. 2001. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using Comet assay. *Mutation Research* 490, 209-214.
- PELTZER, P.M., Lajmanovich, R.C., Sánchez-Hernandez, J.C., Cabagna, M.C., Attademo, A.M., Bassó, A. 2008. Effects of agricultural pond eutrophication on survival and health status of *Scinax nasicus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 185-197.
- PRIETO, E. A., Llópiz, N.D. 1999. Normalización de la electroforesis de células individuales (ensayo Cometa). *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 18, 34-36.
- PRON, G., Mahrour, N., Orłowski, S., Tounekti, O., Poddevin, B., Belehradek, J. Jr., Mir, L.M. 1999. Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism. *Biochemical Pharmacology* 57, 45-56.
- POVIRK, L.F., Wübter, W., Köhnlein, W., Hutchinson, F. 1977. DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. *Nucleic Acids Research* 4(10), 3573-3580.
- POVIRK, L.F. 1996. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutation Research* 355 71-89.
- RAJAEI-BEHBAHANI, N., Schmezer, P., Risch, A., Rittgen, W., Kayser, K.W., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Thiel, S., Bartsch, H. 2001. Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *International journal of cancer* 95, 86-91.

- RAJAGURU, P., Kalpana, R., Hema, A., Suba, S., Baskarasethupathi, B., Kumar, P. A., Kalaiselvi, K. 2001. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 38, 316-322.
- RALPH, S., Petras, M., Pandrangi, R., Vrzoc, M. 1996. Alkaline single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28, 112-120.
- RALPH, S., Petras, M. 1997. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (Comet) Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 418-430.
- RALPH, S., Petras, M. 1998. Comparison of sensitivity to methyl methane sulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31, 374-382.
- RELYEA, R.A. 2004a. Synergistic impacts of malathion and predatory stress on six species of north american tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1080-1084.
- RELYEA, R.A. 2004b. Growth and survival of five amphibian species exposed to combinations of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1737-1742.
- RELYEA, R.A. 2005. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15(4), 1118–1124.

- ROHR, J.R., Crumrine, P.W. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications* 15, 1135-1147.
- ROJAS, E., Lopez, M.C., Valverde, M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography* 722, 225-254.
- ROSER, S., Pool-Zobel, B-L., Rechkemmer, G. 2001. Contribution of apoptosis to responses in the Comet assay. *Mutation Research* 497, 169-175.
- RUDDERS, R.A. 1972. Treatment of advanced malignant lymphomas with bleomycin. *Blood* 40(3), 317-32.
- RUIZ-Carranza, P.M., Ardila-Robayo, M.C., Lynch, J.D. 1996. Lista actualizada de la fauna amphibia de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 20, 365-415.
- RUSSELL, L.B., Hunsicker, P.R., Shelby, M.D. 1996. Chlorambucil and bleomycin induce mutations in the specific-locus test in female mice. *Mutation Research* 358, 25-35.
- RYDBERG, B., Johanson, K.J. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In *DNA Repair Mechanisms*, P. C. Hanawalt, E. C. Friedberg and C. F. Fox, eds (New York, Academic Press), 465-468.
- SAUSVILLE, E.A., Peisach, J., Horwitz, S.B. 1978. Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemistry* 17(14), 2740-2746.

- SCHMEZER, P., Rajaei-Behbahani, N., Risch, A., Thiel, S., Rittgen, W., Drings, P., Dienemann, H., Kayser, K.W., Schulz, V., Bartsch, H. 2001. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 16(1), 25-30.
- SEMLITSCH, R.D., Bridges, C.M., Welch, A.M. 2000. Genetic variation and a fitness tradeoff in the tolerance of gray treefrog (*Hyla versicolor*) tadpoles to the insecticide carbaryl. *Oecologia* 125, 179-185.
- SHELBY, M.D. Bishop, J.B., Mason, J.M., Tindall, K.R. 1993. Fertility, reproduction, and genetic disease: studies on the mutagenic effects of environmental agents on mammalian germ cells. *Environmental Health Perspectives* 100, 283-291.
- SILVA, J., Freitas, T.R.O., Marinho, J.R., Speit, G., Erdtmann, B. 2000. An alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology* 23, 241-245.
- SINGH, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- SINGH, N. P. 2000a. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research* 256, 328-337.
- SINGH, N.P. 2000b. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research* 455, 111-127.
- SINGH NP, Muller CH, Berger RE. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility* 80(6), 1420-1430.

- SINGH, N.P. 2005. Apoptosis assessment by the DNA Diffusion assay. *Methods in Molecular Medicine, Chemosensitivity 2*, 55-57.
- SPEIT, G., Trenz, K., Schütz, P., Rothfuss, A., Merk, O. 1999. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the Comet assay. *Toxicology Letters 110(1-2)*, 73-78.
- STEINERT, S.A. 1996. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Marine Environmental Research 42*, 253-259.
- STEINERT, S.A. 1999. DNA damage as a bivalve biomarker. *Biomarkers 544*, 43-64.
- SUZUKI, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N., Umezawa, H. 1970. On the mechanism of action of bleomycin: scission of DNA strands *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Antibiotics 23(10)*, 473-480.
- SWEET, L.I., Passino-Reader, D.R., Meier, P.G., Omann, G.M. 1999. Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers 4*, 237-253.
- TAKESHITA, M., Grollman, A.P., Ohtsubo, E., Ohtsubo, H. 1978. Interaction of bleomycin with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 75(12)*, 5983-7.
- TICE, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y. F. 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis 35*, 206-221.

