

MANUAL DE TÉCNICAS EN GENÉTICA Y AMBIENTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar
Secretario Académico

Lic. Dora Juárez Ortiz
Secretaria de Investigación Científica y Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares
Secretario de Extensión Universitaria y Difusión Cultural

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo
Secretario Técnico

Dr. Felipe Hernández Hernández
Secretario Administrativo

Lic. Mauro Sánchez Ibarra
Secretario de Autorrealización

Mtro. Rubén Reyes Córdoba
Coordinador de la División de Ciencias Biológicas

Dra. Madái Angélica Gómez Camarillo
Coordinadora del Centro de Investigación en Genética y Ambiente

MANUAL DE TÉCNICAS EN GENÉTICA Y AMBIENTE

Compiladoras:

**Edelmira García Nieto
Madaí Angélica Gómez Camarillo
Libertad Juárez Santacruz**



© 2012 Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Universidad Autónoma de Tlaxcala
Av. Universidad No. 1
Col. La Loma Xicohténcatl, Tlaxcala, Tlax., C.P 90000
Tel/Fax 01(248) 481 5500
Derechos reservados conforme a la ley
Primera edición
ISBN: 978-607-7698-84-5
Impreso en México

Cuidado de la edición: Libertad Juárez Santacruz y Edelmira García Nieto
Diseño editorial: Centro de Investigación en Genética y Ambiente
Diseño de portada: Edelmira García Nieto
Primera edición: Octubre de 2012

Ejemplo de la manera correcta de citar cualquier capítulo de este libro:

García-Jiménez O. 2012. Prueba de toxicidad aguda empleando a *Daphnia magna*. En: García, NE, Gómez, CMA y Juárez, SL (Comps). *Manual de Técnicas en Genética y Ambiente*. Universidad Autónoma de Tlaxcala, México. p. 41-62.

La información publicada en los capítulos de este libro es responsabilidad del autor por lo que el contenido de los mismos no refleja necesariamente el punto de vista de la Institución.

CONTENIDO

	Página
Prefacio	9
<i>Elvia Ortiz Ortiz</i>	
Agradecimientos	11
<i>Los autores</i>	
Capítulo 1	15
Inmunolocalización de proteínas en tejidos y/o células	
<i>Madaí Angélica Gómez Camarillo y Elvia Ortiz Ortiz</i>	
Capítulo 2	25
Identificación de proteínas por el método de Western Blot	
<i>Madaí Angélica Gómez Camarillo</i>	
Capítulo 3	41
Prueba de toxicidad aguda empleando <i>Daphnia magna</i>	
<i>Oliverio García Jiménez</i>	
Capítulo 4	63
Prueba de mutagenicidad por incorporación en placa con <i>Salmonella typhimurium</i>	
<i>Emma Socorro Soto Mora</i>	
Capítulo 5	87
Pruba de mutación y recombinación somática en alas de <i>Drosophyla melanogaster</i>	
<i>Raquel Ortíz Marttelo</i>	
Capítulo 6	105
Ensayo de genotoxicidad:micronúcleos	
<i>Libertad Juárez Santacruz</i>	
Capítulo 7	119
Evaluación de la fragmentación del DNA empleando el ensayo cometa	
<i>Edelmira García Nieto</i>	
Capítulo 8	139
Ensayo de genotoxicidad: intercambio de cromátides hermanas en <i>Vicia faba</i>	
<i>Libertad Juárez Santacruz</i>	
Capítulo 9	147
Determinación de la densidad básica de la madera.	
<i>María Eunise Zamora Campos</i>	

Capítulo 10 159

Evaluación de la toxicidad aguda con semillas de lechuga ya tomate

Elizabeth García Gallegos

Capítulo 11 169

Análisis de la germinación y viabilidad de semillas forestales

Oscar Gumersindo Vázquez Cuecuecha

PREFACIO

Con frecuencia las pruebas para evaluar el efecto de los contaminantes ambientales y la calidad de agua, aire, suelo y sedimento, matrices ambientales en las que se desarrolla toda forma de vida, requieren de una infraestructura sofisticada y por ende resultan de alto costo. Es por ello que los investigadores del Centro de Investigación en Genética y Ambiente (CIGyA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, se dieron a la tarea de elaborar este manual, producto de la experiencia lograda a lo largo de años de trabajo en los laboratorios, donde ha sido probado el valor y la eficacia de las técnicas implementadas, cuya característica común es que éstas han sido adaptadas a las condiciones particulares del CIGyA, sin menoscabo en la confiabilidad y calidad de los resultados obtenidos.

Este manual, como herramienta para los estudiantes de licenciatura y posgrado interesados en la investigación en Ciencias Ambientales, resulta de suma utilidad ya que en él se describen técnicas confiables, de fácil aplicación y accesibles económicamente, cuya finalidad es:

- Diagnosticar y evaluar desde un enfoque biológico la contaminación ambiental.
- Evaluar los efectos mutagénicos y genotóxicos de los contaminantes ambientales en organismos animales y vegetales.
- Aplicar técnicas para el diagnóstico de la calidad de diversas especies forestales.

Con seguridad, el lector avezado encontrará diferencias con las técnicas originales, pero justamente en eso radica su utilidad, ya que los procedimientos se han optimizado y han probado ser eficaces. De este modo, se describen once técnicas que analizan diferentes matrices ambientales y biológicas. Cada una explica los principios en los cuales se sustenta; especifica el material, reactivos y equipo necesarios; describe las características, obtención, cultivo y mantenimiento de los organismos de prueba; expli-

ca paso a paso el método a seguir e integra figuras y esquemas para su mejor comprensión; de igual forma, sugiere la manera de presentar los resultados.

Finalmente, quiero manifestar que este documento técnico es el resultado de un trabajo en equipo y representa el esfuerzo de los investigadores de los diferentes laboratorios del CIGyA, a quienes expreso mi reconocimiento.

Elvia Ortiz Ortiz

AGRADECIMIENTOS

En estas líneas, queremos expresar nuestro agradecimiento, hacia aquellas personas e instituciones que han influido de manera importante en la formación de los investigadores y en la implementación de las técnicas descritas en este manual. A veces incluso sin saberlo.

Expresamos un amplio reconocimiento al apoyo recibido de las autoridades de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, a través de la Rectoría y Secretaría de Investigación Científica y Posgrado. Asimismo, a nuestros estudiantes que con sus inquietudes nos motivaron a exponer las actividades científicas que se realizan en los laboratorios del CIGyA, con el fin de que les sirva de guía para el desarrollo de proyectos de investigación en el área de las Ciencias Ambientales.

Un particular agradecimiento a los lectores, interesados en el contenido de este manual, esperamos que estimule su inclinación por este campo de la ciencia.

Los autores

INMUNOLocalización de Proteínas en Tejidos y/o Células

Madaí Angélica Gómez Camarillo

Coordinadora del CIGyA

Elvia Ortiz Ortiz

Facultad de Odontología

INTRODUCCIÓN

Las proteínas, constituyentes químicos fundamentales e imprescindibles de la materia viva, son producto de la expresión de la información genética y realizan una gran variedad de funciones que rigen el metabolismo celular. Entre éstas se encuentran: a) estructural (colágena, miosina); b) transportadora (hemoglobina, mioglobina); c) enzimática (colagenasas, polimerasas); d) hormonal (insulina, hormona del crecimiento); e) de defensa (inmunoglobulinas, trombina), etc. (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2006).

Una característica importante de las proteínas es su capacidad para actuar como antígenos (Ag), que al ser reconocidas por el sistema inmune como una amenaza, inducen la producción de anticuerpos (Ac) (Alberts *et al.*, 2002; Male *et al.*, 2007). Desde el punto de vista bioquímico, los Ac son glucoproteínas sintetizadas por el organismo en respuesta a la presencia de un Ag y reacciona específicamente contra éste (Mathews *et al.*, 2002; Nelson y Cox, 2006; Male *et al.*, 2007). Entre las cuatro moléculas, que estructuralmente, constituyen a las células y son capaces de actuar como antígenos, las proteínas poseen la mayor capacidad inmunogénica, mientras que en los carbohidratos ésta es menor, en tanto que los lípidos y los ácidos nucleicos sólo son inmunogénicos cuando están unidos a proteínas o carbohidratos.

La capacidad de las proteínas para actuar como Ag permite el desarrollo de metodologías de investigación (Kouri *et al.*, 1998; Benitez-Bribiezca *et al.*, 2000; Kouri *et al.*, 2002; Gómez-Camarillo *et al.*, 2005) basadas en la reacción inmune (Ag-Ac), en la que se produce la acción integrada de mecanismos heterogéneos de defensa contra sustancias y/o agentes extraños, los Ag. La metodología, conocida como “técnicas inmunoquímicas”, por su alta sensibilidad y especificidad permite la ubicación y cuantificación de moléculas presentes en los tejidos, aun en concentraciones reducidas.

Algunas de las pruebas fundamentadas en la reacción Ag-Ac son: la inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, radioinmunoanálisis, inmunoprecipitación, citometría de flujo, la prueba de ELISA y Western blot (González, R.), cuyas principales propiedades son su alta especificidad, selectividad y sensibilidad, debido a que los Ac pueden diferenciar dos Ag muy similares, aun en cantidades pequeñas. Asimismo, es posible observar la relación directamente proporcional entre la cantidad de Ag presente en la muestra y la cantidad de reacción Ag-Ac detectada. Las técnicas de inmunología emplean Ac mono o policlonales para detectar Ag presentes en células y tejidos. Estas pruebas pueden ser: a) directas, cuando el Ac primario está marcado con un fluorocromo o una enzima que al reaccionar con su sustrato produce un precipitado de color, indicando la ubicación del Ag, o b) indirectas, en la que se emplea un segundo Ac marcado que se une al Ac primario.

La inmunofluorescencia indirecta es una variante de la inmunología, consiste en incubar el Ag, presente en la muestra (células, tejidos, exudado, secreciones, etc.), con un Ac primario específico contra el Ag que se desea identificar, posteriormente se añade un segundo anti-anticuerpo marcado con un fluorocromo, que se unirá al complejo Ag-Ac primario (figura 1) y tras una nueva incubación, la reacción se visualiza al microscopio con lámpara de luz ultravioleta (figura 2).

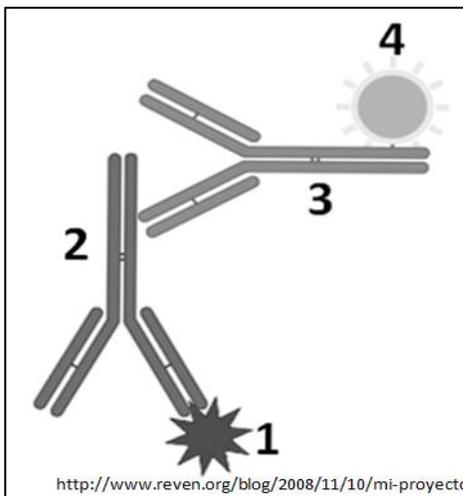


Figura 1. Inmunofluorescencia por el método indirecto: 1 antígeno; 2 anticuerpo primario, 3 anticuerpo secundario; 4 fluorocromo conjugado con el anticuerpo secundario.