- TOUNEKTI, O., Pron, G., Belehradec, J., Mir, L.M. 1993. Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized. *Cancer research* 53, 5462-5469.
- UMEZAWA, H., Takeuchi, T., Hori, S., Sawa, T., Ishizuka, M. 1972. Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin of squamous cell carcinoma. *The Journal of Antibiotics* 25(7), 409-420.
- VAN Straalen, N., Timmermans, M. 2002. Genetic variation in toxicant-stressed populations: An evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment* 8(5), 983-1002.
- VASQUES, M, Tice, R.R. 1997. Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG). *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 28.
- WADA, S., Khoa, T.A., Kobayashi, Y., Funayama, T., Yamamoto, K., Natsuhori, M., Ito, N. 2003. Detection of radiation-induced apoptosis using the Comet assay. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 1161-1166.
- WALLACH-Dayana, S.B., Izbicki, G., Cohen, P.Y., Gerstl-Golan, R., Fine, A., Breuer, R. 2006. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *The American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L790–L796.
- WANG, T.S., Chung, C.H., Wang, A.S., Bau, D.T., Samikkannu, T., Jan, K.Y., Cheng, Y.M., Lee, T.C. 2002. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase, and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chemical Research in Toxicology* 15(10) 1254-1258.

- WELLS, K.D. 2007. The ecology and behavior of amphibians. The University of Chicago Press.
- WENG, H., Lu, Y., Weng, Z., Morimoto, K. 2008. Differential DNA damage induced by H₂O₂ and bleomycin in subpopulations of human white blood cells. *Mutation Research* 652, 46-53.
- WILKINS, R.C., Kutzner, B.C., Truong, M. Sanchez-Dardon, J., and McLean, J.R.N. 2002. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: Flow cytometry using annexin V and propidium iodide versus the neutral Comet assay. *Cytometry* 48, 14-19.
- WONG, V.W.C., Szeto, Y.T., Collins, A.R., Benzie, I.F.F. 2005. The Comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. *Current Topics in Nutraceutical Research* 3(1), 1-14.
- YIN, X., Zhu, G., Li, X.B., Liu, S. 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research* 680, 2-6.
- YU, T-W., Anderson, D. 1997. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: A chemical investigation. *Mutation Research* 379, 201-210.
- ZELJEZIC, D., Garaj-Vrhovac, V., Perkovic, P. 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes *in vitro* using a Comet and DNA Diffusion assay. *Toxicology In Vitro* 20(6), 923-935.
- ZOLL-MOREUX, C., Ferrier, V. 1999. The jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in *Xenopus*: two *in vivo* tests on amphibia evaluation

of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents. Water Research 33, 2301-2314.

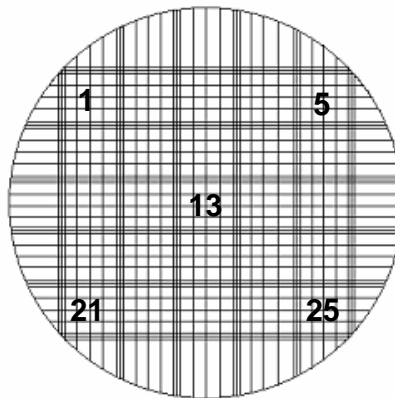
ANEXOS

ANEXO 1. RECuento DE CÉLULAS SANGUÍNEAS CON LA CÁMARA NEUBAUER EN E. JOHNSTONEI.

El recuento celular tiene como objetivo determinar el número de células que están comprendidos en una unidad de volumen de sangre (1 mm^3).

El procedimiento consta de 3 fases: dilución de la sangre, conteo del número de células y cálculo del número de células presentes en 1 mm^3 de sangre.

1. Dilución de la sangre: $10 \mu\text{L}$ de sangre se diluyeron en $200 \mu\text{L}$ de NaCl 0.9% (solución salina). La sangre se diluyo 21 veces.
2. Conteo del número de células: se realizo en el cuadro central de la cámara, el recuento se efectúa en cinco de los 25 cuadrados con el ocular de 40X, generalmente se cuentan los cuadros de las esquinas y el central, lo que garantiza un conteo aleatorio. Las células que son contables son aquellas que no tocan la segunda línea de división de cada cuadrícula, que tiene tres líneas que la delimitan.



3. Cálculo del número de células: para determinar el número de células por unidad de volumen se utiliza la siguiente fórmula.

$$\text{Células/mm}^3 = \frac{\text{Número de células contadas} \times \text{factor de dilución}}{0.1 \text{ mm}^3 \times 1 \text{ mm}^3 \times 1 \text{ mm}^3 \times 5/25}$$

Donde:

Número de células contadas = 71

Factor de dilución = 21

Células/mm³ = 74.550

Células/ml = 74.550 células/mm³ x 1000 mm³ / 1 mL = 74.550.000 células/mL

Densidad celular de *E. johnstonei* = **7.45 x 10⁷ células/mL**

Se realizaron pruebas para 6 concentraciones diferentes de células en un rango de 1 a 10 µL de sangre.

| Sangre | Primera dilución * | Segunda dilución ** | Tercera dilución *** | Dilución final | Células/mL |
|--------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------|------------------------|
| 10 µL | 3 | 3 | 4.75 | 11 | 6.77 x 10 ⁶ |
| 5 µL | 3 | 5 | 4.75 | 13 | 5.73 x 10 ⁶ |
| 2.5 µL | 3 | 8 | 4.75 | 16 | 4.66 x 10 ⁶ |
| 2 µL | 3 | 10 | 4.75 | 18 | 4.14 x 10 ⁶ |
| 1.5 µL | 3 | 13.3 | 4.75 | 21 | 3.55 x 10 ⁶ |
| 1 µL | 3 | 20 | 4.75 | 28 | 2.66 x 10 ⁶ |

* 50 µL de sangre en 100 µL de NaCl 0.9%.

** (1-10) µL de sangre* en 20 µL de proteinasa K.

*** 20 µL de proteinasa K** en 75 µL de agarosa.

**ANEXO 2. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA BAJO CONDICIONES
ALCALINAS SEGÚN SINGH *ET AL.* (1988) CON LAS MODIFICACIONES
HECHAS POR DÍAZ *ET AL.* (2009).**

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN: Este procedimiento establece los pasos necesarios y obligatorios para la realización del Ensayo Cometa (Single Cell Gel Electroforesis). Abarca el análisis de muestras celulares de sangre periférica.

2. DEFINICIONES:

2.1 Cometa: Migración del ADN nuclear que se produce por la acción de un campo eléctrico, tomando la forma del cuerpo celeste que le da nombre. Esta migración es directamente proporcional al daño expresado en roturas de doble y simple cadena que presente el núcleo de la célula analizada.

2.2 Lisis celular: Ruptura de las membranas citoplasmática y nuclear provocada por tratamiento químico.

2.3 Control positivo: Tratamiento con agente mutagénico físico o químico de referencia.

2.4 Apoptosis: También llamada “muerte celular programada”, es un proceso fisiológico activo y dependiente de energía, donde ocurren cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan la muerte celular.

2.5 Control de Apoptosis: Láminas a las cuales no se les realiza electroforesis para determinar el porcentaje de apoptosis mediante el método del Halo.

3. PRINCIPIO: Este ensayo consiste en la inmovilización de las células en un gel de agarosa, su lisis y la posterior realización de una electroforesis alcalina para detectar las roturas de simple y doble cadena del ADN. Se realiza en portaobjetos y se observa al microscopio el núcleo celular con una cola cuya intensidad es directamente proporcional al nivel de daño.

4. EQUIPOS: Cámara horizontal de electroforesis, microscopio óptico, fuente de electroforesis GP, autoclave, pHmetro, balanza técnica, refrigerador, fuente de Cobalto 60.

5. REACTIVOS Y MATERIALES

5.1 Materiales: Tubos eppendorf estériles, portaobjetos, cubreobjetos, pinza, Coplins, micropipetas, puntas estériles.

5.2 Reactivos:

| | |
|---|--------------------------------------|
| Hidróxido de Sodio | Tris |
| Acido Etilendiamino tetracético (EDTA) | Na Sarcosil |
| Carbonato de Sodio | Dimetil Sulfóxido (DMSO) |
| Nitrato de Amonio | Tritón X 100 |
| Nitrato de Amonio | Acido Tricloroacético (TCA) |
| Nitrato de Amonio | Sulfato de Zinc |
| Nitrato de Plata | Glicerol |
| Acido Tungstofosfórico | Formol |
| Agarosa grado molecular (APFN) | Acido Acético (Hac) |
| Agarosa de bajo punto de fusión (LGT) | Cloruro de Sodio |

6. SOLUCIONES

6.1. APFN 1,3 %: Se pesan 0.39 g de APFN y se disuelven con calor en 30 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.2. LGT 1%: Pesar 0.3 g de LGT y se disuelven con calor en 30 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.3. Lisis madre: Pesar los siguientes reactivos y mezclarlos según el orden de la tabla. Completar el volumen hasta 100 mL con agua destilada y ajustar el pH a 10.0 con perlas de NaOH. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

| | |
|-------------|---------|
| NaCl | 14.61 g |
| EDTA | 3.72 g |
| Tris | 0.12 g |
| Na Sarcosil | 3.3. mL |

6.4. Solución para lisis fresca: Se debe preparar en el momento de utilizarse. Mezclar en el siguiente orden y completar el volumen a 100 mL con agua destilada, suficiente para dos Coplins.

| | |
|--------------------------|-------|
| Lisis madre | 89 mL |
| Dimetil sulfóxido (DMSO) | 10 mL |
| TritónX-100 | 1 mL |