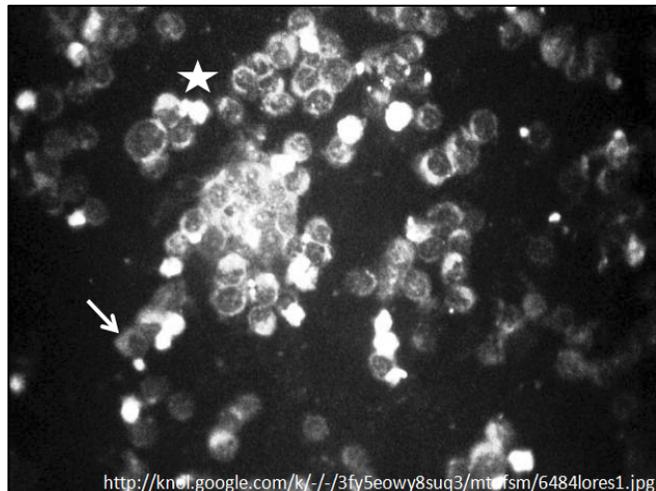


Figura 2. Inmunolocalización del virus sincitial respiratorio (VSR). Los espacios luminosos indican la localización del VSR (marcada con una estrella), en las células del epitelio respiratorio (esferas opacas marcadas con una flecha).

Esta prueba permite reconocer, determinantes antigénicos (parte de la molécula contra la cual va dirigido el anticuerpo), sobre muestras tisulares o citológicas. Así, utilizando la reacción antígeno-anticuerpo es posible identificar moléculas como: receptores de membrana, proteínas del citoesqueleto, neurotransmisores, factores de crecimiento, ciclinas, cinasas y proteínas citosólicas, etc., características de distintas líneas de diferenciación y función celular, y su relación con la morfología y fisiología del tejido. Esta técnica tiene gran aplicación en el área de la salud para el diagnóstico de enfermedades bacterianas, virales, metabólicas, del sistema inmune y en investigación básica y aplicada en organismos animales y vegetales.

OBJETIVO

Localizar microanatómicamente con una alta especificidad y sensibilidad, la expresión de moléculas constitutivas de las células y correlacionarlas con los parámetros morfológicos, fisiológicos y/o patológicos de las células y/o tejidos de estudio.

EQUIPO

Cámara húmeda
Criostato
Microscopio de fluorescencia
Potenciómetro

MATERIALES

Cubreobjetos
Matraces de 1 000, 500 y 100 ml
Micropipetas varios volúmenes
Pipetas de Pasteur
Portaobjetos
Probetas de 1 000, 500 y 100 ml

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de catálogo
Agua bidestilada	MILLI-Q	Z00QSV001
Albúmina bovina libre de IgG	SIGMA	7030
Anticuerpo primario	INVITROGEN	
Anticuerpo sec. conjugado con fluoresceína	INVITROGEN	
Cloruro de sodio (NaCl)	SIGMA	S3014
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	SIGMA	S71653
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	SIGMA	S5011
Hidróxido de sodio (NaOH)	J. T. BAKER	0028
Ioduro de propidio (IP)	SIGMA	P4864
Medio de inclusión Tissue-teck	AMERSHAM	
Medio de montaje (Vectashield)	VECTOR LAB	H1000
Paraformaldehído	SIGMA	P6148
Sacarosa	SIGMA	S9378
Tritón 100X	BIO-RAD	161-0407

PREPARACIÓN DE REACTIVOS (Lynch *et al.*, 1977)

Solución Buffer de Fosfatos Salina (PBS, Phosphate Buffer Saline)		
NaCl	105 mM	8.20 g
NaH ₂ PO ₄	3 mM	0.43 g
Na ₂ HPO ₄	12 mM	1.74 g
H ₂ O Bidestilada	cbp	1 000 ml
Disolver los reactivos en el agua bidestilada en el orden en que aparecen y regular el pH a 7.4 con HCl o NaOH y aforar a 1 L.		

PBS -Triton-100X al 2 % (PBS-T)	
Triton-100X	2 ml
PBS cbp	100 ml
Disolver 2 ml de Triton-100X en 90 ml de PBS y regular el pH con HCl o NaOH	

Paraformaldehído al 4 %	
Paraformaldehído	4.00 g
PBS	100 ml
NaOH 1M	Unas gotas
Disolver el paraformaldehído en 80 ml de PBS	
Calentar entre 56 y 60 °C para disolver el paraformaldehído	
Agregar las gotas necesarias de NaOH para aclarar la solución	
Dejar enfriar y regular el pH a 7.2 - 7.4 con HCl o NaOH	
Aforar a 100 ml con PBS	
Almacenar en refrigeración (se puede almacenar hasta por un mes, después pierde poco a poco su actividad, se recomienda preparar sólo la cantidad que se vaya a usar).	

Soluciones para Crioprotección	
Sacarosa (3 soluciones de concentración porcentual creciente al 10, 20 y 30 %)	10, 20 y 30 g
PBS cbp	100 ml
Disolver la sacarosa en 90 ml de PBS, regular el pH 7.2 - 7.4 con HCl o NaOH y aforar a 100 ml	

Solución Ioduro de Propidio (IP)	
Solución Madre	
Ioduro de propidio	10 mg
H ₂ O Bidestilada cbp	1 ml
Solución de trabajo	
Solución stock	1 µl
PBS	999 µl

METODOLOGÍA

Fijar el tejido de estudio por inmersión (porción de tejido u órgano completo) en paraformaldehído al 4 %, de 1 a 6 h, preferentemente de 12 a 24 h a 4 °C. El volumen del fi-

jador deberá ser 20 veces superior al volumen del tejido de estudio.

Lavar el tejido en PBS durante 2 min, 3 veces.

Crioprotección: impregnar el tejido de estudio en sacarosa al 10 % en PBS, a 4 °C por 24 h o hasta que el tejido se vaya al fondo del frasco.

Repetir el procedimiento con sacarosa al 20 y 30 %. El volumen de la sacarosa deberá ser 10 veces superior al volumen del tejido de estudio.

Una vez completado el proceso de crioprotección, sacar el tejido de la sacarosa al 30 % y secar el exceso de solución con papel filtro.

Montar el tejido en el porta-muestras con el medio de inclusión para congelación “Tissue-teck” y congelar en el criostato.

Cubrir toda la muestra con el medio de inclusión y volver a congelar (figura 3), repetir este procedimiento hasta obtener un bloque compacto, completamente cubierto con el medio de inclusión, el cual dará soporte al tejido para hacer los cortes.

Cortar el tejido en el criostato a la temperatura recomendada (tabla 1), a un espesor de 5 µm o el requerido según lo indique el protocolo de investigación que se esté realizando (figura 4).



Figura 3. Criostato. Porta muestras (flecha). Los tejidos se montan sobre el portamuestras con el medio de inclusión Tissue-Tek.

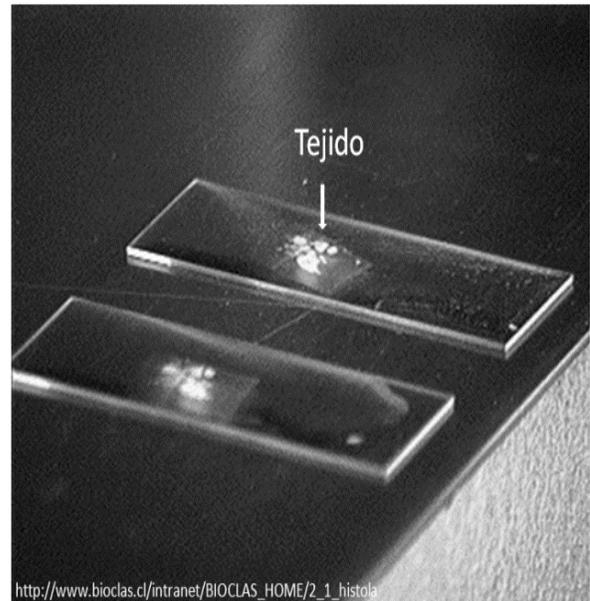


Figura 4. Cortes de tejido en los portaobjetos. Los cortes se recogen del criostato con los portaobjetos directamente.

Tabla 1. Temperaturas de trabajo para diferentes tejidos

Tejido	-10 a -15 °C	-15 a -25 °C	-25 a -30 °C
Cápsula suprarrenal	X	X	
Médula ósea		X	
Cerebro	X		
Vejiga		X	
Mama con alto contenido de grasa			X
Mama con bajo contenido de grasa		X	
Cartílago	X	X	
Cuello uterino		X	
Tejido adiposo			X
Corazón y vasos sanguíneos		X	
Vísceras		X	
Riñón		X	
Laringe		X	
Labio	X	X	
Hígado		X	
Pulmón		X	
Ganglio linfático		X	
Músculo		X	
Nariz		X	
Páncreas		X	
Glándula prostática		X	
Ovario		X	
Piel con tejido adiposo			X
Piel sin tejido adiposo		X	
Bazo	X	X	
Testículo	X	X	
Tiroides		X	
Lengua		X	

Con la ayuda con un pincel de pelo fino, se recogen los cortes directamente del criostato con un portaobjetos, teniendo cuidado de que no se plieguen los cortes (si no se procesan inmediatamente, almacenar los portaobjetos en cajas para laminillas y conservarlos -20 °C).

Si los cortes se guardaron en congelación, rehidratar por 10 min con PBS (la cantidad necesaria para cubrir el corte de tejido), a partir de este paso se trabajará en la cámara húmeda (figura 5).

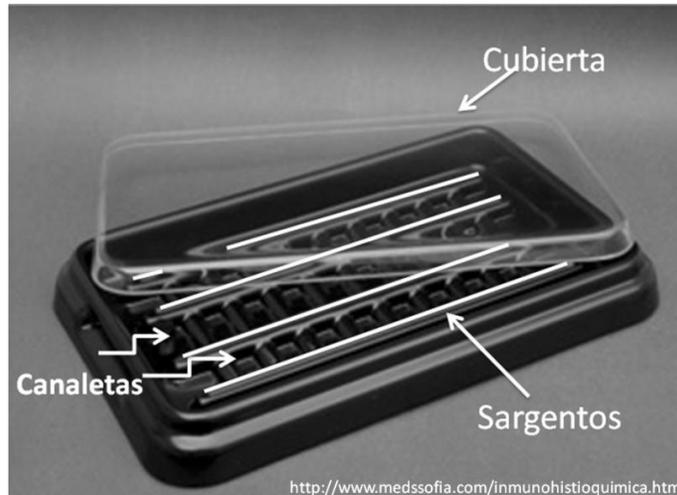


Figura 5. Cámara Húmeda. Las flechas señalan: los sargentos sobre los que se colocan los portaobjetos que contienen los cortes; las canaletas se llenan de agua para hacer el efecto de la cámara húmeda y la cubierta para evitar la desecación del agua durante el tiempo de incubación.

Permeabilizar los cortes con PBS-Tritón-100X al 2 % (PBS-T), por 10 min.

- Cubrir los cortes con la cantidad suficiente de PBS-T utilizando una pipeta Pasteur
- Transcurrido el tiempo decantar el PBS-T y acercar a una orilla del corte un trozo de papel filtro, para eliminar el exceso de solución.

Bloquear el marcaje inespecífico con albúmina bovina libre de IgG 0.5 % en PBS-T, durante 30 min a temperatura ambiente (TA). Opción: bloquear con suero fetal bovino (SFB) al 0.5 % en PBS-T.

- Depositar sobre los cortes la solución bloqueadora, en cantidad suficiente para cubrirlos utilizando una pipeta Pasteur.

Transcurrido el tiempo eliminar la solución bloqueadora como en el paso anterior.

Lavar 2 veces por 5 min en PBS-T y eliminar el exceso de solución como en el paso anterior.

Incubar el tejido con el anticuerpo primario diluido en PBS-T (a la concentración sugerida por el proveedor y en cantidad suficiente para cubrir los cortes), toda la noche en cámara húmeda a 4 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación, lavar 3 veces por 5 min c/u con PBS-T de la manera descrita anteriormente.