6.5. Buffer de Neutralización: Pesar 43.62 g de Tris y disolver en 900 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.5. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.6. Solución NaCl 0.9%: Pesar 0.9 g de NaCl, disolver y ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.7. NaOH 10N: Pesar 120 g de NaOH y disolver en 300 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.8. EDTA 200mM: Pesar 4.47 g de EDTA y disolver en 300 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.9. Buffer de corrida: Esta solución se puede utilizar en varias corridas. Mezclar ambas soluciones y completar a 1,5 L con agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

| | |
|-------------|--------|
| NaOH 10N | 45 mL |
| EDTA 200 mM | 7.5 mL |

6.10. Solución de fijación: Se debe preparar en el momento de utilizarse. Pesar los siguientes reactivos y mezclarlos según el orden de la tabla. Completar el volumen hasta 100 mL con agua destilada, suficiente para dos Coplins.

| | |
|-----------------|------|
| TCA | 15 g |
| Sulfato de Zinc | 5 g |
| Glicerol | 5 mL |

6.11. Carbonato de Sodio 5X: Se pesan 50 g de Carbonato de Sodio y se disuelven en 200 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.12. Nitrato de Amonio 10X: Se pesan 0.4 g de Nitrato de Amonio y se disuelven en 10 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.13. Nitrato de Plata 10X: Se pesan 0.8 g de Nitrato de Plata y se disuelven en 10 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

6.14. Tinción 1: Se disuelven 20 mL de Carbonato de Sodio 5X en 100 mL de agua destilada. Se debe preparar en el momento de utilizarse.

6.15.Tinción 2: Mezclar las siguientes soluciones y reactivos en el orden de la tabla. Completar hasta 200 mL con agua destilada. Se debe preparar en el momento de utilizarse.

| | |
|------------------------|--------|
| Nitrato de Amonio 10X | 1 mL |
| Nitrato de Plata 10X | 1 mL |
| Acido Tungstofosfórico | 1 mL |
| Formol | 0.3 mL |

6.16.Tinción final: Mezclar 34 mL de la Tinción1 con 66 mL de Tinción 2. Se debe preparar en el momento de utilizarse.

6.17.Solución stop: Se debe preparar en el momento de utilizarse. Disolver 1 mL de HAc en 100 mL de agua destilada.

7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1. Ensayo Cometa:

7.1.1. A cada laminilla se le añaden 150 μ L de agarosa grado molecular preparada al 1.3%. La agarosa se extiende para formar una capa que cubra la mayor parte del portaobjetos dejando libre la zona del rótulo. Estas preparaciones se pueden hacer con varios días de antelación. Esta es la primera capa. Se preparan al menos dos portaobjetos por cada muestra y dos por cada control de apoptosis.

7.1.2. Mezclar en tubos eppendorf: 50 μ L de la sangre con 100 μ L de una solución de NaCl al 0.9%. De la mezcla anterior tomar 20 μ L y mezclar con 75 μ L de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (LGT) preparada al 1 % previamente precalentada a 40°C.

- 7.1.3.** Gotear 75 μ L de la mezcla anterior y extender sobre el portaobjeto previamente preparado con agarosa al 1.3 % usando un cubreobjeto. Dejar solidificar en una bandeja en posición horizontal a 4°C durante 5-10 minutos. Añadir 75 μ L de LGT sin células y extender con un cubreobjeto. Dejar solidificar nuevamente a 4°C durante 5-10 minutos. Esta capa de agarosa es opcional.
- 7.1.4.** Colocar las laminillas preparadas en un Coplin conteniendo solución de lisis celular e incubar a 4°C durante 1 hora. Colocar las laminillas en la cubeta de electroforesis previamente refrigerada y dejar incubar durante 25 minutos en el buffer de corrida. Desarrollar corrida electroforética a 25 V, 300 mA, durante 25-30 minutos. Colocar laminillas en un Coplin con solución neutralizante por unos minutos. Lavar con H₂O destilada y secar en la incubadora a 37°C durante 1 hora.
- 7.1.5.** Para el desarrollo de la tinción de los núcleos se requiere pasar las laminillas por diferentes soluciones. El procedimiento se lleva a cabo en el siguiente orden y tiempos de incubación.
- Colocar en H₂O destilada durante 1 minuto para hidratación
 - Colocar en la solución de fijación durante 10 minutos
 - Colocar en H₂O destilada durante 1 minuto para enjuagar laminilla
 - Secar en la incubadora a 37°C durante 30 minutos
 - Colocar en solución de tinción durante 10-15 minutos
 - Repetir el paso anterior en solución de tinción fresca durante 4-5 minutos
 - Colocar en H₂O destilada durante 1 minuto para enjuagar laminilla
 - Colocar en la solución Stop durante 1 minuto para detener reacción
 - Colocar en H₂O destilada durante 1 minuto para enjuagar laminilla
 - Secar a temperatura ambiente y observar al microscopio.

8. REQUISITOS:

- 8.1.** Todo el ensayo debe realizarse en frío y condiciones de oscuridad o bajo luz roja.
- 8.2.** El agua que se utiliza para preparar todas las soluciones y para lavar debe ser destilada
- 8.3.** El trabajo debe realizarse utilizando guantes y bata de laboratorio
- 8.4.** Las puntas y los tubos eppendorf deben estar estériles

9. ENSAYO DE VERIFICACIÓN: No se realiza este ensayo porque la muestra tiene vida limitada.

10. CÁLCULO E INFORME DE ENSAYO

El análisis de los Cometas se realiza utilizando unidades arbitrarias en cinco clasificaciones que se detallan a continuación.

10.1. Caracterización de los grados de daño.

10.1.1. Grado 0: Imagen con una cabeza con forma circular o ligeramente ovalada, de color negro intenso, rodeada por una capa fina de gránulos o puntos en forma de halo, que muestran una coloración gris. No presenta ningún tipo de gránulos formando una cola. El esquema de la imagen es el siguiente:

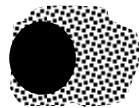


10.1.2. Grado 1: Imagen con una cabeza con forma circular o ligeramente ovalada, de color negro intenso. Tiene una cola formada por gránulos o puntos dispersos que aparecen al final de la cabeza. El ancho de la cola es similar al de la

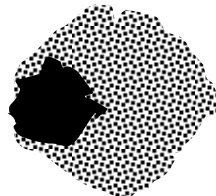
cabeza y su intensidad no es significativa aunque se diferencia claramente de la cabeza. El esquema de la imagen es el siguiente:



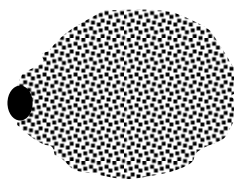
10.1.3. Grado 2: Imagen con una cabeza con forma circular o semicircular. Tiene una cola que se origina desde la mitad o parte delantera de la cabeza y se ensancha ligeramente en el centro. La intensidad de la tinción de la cola es significativa pero permite distinguir los límites de la cabeza. El esquema de la imagen es el siguiente:



10.1.4. Grado 3: Imagen con una cabeza con forma circular o semicircular, con contornos difusos. Tiene una cola que se origina desde el inicio de la cabeza y se ensancha significativamente en el centro. La intensidad de la tinción de la cola es significativa y dificulta definir el límite de la cabeza. El esquema de la imagen es el siguiente:



10.1.5. Grado 4: Imagen con una cabeza muy pequeña, de forma circular. La cola ocupa la mayoría de la imagen con una intensidad significativa que permite distinguir claramente la pequeña cabeza del Cometa. El esquema de la imagen es el siguiente:



10.2. Interpretación de los resultados

Por cada preparación se cuentan al menos 100 células (en total 200 por tratamiento) y se anotan cuantas se observaron en cada categoría. Los datos se registran de la siguiente forma y se calculan las Unidades Arbitrarias (UA) para cada una:

$$0 \times \# \text{ Grado 0 encontrados} = 0$$

$$1 \times \# \text{ Grado 1 encontrados} = N_1$$

$$2 \times \# \text{ Grado 2 encontrados} = N_2$$

$$3 \times \# \text{ Grado 3 encontrados} = N_3$$

$$4 \times \# \text{ Grado 4 encontrados} = N_4$$

$$UA = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$$

Las UA de cada lámina se promedian con su réplica. La estadística a utilizar dependerá del diseño del experimento.

10.2.1. Estimación del daño

| UA | Clasificación |
|---------|---------------|
| 0-100 | No hay daño |
| 101-200 | Poco daño |
| 201-300 | Daño moderado |
| 301-400 | Daño severo |

11. BIBLIOGRAFÍA

11.1. Collins A., Dusinska A, Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayoitidis M., Raslova K. y Vaughan N., (1997) Comet assay in Human Biomonitoring studies: Reliability, validation and applications. *Env. Mol. Mutag.* 30, 139-146.

11.2. Fairbain D.W., Olive P.L. y O'Neill K.I., (1995) The Comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.

11.3. Nadin S.B, Vargas-Roig L.M. y Ciocca D.R., (2001) A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49(9), 1183-1186.

11.4. Singh N.P., Stephens E.L. y Schneider E.L., (1994) Modifications of alkaline Comet assay microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 23-8.

ANEXO 3. PROTOCOLO DEL ENSAYO COMETA MODIFICADO PARA E. JOHNSTONEI.

1.1. SOLUCIONES, MATERIALES Y EQUIPOS REQUERIDOS

1.1.1. SOLUCIONES:

APFN 1,3 %: Se pesan 0.39 g de APFN (Agarosa grado molecular) y se disuelven con calor en 30 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

LGT 1%: Pesar 0.3 g de LGT (Agarosa de bajo punto de fusión) y se disuelven con calor en 30 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

Solución de Proteinasa K: Se disuelven 100 mg de Proteinasa K en 1 mL de Buffer Proteinasa K. La lisis enzimática se desarrolla a una concentración final en solución 0.19 mg/mL. En el gel de agarosa queda realmente a 0.04 mg/mL.