Incubar con el anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (a la concentración sugerida por el proveedor), diluido en PBS-T, por una hora a TA en la cámara húmeda, teniendo cuidado de cubrir con papel aluminio la cubierta transparente de la cámara para protegerlo de la luz.

Lavar 3 veces por 5 min c/u con PBS-T y una vez por 3 min con PBS, como se describió anteriormente.

Teñir núcleos celulares por 3 min con la solución de trabajo de Ioduro de Propidio, en cantidad suficiente para cubrir los cortes.

Lavar 2 veces por 5 min con PBS.

Lavar 2 veces por 5 min con H₂O bidestilada.

Lavar 1 vez por 5 min con PBS-T.

Montar los cubreobjetos con Vectashield (medio de montaje especial para fluorescencia). Depositar una gota de Vectashield sobre el tejido y sobre ésta depositar el cubreobjetos lentamente para evitar que se formen burbujas, eliminar el exceso del medio de montaje del contorno del cubreobjetos y sellar con barniz de uñas (figura 6).

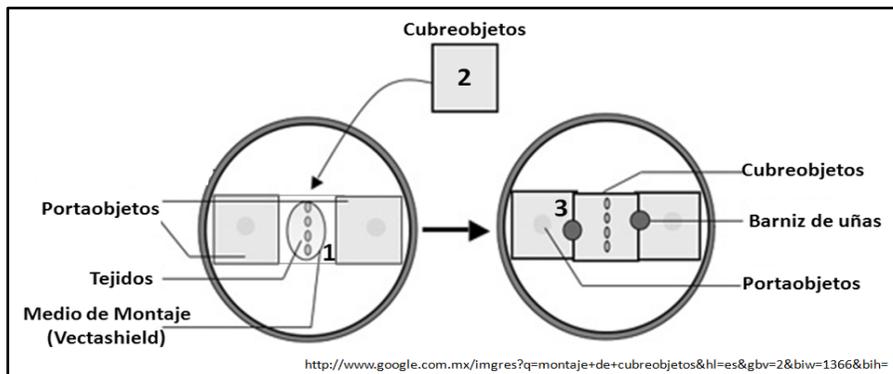


Figura 6. Montaje de cubreobjetos. Depositar una gota de medio de montaje sobre el tejido (1); aplicar lentamente el cubreobjetos sobre la muestra (2); sellar con barniz de uñas para evitar la desecación del medio de montaje (3).

Observar al microscopio de fluorescencia.

Contar en 100 células, el número de células marcadas positivamente (teñidas de verde fluorescente), para obtener el % de células positivas al anticuerpo.

LITERATURA

- Alberts. B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. (4a ed.). Garland Science, New York.
- Benítez-Briebesca, L., Gómez-Camarillo, M., Castellanos-Juárez, E., Mravko, E., Sánchez-Suárez, P. 2000. Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Annals of the New York Academy of Science*. 926:165-79.
- Diccionario Médico Interactivo. Consultado el 2 de noviembre de 2011.
http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Antigeno
- Gomez-Camarillo M. A., Kouri J. B. 2005. Ontogeny of rat chondrocyte proliferation: studies in embryo, adult and osteoarthritic (OA) cartilage. *Cell Research*. 15(2):99-104.
- González, R. Tarazona, M. D. Galiani, G, M. P., Espinosa, R. y Peña, J. (n.d.). 17 Métodos Basados en la unión Ag-Ac. Consultado el 14 de octubre de 2011.
<http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema17/etexto17.htm>.
- Kouri, J. B., Argüello, C., Luna, J., Mena, R. 1998. Use of microscopical techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: an overview. *Microscopy Research and Techique*. 40:22-36.
- Kouri, J. B., Rojas, L., Pérez, E., Abbud-Lozoya, K. 2002. Modifications of Golgi complex in chondrocytes from osteoarthrotic (OA) rat cartilage. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 50:1333-9.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S., Mellor L. D., Spare P. D., Inwood, M. J. H. 1977. *Métodos de laboratorio*. (2a edición). Interamericana. México.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B., Roit, I. 2007. *Inmunología*. (7a ed.). Elsevier Mosby, Madrid.
- Mathews, C. K., Hole, K. E., Ahern K. G. 2002. *Bioquímica*. (3a. ed.). Pearson Educación S. A. Madrid, España.
- Nelson, D. L. y Cox, M.M. 2006. *Principios de bioquímica*. (4a. ed). Ediciones Omega. Barcelona .

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE WESTERN BLOT

Madaí Angélica Gómez Camarillo

Coordinadora del CIGyA

INTRODUCCIÓN

En 1975, Edwin Mellor Southern publicó la técnica Southern blot, para detectar fragmentos de DNA separados por electroforesis en gel, en contraposición, la prueba de Northern blot basada en el mismo principio permite la detección de fragmentos de RNA. Así, en un juego de palabras, Neal Burnette (1981) denominó Western blot a la técnica desarrollada por George Stark (Cerezo y Madrid 1995; Renart *et al.*, 1979), que es empleada para detectar proteínas presentes en muestras de tejidos homogeneizados o extractos de proteínas, y aplica el mismo principio electroforético para su separación.

Esta técnica es usada en biología molecular, bioquímica e inmunogenética para analizar mezclas complejas de proteínas, y consiste en someter los extractos de proteínas a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), detergente desnaturizante que ocasiona la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas, por lo que la migración de éstas en el gel es proporcional a su carga iónica y tamaño de la molécula, separando las proteínas en función de su peso molecular. Posteriormente, las proteínas así separadas son transferidas a una membrana, que puede ser de nitrocelulosa, PVDF (polyvinylidene difluoride) o de nylon, en la que se lleva a cabo la detección de las bandas proteicas por un sistema de inmunodetección indirecta (figura 1), para esto, se utiliza un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés, y un segundo anticuerpo que detecta y se une al anticuerpo primario. El segundo anticuerpo está marcado con una enzima (peroxidasa de rábano (HPR) o fosfatasa alcalina), que en presencia de su sustrato, cataliza una reacción capaz de producir una señal detectable en el lugar de acción de la enzima, debida a la formación de un precipitado coloreado o emisión de una señal luminosa (quimioluminiscencia), la cual indica la ubicación de la banda de proteína en la membrana (figura 1).

De esta manera se puede identificar y cuantificar una proteína en particular, presente en una mezcla compleja de proteínas (García-Pérez 2000; Gomez-Camarillo *et al.*, 2005, 2009, 2011; Yabar, 2003).

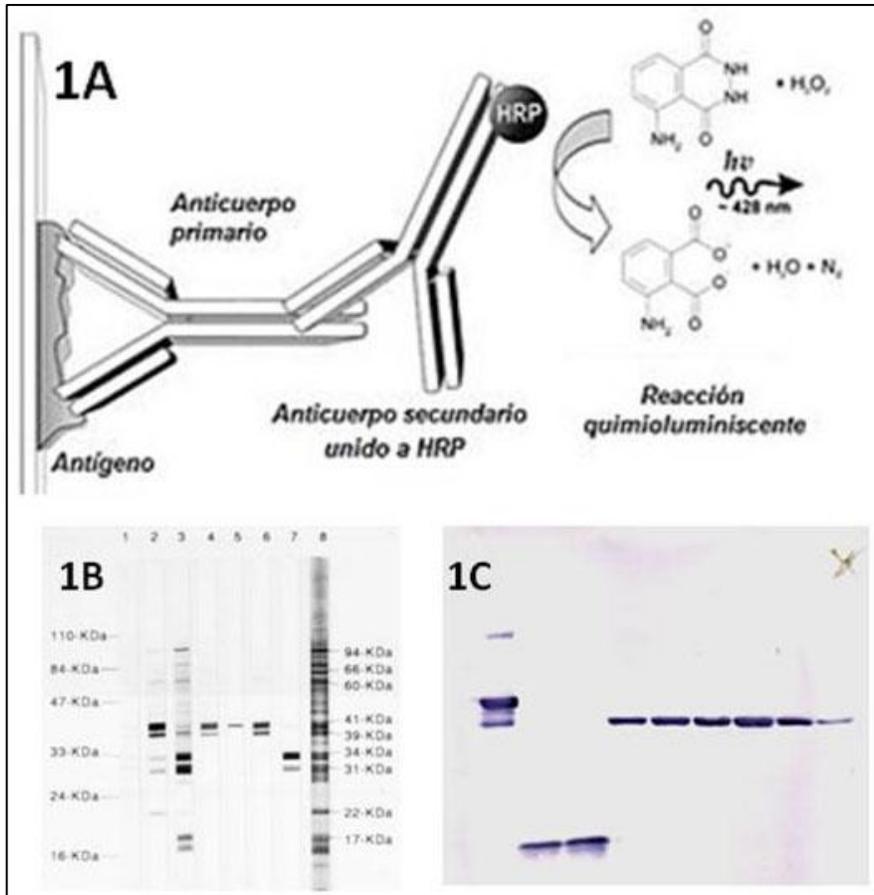


Figura 1. 1A: Inmunodetección indirecta, emplea un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno y un anticuerpo secundario marcado con un sistema cromogénico, que se une al anticuerpo primario y reacciona para permitir la visualización de la proteína de estudio; 1B: Electroforesis en gel de poliacrilamida, cada banda corresponde a una proteína de una muestra compleja de proteínas; 1C: Visualización de una proteína específica por inmunodetección indirecta.

Esta técnica tiene una gran cantidad de aplicaciones, una de las más importantes desde el punto de vista médico, es en el diagnóstico de enfermedades hereditarias, infecciosas y neoplásicas, así como en estudios de regulación de la expresión génica y en la terapia con proteínas recombinantes, además de en investigación básica y aplicada.

OBJETIVO

Identificar con anticuerpos específicos, proteínas separadas por electroforesis de una mezcla compleja de proteínas.

EQUIPO

Agitador
Agitador oscilatorio
Baño María
Cámara de electroforeisis
Centrífuga refrigerada
Chasis para radiografía
Fuente de poder
Cámara de transferencia Tank Transfer System
Homogenizador de tejidos
Microcentrífuga
Micropipetas varios volúmenes
Parrilla de agitación y calentamiento
Potenciometro
Scanner
Software “Molecular Imagin”
Lector de placas de ELISA, con filtro de 595 nm

MATERIALES

Cajas de incubación
Frascos de cristal de 1 000, 500, 100 y 50 ml
Papel filtro
Fibra Scotch
Placas para ELISA de 90 pozos
Probetas de 1 000, 500, 100, 10 y 5 ml
Puntas para micropipetas
Tubos eppendorf 2 ml

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de Catálogo
Reactivo de Bradford Protein Assay	BIO-RAD	500-0205
Albúmina bovina libre de inmunoglobulinas (IgG)	SIGMA	A7030
Acrilamida	BIO-RAD	161-0107
Bis-Acrilamida	BIO-RAD	1610122
Persulfato de amonio	BIO-RAD	161-0700
TEMED	BIO-RAD	161-0801
Agua desionizada Milli-Q	MILLI-Q	Z00QSV001
Marcador de peso molecular	BIO-RAD	161-0324
Membrana de Nitrocelulosa	BIO-RAD	162-0115
Tween-20	BIO-RAD	170-6531
Leche Svelty	NESTLE	
Anticuerpo primario	INVITROGEN	
Anticuerpo sec. c/HRP	INVOTRGEN	
Kit de Quimioluminiscencia ECL Plus	AMRESHAM	RPN2132
Película radiográfica Kodak	KODAK	Kodak
NaCl	SIGMA	S3014
Tris Base	SIGMA	93362
Ácido etilen-diamino tetrácetico (EDTA)	BIO-RAD	161-0729
Glicerol	SIGMA	G8773
Nonidet P-40 (NP-40)	THERMO SCIENTIFIC	28324B
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)	BIO-RAD	161-0301
B-Mercaptoetanol	BIO-RAD	161-0710
Azul de Bromofenol	SIGMA	114391
Glicina	BIO-RAD	161-0718
Metanol	SIGMA	494437
Rojo de Ponceau	BIO-RAD	
Inhibidores de proteasas		
Aprotinina	SIGMA	A3428
PMSF	SIGMA	93482
Leupeptina	SIGMA	L5793
Ortovanadato	SIGMA	S6508

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Buffer de Lisis		
NaCl	150 mM	1.75 g
Tris Base	20 mM	0.485 g
EDTA	5 mM	2 ml
Disolver los reactivos en 150 ml de H ₂ O desionizada, en el orden arriba indicado, y regular pH a 7.4, antes de agregar el NP-40		
Agregar los siguientes reactivos:		
Glicerol	10 %	20 ml
NP-40	1 %	2 ml
(este reactivo daña el electrodo del potenciómetro)		
Inhibidores de proteasas		1 µl de la dilución de trabajo de c/u
H ₂ O desionizada cbp		200 ml

Inhibidores de Proteasas		
Soluciones Madre		Diluciones de trabajo
Aprotinina	22.5 µg/ml de H ₂ O	Preparar cada uno de los inhibidores de proteasas por separado.
PMSF	1.0 mM (en etanol)	
Leupeptina	10.0 mg/2.5 ml H ₂ O	Agregar 1 µl de solución stock en 999 µl Buffer de lisis
Vanadato	1.0 mM H ₂ O	

Solución Madre de Albumina		
Albúmina	1 mg	Concentración: 1 µg de albúmina por µl de solución stock
H ₂ O desionizada	1 ml	

Diluciones para la Curva de Albúmina		
H ₂ O Desionizada	Solución madre de Albúmina	
160.0 µl	0 µl = 0 µg	Agregar a c/u 40 µl de Reactivo de Bradford
159.0 µl	1 µl = 1 µg	
155.0 µl	5 µl = 5 µg	
150.0 µl	10 µl = 10 µg	
145.0 µl	15 µl = 15 µg	
140.0 µl	20 µl = 20 µg	
Preparar, por triplicado, cada una de las diluciones en los pozos de una placa de ELISA.		

Buffer de Muestra		
	5X	5X
Glicerol 50 %	10 ml	100 ml
SDS 10 %	2 g	20 g
Buffer Tris pH 6.8 (partiendo de la solución 0.5 M se obtiene una concentración 65 mM)	2.6 ml	26 ml
β -Mercaptoetanol 5 %	1 ml	10 ml
Azul de Bromofenol	pizca	pizca
H ₂ O desionizada cbp	20 ml	200 ml

Concentración de acrilamida para preparación de los geles según el peso molecular de la proteína problema		
PM de la Proteína en kDa	Gel	
14	14 %	Preparar el gel al % necesario de acrilamida, según el peso molecular de la proteína por analizar.
15 - 17	12 %	
20 - 200	10 %	
50 - 250	8 %	
> 250	7 %	

Solución de Archilamida-Bis-Acrilamida (poliacrilamida) 30 %	
Acrilamida	29.0 g
Bis-acrilamida	1.0 g
H ₂ O desionizada cbp	100 ml

Persulfato de Amonio 10 %	
Persulfato de amonio	1.0 g
H ₂ O desionizada	cbp 10 ml

Buffer de Separación (Tris 1.5 M pH 8.8)	
Tris-Base (1.5 M)	36.33 g
SDS 0.4 %	0.8 g
H ₂ O desionizada cbp	200 ml
Regular pH a 8.8	

Gel de Separación (corrida) al 10 % de acrilamida			
REACTIVOS	1 GEL	2 GELES	4 GELES
Buffer de separación pH 8.8	1.25 ml	2.50 ml	5.00 ml
Archilamida/Bis-Acrilamida	1.65 ml	3.30 ml	6.60 ml
H ₂ O desionizada	2.10 ml	4.20 ml	8.40 ml
Persulfato de amonio	100 µl	150 µl	200 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl

Buffer de Concentración (Tris 0.5M pH 6.8)	
Tris-Base (0.5 M)	12.0 g
SDS 0.4 %	0.8 g
H ₂ O desionizada cbp	200 ml
Regular pH a 6.8	

Gel de Concentración al 10 % de acrilamida	
H ₂ O desionizada	61 ml
Buffer de Concentración pH 6.8	25 ml
Archilamida-Bisacrilamida 30 %	13 ml
Tomar 4 ml de la mezcla (para 2 geles de 1.0 mm) y agregar	
Persulfato de amonio	90 µl
TEMED	9 µl

Buffer de Corrida	
Tris-Base (25 mM)	3.00 g
Glicina (192 mM)	14.40 g
SDS (0.1 %)	1.00 g
H ₂ O desionizada cbp	1000 ml
pH 8.3	

Buffer de Transferencia	
Tris-Base (25 mM)	3.00 g
Glicina (192 mM)	14.40 g
SDS (0.1 %)	1.00 g
Regular pH a 8.3	
Metanol	200 ml
H ₂ O Desionizada cbp	1000 ml

TBS pH 7.5	
Tris-Base 50 mM	6.05 g
NaCl 150 mM	8.76 g
H ₂ O Desionizada cbp	1 000 ml

TBS-Tween 20 al 0.1 %, pH 7.5	
Tris-Base 50 mM	6.05 g
NaCl 150 mM	8.76 g
Tween20 0.1 %	1 ml
H ₂ O Desionizada cbp	1 000 ml

Solución Bloqueadora	
Leche Svelty	5 g
TBS-Tween 0.1 % cbp	100 ml

METODOLOGÍA

Extracción de Proteínas Totales

Homogenizar el espécimen de estudio (tejido animal o vegetal), aproximadamente de 5

mm³, en un tubo eppendorf de 2 ml con 200 µl de buffer de lisis. Mantener en hielo.

Centrifugar 10 min a 10 000 rpm a 4 °C (en centrífuga refrigerada) y obtener el sobrenadante, evitando recoger sedimento. Mantener en hielo. Si no se usan inmediatamente, alicuotar el homogenizado de tejido (muestra) en volúmenes de 30 µl y congelar a -20 °C.

Cuantificación de Proteínas Totales

La Ley de Beer y Lamber establece que la medición de la cantidad de luz absorbida por una sustancia puede ser usada para medir su concentración en una solución. Para obtener la concentración total de proteínas en cada muestra se realiza lo siguiente.

Curva de albúmina: cargar en cada pozo de la placa de ELISA el volumen de agua desionizada y albúmina, según lo establecido en la preparación de reactivos.

Muestra(s): cargar 159 µl de agua desionizada en cada pozo y agregar 1 µl de la(s) muestra(s).

Agregar 40 µl de reactivo de Bradford, a cada uno de los pozos y mezclar hasta obtener un color homogéneo (azul), evitar la formación de burbujas, incubar por 10 minutos a temperatura ambiente (TA).

Medir la absorbancia de la curva de albúmina y de las muestras de estudio en un lector de ELISA a 595 nm dentro de los siguientes 30 min.

NOTA: Realizar por triplicado en la placa de ELISA, tanto la curva de albúmina, como las muestras de estudio.

Obtener el promedio de las lecturas de absorbancia, tanto de la curva de albúmina, como de la(s) muestra(s) y graficar los promedios de la curva de albúmina (figura 2).

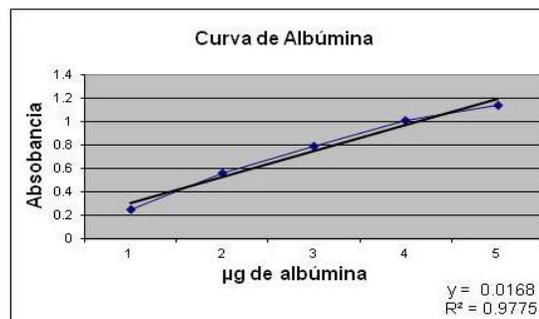


Figura 2. Donde “y” es el valor de la absorbancia de 1µg de albúmina y el valor de R², que deberá ser lo más cercano a 1.

Tomando como referencia la curva de albúmina, hacer el cálculo de la concentración de proteínas totales de cada muestra aplicando la siguiente fórmula.

Ejemplo:

$$[P_T] = \frac{Am}{Aa} X[a]$$

$$[P_T] = \frac{0.112}{0.0168} X[1]$$

$$[P_T] = 6.66 \mu g/\mu l$$

Donde:

P_T = Concentración de proteína total

Am = Absorbancia de la muestra

Aa = Absorbancia de la albúmina

a = Concentración de la albúmina

Preparación de Muestras para Electroforesis

Calcular el volumen necesario de la muestra para obtener 30 μg de proteína y llevar a un volumen total de 25 μl con buffer de muestra.

Ejemplo:

$$1 \mu l \rightarrow 6.66 \mu g/\mu l$$

$$X \rightarrow 30.00 \mu g$$

$$X = \frac{1 X 30}{6.66}$$

$$X = 4.5 \mu l$$

Tomar 4.5 μl de la muestra de estudio, agregar 21.5 μl de buffer de carga y hervir por 3 minutos en baño María.

Ensamblaje de la Cámara de Electroforesis

Las cámaras de electroforesis presentan algunas diferencias entre ellas, se recomienda seguir las instrucciones para ensamblar la cámara. No obstante, técnicamente todas las cámaras se rigen por los mismos principios, en la figura 3 se muestra un ejemplo de los elementos que integran una cámara de electroforesis.

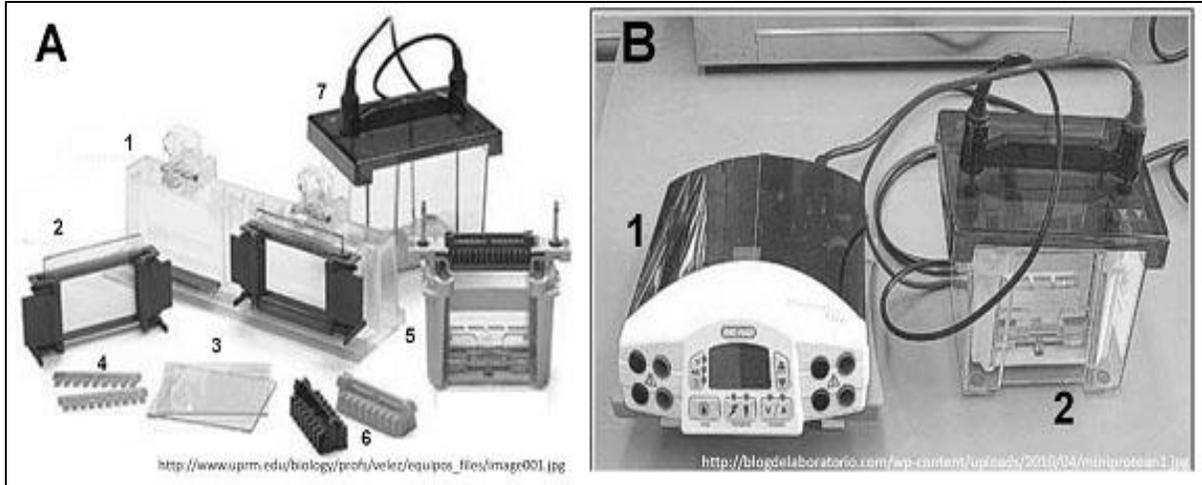


Figura 3. Cámara de electroforesis: A: 1.- Soporte para marcos de montaje de vidrios 2.- Marco para el montaje de vidrios; 3.- vidrios con espaciadores integrados; 4 peines; 5.- marco de sujeción de geles y ensamblaje del electrodo; 6.- guías para cargar las muestras; 7.- Tanque de electroforesis vertical. B: 1.- fuente de poder; 2.- Sistema de electroforesis ensamblado.