Buffer Proteinasa K (pH 8.0)

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl | 50 mM |
| CaCl ₂ | 10 mM |

Buffer de Neutralización: Pesar 43.62 g de Tris y disolver en 900 mL de agua destilada. Ajustar pH a 7.5. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

Solución NaCl 0.9%: Pesar 0.9 g de NaCl y disolver y ajustar el volumen a 100 mL con agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

NaOH 10N: Pesar 120 g de NaOH y disolver en 300 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

EDTA 200mM: Pesar 4.47 g de Ácido Etilendiamino tetracético (EDTA) y disolver en 300 mL de agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

Buffer de corrida: Esta solución se puede utilizar en varias corridas. Mezclar ambas soluciones y completar a 1,5 L con agua destilada. Se puede guardar en frío durante 1 mes.

| | |
|-------------|--------|
| NaOH 10N | 45 mL |
| EDTA 200 mM | 7.5 mL |

Solución de fijación: Se debe preparar en el momento de utilizarse. Pesar los siguientes reactivos y mezclarlos según el orden de la tabla. Completar el volumen hasta 100 mL con agua destilada suficiente para dos Coplins.

| | |
|--------------------------------|------|
| Ácido Tricloroacético (TCA) | 15 g |
| Sulfato de Zinc heptahidratado | 5 g |
| Glicerol | 5 mL |

Solución de Tinción 1: Se pesan 5 g de Carbonato de Sodio y se disuelven en 100 mL de agua destilada.

Solución de Tinción 2: Mezclar los siguientes reactivos en el orden de la tabla. Completar hasta 100 mL con agua destilada. Se debe preparar en el momento de utilizarse.

| | |
|------------------------|---------|
| Nitrato de Amonio | 0.1 g |
| Nitrato de Plata | 0.2 g |
| Acido Tungstofosfórico | 0.125 g |
| Formol | 0.2 mL |

Solución de Tinción Final: Mezclar 66 mL de la solución de Tinción 1 con 34 mL de la solución de Tinción 2. Se debe preparar en el momento de utilizarse.

Solución Stop: Se debe preparar en el momento de utilizarse. Disolver 1 mL de Ácido Acético (1%) en 100 ml de agua destilada.

1.1.2. MATERIALES REQUERIDOS:

Tubos eppendorf estériles, portaobjetos, cubreobjetos, pinzas, frascos Coplins, micropipetas regulables (1000, 200 y 20 μ L) con puntas correspondientes estériles, guantes.

1.1.3. EQUIPOS REQUERIDOS:

Autoclave, pHmetro, balanza técnica, refrigerador, cámara de electroforesis horizontal con su equipo de refrigeración, fuente de electroforesis, microscopio óptico.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.1. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra será colectada por punción al corazón del animal utilizando una jeringa para insulina. A tales fines, se colocaran en bolsas de colecta los diferentes ejemplares y se conservaran en frío (4-8°C) por un periodo de 20 a 30 minutos. Para la extracción de las muestras de sangre, los ejemplares se diseccionan por el tórax para visualizar el corazón y se realiza la extracción de sangre mediante punción directa. Las muestras deben mantenerse en tubos Eppendorff previamente heparinizados a una temperatura entre 4 y 8°C. La sangre debe ser usada para la inmovilización y lisis celular antes de las 24 horas de extraída.

1.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Primer paso: A cada portaobjetos se le añaden 400 μL de agarosa grado molecular preparada al 1.3%. La agarosa se extiende para formar una capa que cubra la mayor parte del portaobjetos dejando libre la zona del rótulo. Estas preparaciones se pueden hacer con varios días de antelación y se preparan al menos dos portaobjetos por cada muestra y dos por cada control de apoptosis.

Segundo paso: Mezclar en tubos eppendorf: 4 μL de sangre (densidad celular 3.55×10^6 células/mL) con 20 μL de mutágeno (controles positivos) o 20 μL de NaCl al 0.9% (controles negativos), dejar incubar a 4°C durante el tiempo de exposición establecido para el mutágeno. Posteriormente, centrifugar las muestras (controles positivos y negativos) a 10.000 rpm por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 20 μL de solución de Proteinasa K (preparada a 0.19 mg/mL). A la mezcla anterior se le adicionan 75 μL de una solución de agarosa de bajo punto de fusión (LGT) preparada al 1 % previamente precalentada a 40°C.

Tercer paso: Gotear 75 μL de la mezcla anterior y extender sobre la capa de agarosa previamente preparada usando un cubreobjeto. Dejar solidificar en una bandeja en posición horizontal a 4°C durante 10 minutos.

Cuarto paso: Retirar los cubreobjetos y colocar las laminillas en la cubeta de electroforesis previamente refrigerada y dejar incubar durante 25 minutos en el buffer de corrida. Desarrollar corrida electroforética a 25 V, 300 mA, durante 30 minutos. Colocar laminillas en un Coplin con solución neutralizante por 5 minutos. Lavar las laminillas con H₂O destilada y secar en la incubadora a 37°C overnight.

Quinto paso: Para el desarrollo de la tinción de los núcleos, se requiere preparar frascos Coplins conteniendo diferentes soluciones. El procedimiento consistirá en

pasar las laminillas de un frasco a otro considerando el siguiente orden y tiempos de incubación.