Preparación de Geles de Poliacrilamida

Gel de separación

Ensamblar los vidrios y montarlos en el soporte, colocar el peine entre los vidrios y con un marcador trazar una línea horizontal 1 cm por debajo de los dientes del peine, para marcar el límite hasta donde será vertido el gel de separación.

Retirar el peine y agregar lentamente la solución del gel de separación (ver preparación de reactivos) entre los vidrios hasta la marca, evitando la formación de burbujas.

Añadir lentamente sobre la solución del gel de separación, el volumen de agua desionizada necesario para llenar el espacio entre los vidrios, para evitar que el ingreso de oxígeno retarde la polimerización del gel.

Dejar polimerizar a TA de 20 a 30 min, una vez polimerizado el gel, eliminar el agua y secar con papel filtro.

Gel de concentración

Sobre el gel de separación polimerizado, agregar la solución del gel de concentración evitando que se formen burbujas, colocar el peine entre los vidrios, para que los dientes del peine formen los pozos en el gel de concentración.

Dejar polimerizar a TA de 20 a 30 min.

Una vez polimerizado el gel, retirar cuidadosamente el peine y lavar con agua destilada los pozos formados en el gel de concentración (figura 4).

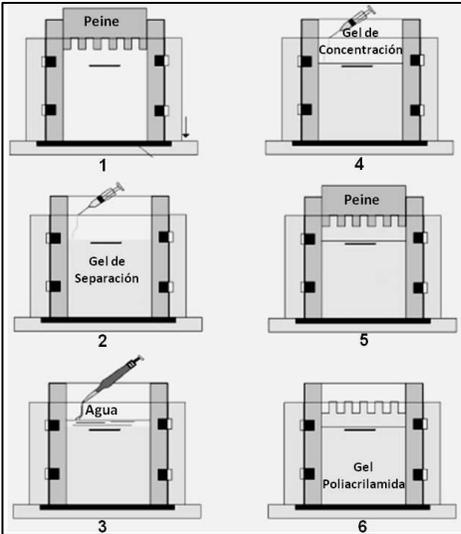


Figura 4. Procedimiento para la preparación de geles de poliacrilamida.

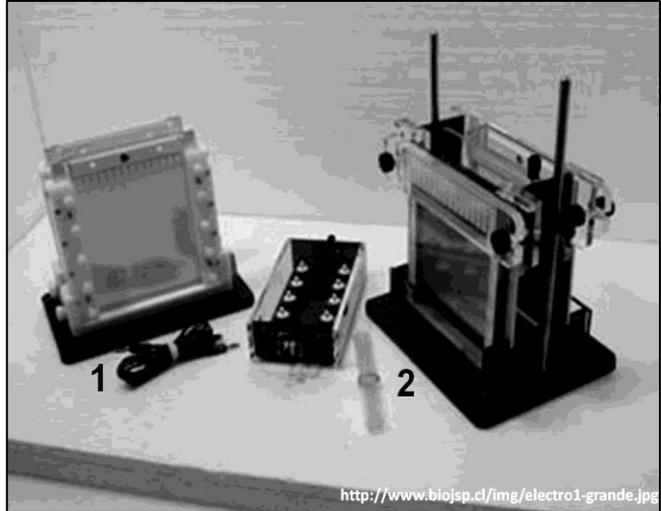


Figura 5. 1: Marco de sujeción de los geles; 2 Sistema integrado por los marcos de sujeción de los geles y el ensamblaje de los electrodos.

NOTA: Usar guantes durante el procedimiento de electroforesis de proteínas para evitar la degradación de las proteínas por acción de las proteasas presentes en las manos.

Electroforesis de Proteínas

Ensamblar el sistema que contienen los geles polimerizados y los electrodos (figura 5).

Sumergir el sistema en el tanque que contiene el buffer de corrida para proteínas, cuidar que los pozos de los geles estén totalmente cubiertos con el buffer.

En el primer pozo (carril 1) cargar 10 μ l del marcador de peso molecular de proteínas preteñido, en los siguientes carriles cargar 25 μ l de la(s) muestra(s) de estudio.

NOTA: Los carriles que no se empleen, se cargarán con buffer de muestra.

Cubrir el tanque con la tapa y conectar los cables de los electrodos a la fuente de poder. Aplicar una corriente de 80 V para iniciar la electroforesis, hasta que las muestras lleguen a la base del gel de concentración, aumentar a 180 V para continuar con la

electroforesis, hasta que las muestras contenidas en los carriles lleguen a la base del gel de separación y empiece a salir de los geles (frente de corrida figura 6).



Figura 6. Montaje en el tanque y frente de corrida (flecha).

Finalizada la electroforesis apagar la fuente de poder, desensamblar la cámara y recuperar los vidrios que contienen los geles.

Separar lentamente los vidrios con un espaciador, de manera que se separen los vidrios que contienen el gel.

Con una espátula separar y eliminar el gel de concentración, quedando únicamente el gel de separación al que se le hará una pequeña muesca en una esquina, para tener una referencia de orientación del orden de las muestras de estudio.

Remover el gel del vidrio con sumo cuidado para no romperlo, para esto es aconsejable sumergir el vidrio en buffer de corrida y separar el gel con un espaciador.

Lavar el gel brevemente con agua destilada.

Transferencia de Proteínas a la Membrana de Nitrocelulosa

Cortar la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel.

Activar la membrana sumergiéndola en metanol absoluto por 30 s.

En buffer de transferencia, sumergir por 10 min, dos hojas de papel filtro, dos capas de fibra scotch y la membrana de nitrocelulosa.

Con los elementos así procesados, se hará un emparedado, colocándolos en el

siguiente orden sobre el lado negro del cassette de transferencia:

1. Una capa de fibra scotch
2. Una hoja de papel filtro
3. El gel con la electroforesis de proteínas
4. Una hoja de nitrocelulosa
5. Una hoja de papel filtro
6. Una capa de fibra scotch

Asegurar el cassette de transferencia con el broche de seguridad e insertarlo en la cámara de transferencia, colocar la parte negra del cassette hacia la parte negra del sistema de inserción del cassette y ensamblaje de los electrodos (figura 7).

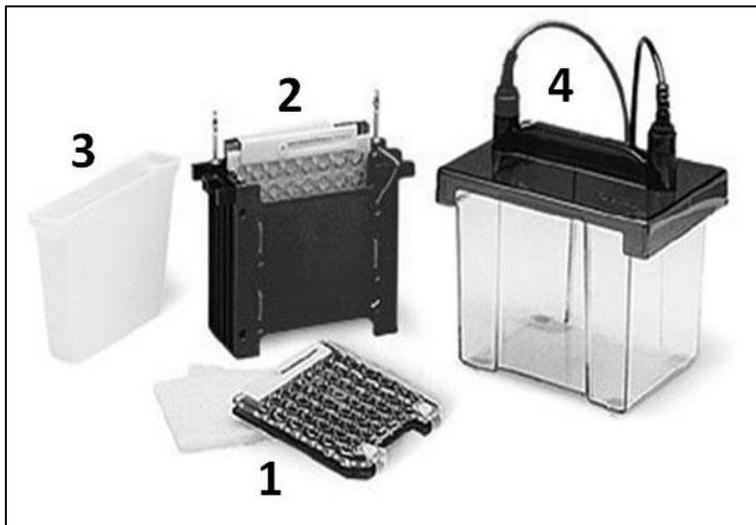


Figura 7. Cámara de transferencia: 1.- Cassette; 2.- Sistema de inserción del cassette y ensamblaje de los electrodos; 3.- refrigerante; 4.- Tanque de transferencia

Llenar la cámara con el buffer de transferencia y hacer la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa a 400 mA (miliamperios) por 2 h a 4 °C.

Transcurrido el tiempo de transferencia se separa el emparedado y se sumerge la membrana de nitrocelulosa en rojo de Ponceau por 15 min, (para asegurarse que las

proteínas fueron transferidas a la membrana), lavar el exceso de colorante con agua corriente, observar las bandas de proteína teñidas de rosa.

Inmunoreacción

Lavar la membrana de nitrocelulosa en TBS-Tween-20 al 0.1 %, hasta que desaparezca completamente el colorante de Ponceau.

Bloquear con solución bloqueadora por una hora a TA.

Enjuagar con TBS-Tween-20 0.1 %.

Incubar con el anticuerpo primario (concentración recomendada por el fabricante), durante toda la noche a 4 °C (opcional 2 h a TA).

Lavar dos veces, 5 min c/u, con TBS-Tween-20 al 0.1 %

Incubar con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) 1:3 000 por 1 h a TA.

Lavar dos veces por 5 min c/u con TBS-Tween-20 al 0.1 % pH 7.5

Revelado por Quimioluminiscencia

Lavar, escurrir y dejar secar ligeramente las membranas, colocarlas sobre una mica de plástico.

En el cuarto oscuro

Preparar el reactivo de quimioluminiscencia de acuerdo a las indicaciones del fabricante (suficiente para cubrir las membranas donde se transfirieron las proteínas).

Depositar el reactivo sobre las membranas y cubrirlas con una mica de plástico, dejar actuar el reactivo (tiempo indicado por el fabricante).

Escurrir el excedente de reactivo y pasarlas a una mica limpia.

Colocar las membranas en el chasis para radiografía, hacer la impresión de las placas radiográficas y revelarlas.

Evaluación por densidad óptica de las bandas de proteína inmunodetectadas

La cuantificación de la densidad óptica de las bandas de proteína se realiza de la siguiente manera:

Capturar con scanner la imagen de bandas impresas en las placas radiográficas.

Procesar las imágenes digitalizadas en el scanner, con el software para análisis de imágenes “Molecular Imaging” de Kodak.

LITERATURA

- Burnette WN. (1981) Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112(2):195-203.
- Cerezo J., Madrid V. (1995) Técnicas, estrategias y usos de biología molecular en medicina. *Revista de Investigación Clínica*, 47(6): 487-498.
- Diccionario Médico Interactivo. Consultado el 2 de noviembre de 2011.
http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Antigeno
- García Pérez H. M. (2000) Electroforesis en geles de poli(acrilamida): fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico* 1(2):31-41.
- Gomez-Camarillo M. A., Kouri J. B. 2005. Ontogeny of rat chondrocyte proliferation: studies in embryo, adult and osteoarthritic (OA) cartilage. *Cell Research*. 15(2):99-104.
- Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez Tort M, Tapia-Ramirez J, Kouri Flores JB. (2009) Chondrocyte proliferation in a new culture system. *Cell Proliferation* 42(2):207-18.
- Gómez-Camarillo M. A., Beyer C., Lucio R. A., García-Juárez M., González-Arenas A., Camacho-Arroyo I., Komisaruk B. R., González-Flores O. (2011). Differential effects of progesterone and genital stimulation on sequential inhibition of estrous behavior and progesterone receptor expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin*. 201-206.
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *The Proceedings in National Academy of Science United States of America*. 76(7): 3116–3120.
- Yábar Varas C.A. (2003) Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Ministerio de Salud. Instituto de Salud. Lima, Perú. pp.59. Consultado el 14-01- 2012.
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

Literatura de consulta

- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Cuantificación de proteínas totales por el método de Biuret. Consultado el 6 de febrero de 2012.
http://www.medvet.una.ac.cr/carrera/mva505_Practica4.pdf
- Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Sueller CH (1985): *A Practical guide to enzymology*, Editorial, John Wiley & Sons, New York.

PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA EMPLEANDO *Daphnia magna*

Oliverio García Jiménez

Laboratorio de Mutagénesis y Química Ambiental

INTRODUCCIÓN

La prueba de toxicidad aguda determina los efectos letales o subletales causados por un contaminante físico o químico sobre un organismo, durante un periodo de exposición de 48 horas. La estimación obtenida de ésta prueba es la relación dosis-respuesta y se expresa por la Concentración Letal Media (CL_{50}), la cual se refiere a la concentración que produce la muerte del 50 % de los organismos expuestos con un nivel de confiabilidad del 95 % (Larrain, 1995).

En 1977 un grupo de científicos interesados en formalizar las pruebas de toxicidad con organismos vivos, discutieron las características que éstas deberían tener y las categorizaron en orden de importancia: a) por su capacidad de generar resultados ecológicamente significativos, b) ofrecer información confiable, desde el punto de vista científico y legal basada en métodos disponibles, rutinarios y de amplia aplicación, c) ser predictivos de efectos ecológicos y d) ser aplicable a una amplia variedad de compuestos. Los resultados de la discusión colocaron a las pruebas de toxicidad aguda con calificaciones altas, debido a que cumplen con la mayoría de las características antes mencionadas (APHA, 1987).

No obstante, cabe señalar que este tipo de evaluaciones pueden tener algunas limitantes, ya que el hecho de que demuestren que un contaminante ocasiona la mortalidad del 50 % de los organismos no necesariamente significa que pueda presentar daño ecológico. Así mismo, estas pruebas no pueden detectar de manera rápida los efectos de compuestos que no son letales, pero si evalúa aquellos que retardan el desarrollo (crecimiento o reproducción) de los organismos, o de compuestos que producen daños a nivel poblacional, los cuales pueden tener un impacto ecológico considerable (Needham *et al.*, 1937). Sin embargo, es importante enfatizar que las pruebas de toxicidad aguda son de gran utilidad, porque permiten generar una base de datos para la comparación de la sensibilidad de los organismos a los contaminantes o de un grupo de compuestos en un organismo en particular, de una manera rápida y económica.

Actualmente, los resultados de las pruebas de toxicidad aguda son aceptados como estimaciones conservadoras de efectos potenciales de las sustancias en el ambiente y se reconoce su utilidad en los programas de monitoreo ambiental, así como para la regulación de sustancias, ya que son económicas, que permiten identificar los efectos potenciales de los contaminantes generados por actividades agrícolas, acuícolas, industriales y urbanas. Así como también, evaluar la biodisponibilidad de contaminantes, inclusive en muestras de mezclas complejas, a través de una gran diversidad de respuestas a distintos niveles de organización biológica, que van desde alteraciones bioquímicas y moleculares, hasta disfunción endocrina, modificaciones conductuales y fisiológicas (efectos sobre crecimiento, reproducción) y de los parámetros poblacionales. Desde el punto de vista regulatorio, las pruebas de toxicidad aguda pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, controlar descargas de aguas residuales, municipales e industriales, regular el uso y producción de sustancias químicas, así como también para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental (NCh, 1999). En México, la prueba se realiza siguiendo los lineamientos establecidos por la norma mexicana NMX-AA-087-SCFI-2010.

Dentro del grupo de los cladóceros, las especies de *Daphnia*, específicamente *Daphnia magna* (figura 1) es la más utilizada como organismo de prueba en toxicidad aguda.

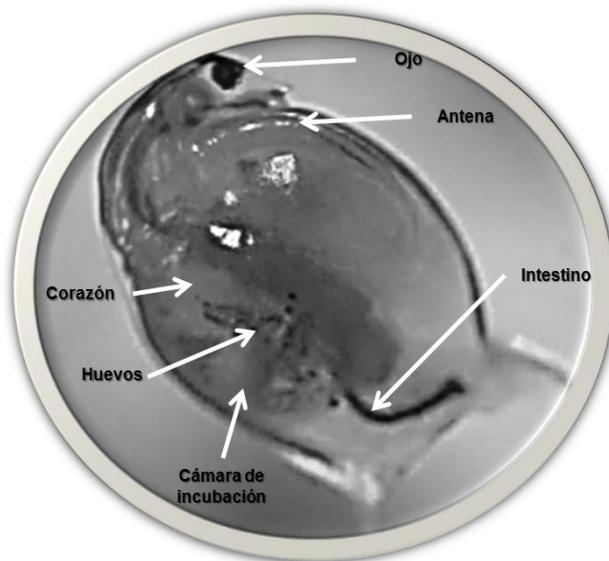


Figura 1. Morfología de *Daphnia magna*.

Su amplia distribución geográfica, importancia en la comunidad zooplanctónica, facilidad de cultivo en el laboratorio, reproducción partenogénica, ciclo de vida corto y producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo el ideal para la evaluación de toxicidad a nivel universal, permite determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales, industriales y municipales, lixiviados y efluentes agrícolas (Goulden y Henry, 1987).

D. magna se puede obtener de compañías proveedoras de materiales biológicos, quienes certifican la especie (Biensinger y Christensen, 1972). El promedio de vida óptimo es de 40 a 56 días, sin embargo, para establecer las condiciones del cultivo en el laboratorio es necesario tener en cuenta la calidad del agua, la intensidad de luz y temperatura. Es importante dar seguimiento al ciclo biológico y determinar el tiempo necesario para alcanzar la madurez sexual y tasa reproductora (Gutiérrez *et al.*, 1989), además de evaluar la sensibilidad, utilizando dicromato de potasio (Edley y Law, 1988).

Ciclo biológico de *Daphnia magna*

Su reproducción es generalmente por partenogénesis, donde las hembras producen células diploides con un mismo genotipo, por lo tanto, se obtiene una población solamente de hembras. El desarrollo de los huevos dentro de la cámara de incubación hasta su eclosión es de 72 h. Cuando los organismos son liberados cambian de muda (se libera de su exoesqueleto) hasta alcanzar su madurez sexual y obtener su primera nidada, que es cuando se produce su primer descendencia y cada individuo de *D. magna* produce de 6 a 10 crías por nidada.

Algunos factores desfavorables como: a) sobrepoblación, b) falta de alimento, c) temperaturas extremas, y d) acumulación de productos de desechos, inducen a las hembras a que produzcan óvulos constituidos de células haploides que al ser fecundados se obtienen huevos cubiertos por una cápsula protectora oscura llamada efípio. Cuando éstos son liberados pueden soportar la desecación y la congelación e incluso resistir el paso por el tubo digestivo de peces, aves y mamíferos. Estos huevos pueden sobrevivir tanto en invierno, como en las sequías estivales. Cuando reaparecen las condiciones favorables, eclosionan dando lugar a hembras partenogenéticas que inician de nuevo el ciclo asexual (figura 2).

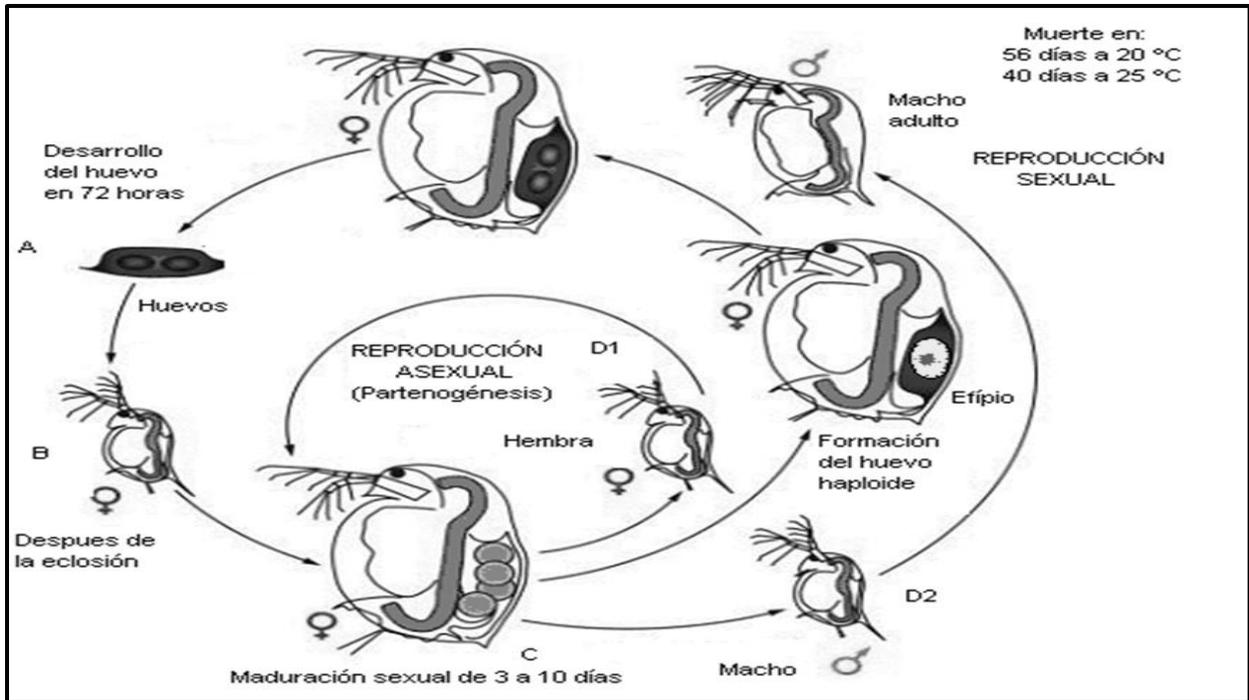


Figura 2. Ciclo biológico sexual y asexual de *Daphnia magna*

El alimento que se les suministra esta constituido por células de microalgas verdes de la especie *Chlorella vulgaris* tiene forma esférica, mide de 2 a 10 μm de diámetro, no posee flagelo, contiene pigmentos verdes y fotosintetizadores de clorofila a y b en su cloroplasto, a través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo solo dióxido de carbono, agua, luz blanca y pequeñas cantidades de minerales (figura 3).

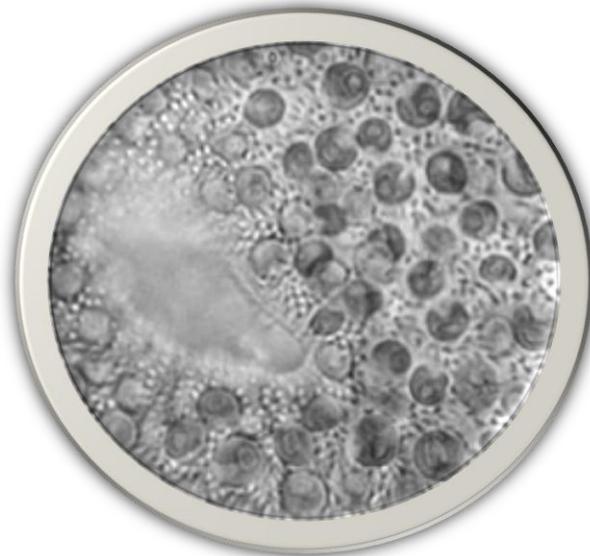


Figura 3. Células de algas *Chlorella vulgaris*.

OBJETIVO

Evaluar la calidad de agua, así como también de sustancias puras, mediante la prueba de toxicidad aguda empleando a *Daphnia magna*.