Coplin 1: Colocar en la solución de fijación durante 10 minutos

Coplin 2: Colocar en H₂O destilada durante unos minutos para enjuagar las laminillas. Secar en la incubadora a 37°C durante 3 horas.

Coplin 3: Colocar en H₂O destilada durante 5 minutos para rehidratar

Coplin 4: Colocar en solución de tinción durante 20 minutos

Coplin 5: Colocar en H₂O destilada durante unos minutos para enjuagar la laminillas, repetir el proceso dos veces.

Coplin 6: Colocar en la solución Stop durante 5 minutos para detener la reacción

Secar a temperatura ambiente y observar al microscopio.

Es importante considerar los siguientes requisitos durante el ensayo:

- Todo el ensayo debe realizarse en frío y condiciones de oscuridad o bajo luz roja
- El agua que se utiliza para preparar todas las soluciones y para lavar debe ser destilada
- El trabajo debe realizarse utilizando guantes y bata de laboratorio
- Las puntas y los tubos Eppendorf deben estar estériles
- En cada ensayo, se debe incluir siempre un control negativo (0.9 % NaCl), uno positivo (laminillas expuestas al mutágeno) y un control de apoptosis (laminillas con sangre no tratadas a las que no se les aplica la electroforesis)

2. CÁLCULO DE LOS ESTIMADOS DE DAÑO

Para estimar el daño genético mediante el ensayo Cometa se requiere clasificar el daño en cinco clases o niveles que sirven de base para el cálculo de un indicador (Unidades Arbitrarias) del daño genético.

Por cada preparación se cuentan al menos 100 células (en total 200 por tratamiento) y se anotan cuantas se observaron en cada categoría. Los datos se registran de la siguiente forma y se calculan las Unidades Arbitrarias (UA) para cada una:

0 x número de núcleos encontrados en el Nivel 0 = 0

1 x número de núcleos encontrados en el Nivel 1 = N_1

2 x número de núcleos encontrados en el Nivel 2 = N_2

3 x número de núcleos encontrados en el Nivel 3 = N_3







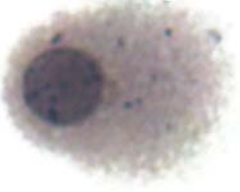
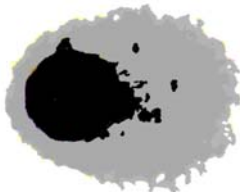
4 x número de núcleos encontrados en el Nivel 4 = N_4

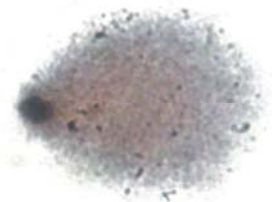
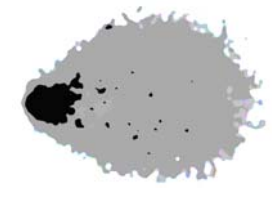


$$UA = N_1 + N_2 + N_3 + N_4$$

Las UA obtenidas por tratamientos se promedian y el criterio de daño es el siguiente:

| UA | Clasificación |
|-----------|----------------------|
| 0 -100 | No hay daño |
| 101 - 200 | Poco daño |
| 201 - 300 | Daño moderado |
| 301 - 400 | Daño severo |

2.1. Caracterización de los grados de daño.

| CLASES DE DAÑO | FOTOGRAFIA | ESQUEMA |
|---|--|---|
| <p>Nivel 0</p> <p>Cabeza con forma circular o ligeramente ovalada de color negro intenso, rodeada por una capa fina de gránulos o puntos en forma de halo.</p> |  |  |
| <p>Nivel 1</p> <p>Cabeza con forma circular o ligeramente ovalada de color negro intenso, que tiene una pequeña cola formada puntos dispersos en uno de los lados de la cabeza.</p> |  |  |
| <p>Nivel 2</p> <p>Cabeza con forma circular o semicircular que tiene una cola originada desde la mitad o parte delantera de la cabeza y se ensancha ligeramente en el centro.</p> |  |  |
| <p>Nivel 3</p> <p>Cabeza con forma circular o semicircular con contornos difusos que tiene una cola que se origina desde el inicio de la cabeza y se ensancha</p> |  |  |





























| | | |
|--|--|---|
| significativamente en el centro. | | |
| <p>Nivel 4</p> <p>Cabeza muy pequeña de forma circular. La cola ocupa la mayoría de la imagen con una intensidad significativa.</p> |  |  |
| <p>Apoptosis</p> <p>Células apoptóticas presentan un núcleo más pequeño rodeado por un halo de fragmentos del núcleo con un límite nebuloso.</p> |  |  |

4. BIBLIOGRAFÍA

- 4.4.** Collins A., Dusinska A, Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayoitidis M., Raslova K. y Vaughan N., (1997) Comet assay in Human Biomonitoring studies: Reliability, validation and applications. *Env. Mol. Mutag.* 30, 139-146.
- 4.5.** Díaz A., Carro S., Santiago L., Estévez J., Guevara C., Blanco M., Sánchez L., Sánchez L., López N., Cruz D., López R., Cuetara E., y Fuentes J.L., (2009) Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA Diffusion assays. *Genet. Mol. Biol.* 32(2), 367-372.
- 4.6.** Fairbain D.W., Olive P.L. y O'Neill K.I., (1995) The Comet assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- 4.7.** Garcia O., Romero I., Gonzales J.E., Mandina, T. (2007) Measurement of DNA damage on silver stained Comets using free Internet software. *Mutat. Res.* 627, 186-190.