EQUIPO

Autoclave
Balanza analítica
Bomba de oxigenación de una vía
Cámara de Neubauer
Centrífuga
Magneto
Microscopio estereoscópico
Placa de calentamiento y agitación
Potenciómetro
Refrigerador
Timer

MATERIAL

Botellas de vidrio de color ámbar (100 ml)
Bureta (25 o 50 ml)
Cristalizadores (100 x 50 mm)
Espátulas
Frascos de vidrio (40 ml) y de boca ancha (1 000 ml)
Garrafón de plástico (19 L)
Lámpara de luz blanca
Matraz Erlenmeyer (125, 200, 250, 500 y 1 000 ml)
Matraz volumétrico de fondo plano (1 000 ml)
Micropipetas (de 20 a 200 y 5 000 μ l)
Pipetas (1, 2, 5 y 10 ml) y perilla de tres pasos
Pipetas Pasteur y bulbos de hule
Probetas (50, 100 y 1 000 ml)
Puntas para micropipeta
Termómetro de -50 a 50 °C y termómetro de máximas y mínimas
Tubos cónicos estériles (15 ml)
Vaso de precipitado (200 ml)

REACTIVOS

Nombre	Marca	No catálogo
Acetona (C ₃ H ₆ O)	SIGMA	A4206
Ácido bórico (H ₃ BO ₂)	SIGMA	B7660
Ácido etilen diamino tetra acético (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)	SIGMA	E1644
Ácido nítrico (HNO ₃)	SIGMA	438073-2.5
Ácido sulfúrico concentrado (H ₂ SO ₄)	SIGMA	339741-500
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	SIGMA	S6297
Cloruro de calcio dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	SIGMA	C5080
Cloruro de manganeso tetrahidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	SIGMA	M3634
Cloruro de potasio (KCl)	SIGMA	B933
Cloruro de sodio (NaCl)	SIGMA	S5676
Dicromato de potasio (K ₂ Cr ₂ O ₇)	OMNICHEM	16770
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	SIGMA	P3786
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	SIGMA	P0662
Hidróxido de potasio (KOH)	SIGMA	P5958
Nitrato de cobalto hexahidratado (Co(NO ₃) ₂ 6H ₂ O)	SIGMA	C2769
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	SIGMA	S8170
Selenito de sodio (Na ₂ SeO ₃)	SIGMA	S1382
Sulfato de cobre penta hidratado (CuSO ₄ 5H ₂ O)	SIGMA	S6283
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ 7H ₂ O)	SIGMA	F5921
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO ₄ 7H ₂ O)	SIGMA	Z0105
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ 7H ₂ O)	SIGMA	F2387
Trióxido de molibdeno (MoO ₃)	SIGMA	M2277

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA PRUEBA**Agua reconstituida**

Para preparar agua reconstituida, elaborar las siguientes soluciones madre, diluyendo cada uno de los reactivos por separado en agua destilada y aforando a 1 L.

- Cloruro de calcio dihidratado 80 mM 1.78 g
- Sulfato de magnesio heptahidratado 20 mM 4.93 g
- Bicarbonato de sodio 31 mM 2.59 g
- Cloruro de potasio 3.1 mM 0.23 g

Mantener a temperatura ambiente y almacenar máximo por dos meses. Para preparar 18.7 L de agua reconstituida, agregar 17 L de agua desionizada en un garrafón, adicionar 425 ml de cada una de las soluciones madre. Verificar que la dureza del agua se encuentre entre 250 ± 25 mg/L de CaCO_3 de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-072-SCFI-2001 (ANEXO I). Mantener en aireación por 24 horas y almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.

Dicromato de potasio (1.5 mM)

Disolver 50 mg y aforar a 100 ml con agua desionizada. Mantener a 4 °C y almacenar máximo seis meses.

METODOLOGÍA

Prueba de toxicidad aguda

Para el desarrollo de la prueba de toxicidad aguda con *D. magna* se requiere contar con organismos adecuados (ANEXO II), se emplean organismos (< 24 h de nacidos) expuestos a diferentes concentraciones de una muestra pura o de un agente tóxico durante un período de 48 h. Como resultado de la exposición, es posible determinar la concentración de la muestra o agente tóxico que producen la muerte al 50 % de la población (CL_{50}), con un nivel de confiabilidad del 95 %, también determinar la concentración mínima donde se observa mortalidad, así como la concentración donde la muestra no produce la muerte de los organismos.

Se preparan cinco diluciones de la muestra pura empleando un factor dilución de 0.5 (100, 50, 25, 12.5 y 6.25 %), cada dilución se afora a 100 ml, se incluye un control negativo (agua reconstituida) y un control positivo con una solución de un compuesto tóxico de referencia (dicromato de potasio 0.50 g/L). Posteriormente se vacían 30 ml de cada una de las diluciones, así como el control negativo y positivo a cada frasco, por triplicado y con la ayuda de una pipeta Pasteur despuntada colocar 10 organismos (*D. magna*).

Se colocan los frascos en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y fotoperíodo (16 h de luz / 8 h de oscuridad) por un tiempo de 48 h (figura 4).

Transcurrido el tiempo establecido, se agitan los frascos de prueba con la mano en forma circular para reactivar el movimiento de los organismos que se posan inmóviles en el fondo, posteriormente se realiza el conteo de individuos muertos y finalmente se registran las lecturas de mortalidad (Ver ejemplo en tabla 1).

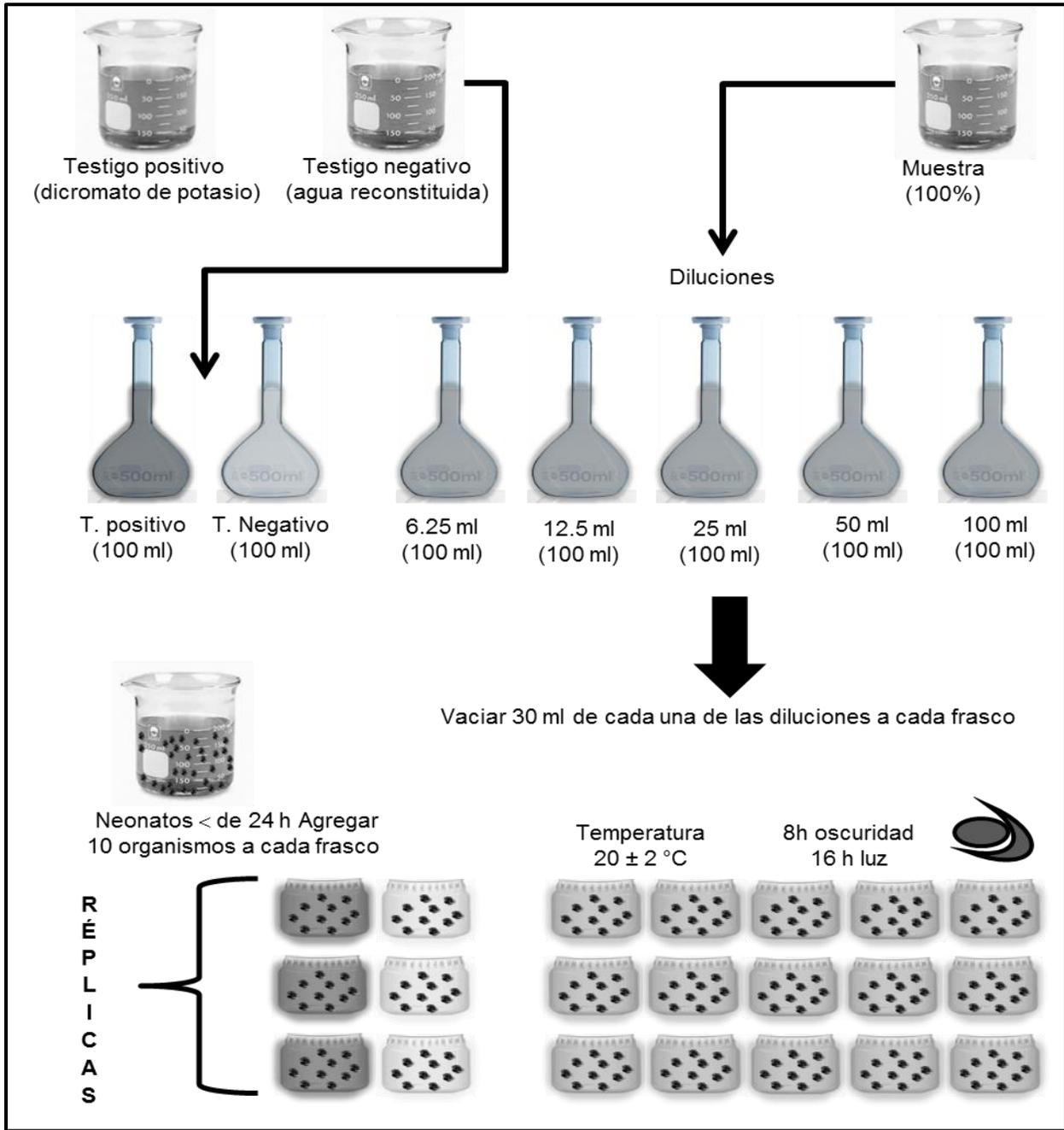


Figura 4. Procedimiento de la prueba.

RESULTADOS

Para el cálculo de la CL_{50} y sus respectivos límites de confianza al 95 % se utilizan el método Probit (Ramírez, 2004). Este método permite estimar la CL_{50} ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancia. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia se transforma a unidades Probit, esta transformación permite el ajuste de una recta de regresión lineal, en la cual la concentración correspondiente al Probit 0.5 corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar la muerte del 50 % de la población. Una de las restricciones del método es que para el cálculo de la CL_{50} deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100 % de mortalidad. Preparar una tabla con los siguientes datos (tabla 1):

- Concentraciones usadas en la prueba (%)
- Log_{10} de la concentración (X)
- Número de organismos expuestos (N)
- Mortalidad observada (r)
- Porcentaje de mortalidad (P)
- Probit empírico (PE)
- Probit calculado (PC)

Tabla 1. Registro de mortalidad

Concentración (%)	Log_{10} Concentración (X)	Organismos expuestos (N)	Mortalidad por frasco			Mortalidad observada (r)	Porcentaje Mortalidad (P)	Probit empírico (PE)	Probit calculado (PC)
			R1	R2	R3				
100	2.0	30	9	8	7	24	80	5.84	5.81
50	1.7	30	5	7	6	18	60	5.25	5.28
25	1.4	30	4	4	4	12	40	4.75	4.74
12.5	1.1	30	2	3	1	6	20	4.16	4.21
6.25	0.8	30	1	1	1	3	10	3.72	3.68
T. Negativo	-	30	1	0	1	2	6.6	3.49	-
T. Positivo	-	30	5	4	6	15	50	5.0	-

Calcular los valores de porcentaje de mortalidad de acuerdo a la fórmula y registrar los datos en la tabla 1:

$$\text{Mortalidad (\%)} = \frac{A}{B} \times 100$$

Donde:

A = Mortalidad observada por concentración (r)

B = Número de organismos expuestos por concentración (N)

Ejemplo:

$$\text{Mortalidad (\%)} = \frac{24}{30} \times 100 = 80$$

Con el porcentaje de mortalidad, determinar el valor del PE de acuerdo a la tabla 2 y registrarlo en la tabla 1.

Tabla 2. Relación del porcentaje (%) de mortalidad y el Probit empírico

% mortalidad	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0		2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	5.28	5.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.373	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

La gráfica se construye con los datos registrados en la tabla 1, en el eje de las abscisas se coloca el Log_{10} de la concentración (X) y en el eje de las ordenadas el probit empírico (PE) (figura 5).