- 4.8.** Kang, J .H., Hakimov H., Ruiz A., Friendship R.M., Buhr M., Golovan S.P., (2008) The negative effects of exogenous DNA binding on porcine spermatozoa are caused by removal of seminal fluid. *Theriogenology* 70(8), 1288-1296.
- 4.9.** Nadin S.B, Vargas-Roig L.M. y Ciocca D.R., (2001) A silver stainig method for single-cell gel assay. *J. Histochem. Cytochem.* 49(9), 1183-1186.
- 4.10.** Singh N.P., Stephens E.L. y Schneider E.L., (1994) Modifications of alkaline Comet assay microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 23-8.
- 4.11.** Singh N.P., Muller C.H., Berger R.E., (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil. Steril.* 80(6), 1420-1430.

**ANEXO 4. EFECTO DEL PH Y EL TIEMPO DE INCUBACIÓN SOBRE LA LISIS
ALCALINA DE LAS CÉLULAS SANGUÍNEAS DE *E. JOHNSTONEI* EN EL
ENSAYO COMETA. LOS DATOS SON MOSTRADOS COMO MEDIA ± ERROR
ESTÁNDAR (N=60).**

| Tiempo | Respuesta [†] | pH 10 | pH 11 | pH 12 | pH 13 |
|--------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 2 h |  | 0,75 ± 0,58 | 1,63 ± 0,82 | 0,10 ± 0,17 | 1,40 ± 2,30 |
| |  | 6,1 ± 2,86 | 16,92 ± 2,80 | 6,53 ± 2,44 | 12,37 ± 3,25 |
| |  | 0 ± 0 | 2,4 ± 0,91 | 0,87 ± 0,67 | 0,25 ± 0,29 |
| 4 h |  | 16,25 ± 3,16 | 7,27 ± 2,85 | 8,72 ± 2,51 | 12,47 ± 2,97 |
| |  | 1,45 ± 0,65 | 1,35 ± 0,99 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| |  | 11,5 ± 2,28 | 21,52 ± 5,91 | 15,17 ± 4,56 | 4,33 ± 2,58 |
| 8 h |  | 0 ± 0 | 0,95 ± 0,68 | 0,23 ± 0,32 | 0 ± 0 |
| |  | 7,17 ± 1,84 | 13,93 ± 3,71 | 21,08 ± 3,88 | 20,07 ± 4,55 |
| |  | 2,33 ± 1,09 | NE | NE | 0,37 ± 0,43 |
| 12 h |  | 8,2 ± 2,47 | NE | NE | 8,53 ± 3,41 |
| |  | 0 ± 0 | NE | NE | 2,4 ± 1,30 |
| |  | 14,33 ± 3,68 | NE | NE | 19 ± 3,03 |
| 16 h |  | NE | 0,38 ± 0,42 | 0,08 ± 0,10 | NE |
| |  | NE | 17,42 ± 2,82 | 14,18 ± 3,04 | NE |
| |  | NE | 1,65 ± 0,74 | 1,85 ± 0,96 | NE |
| 20 h |  | NE | 8,07 ± 2,06 | 7,63 ± 2,47 | NE |
| |  | NE | 0,15 ± 0,15 | 0,17 ± 0,20 | 0 ± 0 |
| |  | NE | 21,77 ± 3,14 | 18,38 ± 4,00 | 0 ± 0 |
| 24 h |  | NE | 1,12 ± 0,71 | 0,23 ± 0,23 | 0 ± 0 |
| |  | NE | 6,2 ± 2,63 | 9,23 ± 3,14 | 15,87 ± 3,94 |
| |  | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0,02 ± 0,03 |
| 24 h |  | 3,75 ± 2,23 | 3,95 ± 2,96 | 8,25 ± 3,08 | 17,95 ± 2,98 |
| |  | 0 ± 0 | 1,85 ± 0,82 | 3,17 ± 0 | 0 ± 0 |
| |  | 23,63 ± 4,21 | 33,49 ± 3,61 | 15,6 ± 2,48 | 10,42 ± 2,70 |
| 24 h |  | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| |  | 1,02 ± 1,06 | 3,52 ± 1,87 | 0,1 ± 0,20 | 3,27 ± 1,53 |
| |  | 0,05 ± 0,10 | 0,08 ± 0,12 | 0,57 ± 0,54 | 0 ± 0 |
| |  | 26,15 ± 3,32 | 30,33 ± 4,69 | 19,65 ± 2,14 | 22,17 ± 3,57 |

NE: No evaluado. (†) Leyenda según lo indicado en la Figura 1.