El valor del PC se obtiene del ajuste de la recta por el método de mínimos cuadrados utilizando la ecuación de la recta:

$$Y = mx + b$$

Donde:

m = Pendiente (1.7706)

X = Log_{10} de la concentración (2 para la concentración del 100 %)

b = Ordenada al origen (2.2688)

Ejemplo:

$$Y = 1.7706(2) + 2.2688 = 5.81$$

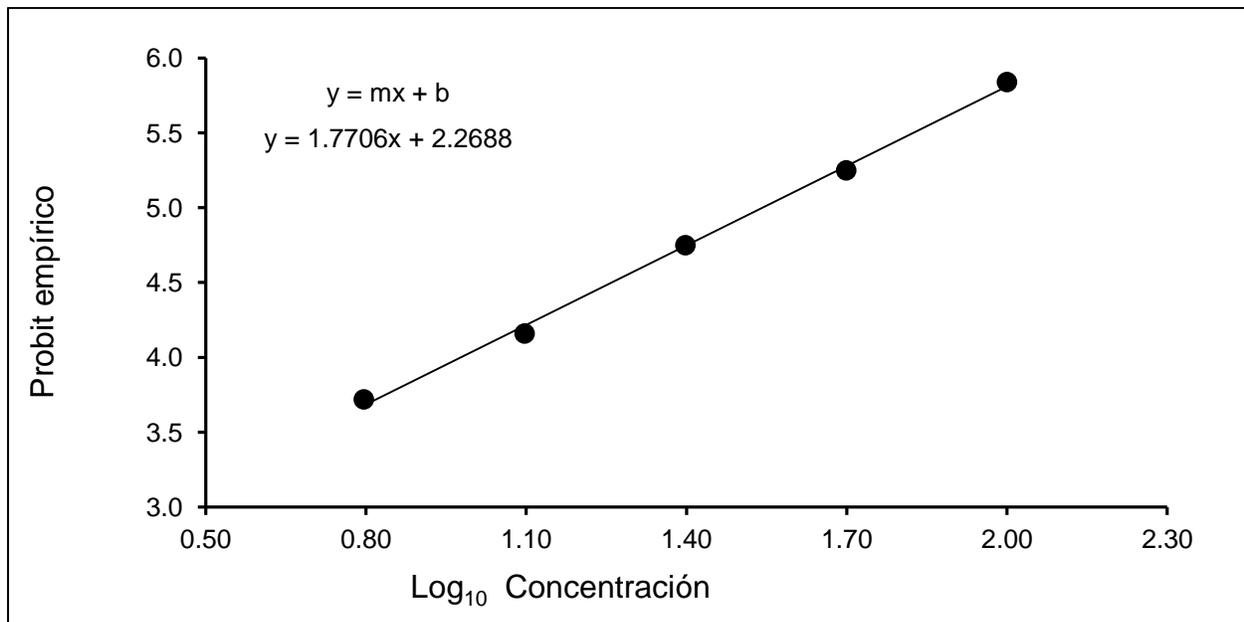


Figura 5. Representación gráfica de la concentración y el Probit empírico.

Determina la CL_{50} , despejando X (CL_{50}) de la ecuación de la recta, sustituyendo el valor de Y por la unidad Probit 5 que equivale al 50 % de mortalidad y obteniendo el anti Log_{10} para cambiar las unidades Probit a porcentaje.

$$CL_{50} = \text{anti Log}_{10} \left(\frac{y - b}{m} \right)$$

Ejemplo:

$$CL_{50} = \text{anti Log}_{10} \left(\frac{5 - 2.2688}{1.7706} \right) = \text{anti Log}_{10} (1.5425) = 34.88 \%$$

Determinar la "S" definida como el Intervalo de Incremento (IC) con la relación:

$$S = \frac{X_2 - X_1}{PC_2 - PC_1}$$

Donde:

X_2 y X_1 = valor más alto y más bajo obtenidos a partir del Log_{10} concentración (X)

PC_2 y PC_1 = valores más altos y más bajos obtenidos a partir del (PC)

Ejemplo:

$$S = \frac{2 - 0.80}{5.81 - 3.68} = 0.56$$

Determinar el error estándar (EE) de la CL_{50} y anotarlos en tabla 3:

- Logaritmo de la concentración (X)
- Número de organismos expuestos (N)
- Probit calculado (PC)
- Factor ponderado (w), se obtiene a partir de la tabla 4
- Productos: Nw , NwX y NwX^2
- Sumatorias: Nw , NwX y NwX^2

Calcular los productos de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$Nw = N \times w$$

$$NwX = Nw \times X$$

$$NwX^2 = Nw \times X^2$$

Tabla 3. Registro para determinar el error estándar de la CL₅₀

Log ₁₀ concentración (X)	Número organismos (N)	Probit calculado (PC)	Factor ponderado (w)	Producto (Nw)	Producto (NwX)	Producto (NwX ²)
2.0	30	5.81	0.503	15.09	30.18	60.36
1.7	30	5.28	0.616	18.48	31.39	53.34
1.4	30	4.74	0.616	18.48	25.83	36.11
1.1	30	4.21	0.503	15.09	16.55	18.16
0.8	30	3.68	0.336	10.08	8.02	6.38
Sumatorias				Σ (Nw)=77.2	Σ (NwX)=111.97	Σ (NwX ²)=174.35

Tabla 4. Relación del factor ponderado (w) para el cálculo del Probit (PC)

	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.008	0.01
2	0.015	0.019	0.025	0.031	0.040	0.050	0.062	0.076	0.092	0.11
3	0.131	0.154	0.180	0.208	0.238	0.269	0.302	0.336	0.370	0.40
4	0.439	0.471	0.503	0.532	0.558	0.581	0.601	0.616	0.627	0.63
5	0.637	0.634	0.627	0.616	0.601	0.581	0.558	0.532	0.503	0.47
6	0.439	0.405	0.370	0.336	0.302	0.269	0.238	0.208	0.180	0.15
7	0.131	0.110	0.092	0.076	0.062	0.050	0.040	0.031	0.025	0.01
8	0.015	0.011	0.008	0.008	0.005	0.003	0.002	0.002	0.001	0.00

Obtener el error estándar (EE Log₁₀) de la CL₅₀ utilizando la siguiente relación:

$$EE_{Log_{10} CL_{50}} = S^2 \left[\left(\frac{1}{\sum Nw} + \frac{\sum Nw(m-z)^2}{\sum Nw(\sum NwX^2) - (\sum NwX)^2} \right) \right]^{0.5}$$

Donde:

EE Log₁₀ = Error estándar

S = Intervalo de incremento

m = pendiente

$$z = \frac{\sum NwX}{\sum Nw} = 1.4503$$

Sustituyendo:

$$EE\text{Log}_{10} CL_{50} = 0.56^2 \left[\left(\frac{1}{77.2} + \frac{77.2(1.7706 - 1.4503)^2}{77.2(174.35) - (111.97)^2} \right) \right]^{0.5} = 0.0460$$

El Intervalo de Confianza (IC) de la CL₅₀, está dado por la siguiente ecuación:

$$CCL_{50} = (CL_{50})(EE\text{Log}_{10} CL_{50}) (Log_e 10)$$

Sustituyendo:

$$ICCL_{50} = (34.88)(0.0460)(2.3026) = 3.69$$

El resultado final puede reportarse de la siguiente manera:

$$CL_{50} \pm IC \ 95\% \qquad 34.88 \% \pm 3.69$$

También puede indicarse restando y sumando el valor del intervalo de confianza a la concentración letal media:

$$CL_{50} = 34.88 \%$$

$$IC_{min} = 31.19 \qquad IC_{máx} = 38.57$$

LITERATURA

- APHA, AWWA, WPCF. 1987. Standar methods for the examination of water and wastewater. American public Health Association. Port City Press. Baltimore, Maryland, E. U. A 10-200.
- Biensinger, K. E. Y Christensen G. M. 1972. Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna* (Efectos de varios metales en la sobrevivencia, crecimiento, metabolismo y reproducción de *Daphnia magna*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada 29: 1691 – 1700.
- Edley, M. T. Y Law R. 1988. Evolution of life Histories and Yields in Experimental Population of *Daphnia magna*. Biological Journal Linnean Society 34: 309 – 326.
- Goulden, C. E. y Henry, L. L. 1987. Instrucciones para el cultivo de *Daphnia* para pruebas de toxicidad. Guía de trabajo. Academy of Natural Sciencies. Filadelfia, Pensilvania, E.U.A. 13 pp.
- Gutiérrez, L. E., Lerdo de Tejada, B. A., Huerto-Delgadillo, R. I., García, C. J. 1989. Procedimientos de evaluación toxica de efluentes industriales líquidos utilizando a *Daphnia magna* (Cladóceras – Crustácea). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 105 p.
- Kluttgen, B. U., Dulmer Engels M., Ratte H. T., 1994. A Dam and artificial freshwater for the culture of zooplankton. Water Research. 28 (3): 743 – 746.
- NCh (Normas Chilenas), 1999. Aguas Bioensayos de toxicidad aguda mediante la determinación de la inhibición de la movilidad de *Daphnia magna* o *Daphnia pulex* (Crustácea, Cladóceras). Instituto Nacional de Normalización, INN - Chile.
- Needham, J. G., Galtsoff, P. S., Lutz, F. E. Welch, P. S. 1937. Culture methods for invertebrate animals. Cumstock Publ. Co. Reprinted Dover Publ., Inc., Nueva York.
- NMX-AA-072-SCFI-2001. Análisis de agua – Determinación de dureza total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba. (Diario Oficial de la Federación, 2011). 14 p.
- NMX-AA-087-SCFI-2010. Análisis de Calidad de Agua – Evaluación de Toxicidad Aguda con *Daphnia magna* (Crustácea – Cladóceras). Método de prueba. (Diario Oficial de la Federación, 3 de marzo de 2011). 39 p.
- Larrain, A. 1995. Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: importancia de los bioensayos de toxicidad. Revista de Ciencia y Tecnología del Mar, CONA (Nº especial):39-47.
- Lewis, M. A. y Maki, A. W. 1981. Effects of water harness diet on productivity of *Daphnia magna*, in laboratory culture. United States Environmental Protection Agency (USEPA). p. 175 – 179.
- Ramírez V. S. F. 2004. Curso taller: cultivo, mantenimiento y método de evaluación de toxicidad aguda en *Daphnia magna* Straus. Instituto Nacional de Ecología y Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. 45 p.

ANEXO I. DETERMINACIÓN DE DUREZA TOTAL DEL AGUA RECONSTITUÍDA
REACTIVOS

Nombre	Marca	No catálogo
Cloruro de amonio (NH ₄)	J.B.BAKER	0660-01
Cloruro de magnesio hexahidratado (Mgcl ₂ .6H ₂ O)	J.B.BAKER	
Hidróxido de amonio concentrado (NH ₄ OH)	MEYER	0590
Ácido etilendiaminotetra acético (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)	SIGMA	438073-2.5
Sal de magnesio de EDTA		
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	SIGMA	M-5921
Hidróxido de sodio (NaOH)	J.B.BAKER	3722-01
Indicador de negro de eriocromo T	J.B.BAKER	L126-03
Rojo de metilo	J.B.BAKER	R086-02
Carbonato da calcio anhidro (CaCO ₃)	J.B.BAKER	1288-50
Ácido clorhidrico concentrado (HCl)	J.B.BAKER	9530-33
Cloruro de sodio (NaCl)	SIGMA	S-7653

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA PRUEBA

Solución amortiguadora

Disolver 16.9 g de cloruro de amonio en 143 ml de hidróxido de amonio, añadir 1.25 g de sal de magnesio de EDTA, diluir con agua desionizada y aforar a 250 ml. Conservar durante un mes o cuando cambie el pH (10.0 ± 0.1) al añadir 1 o 2 ml a la muestra.

NOTA: En caso de no disponer de la sal de magnesio de EDTA entonces mezclar: 1.179 g de ácido etilendiaminotetra acético y 0.780 g de sulfato de magnesio heptahidratado o 0.644 g de cloruro de magnesio hexahidratado, diluir con 50 ml con agua desionizada y añadirlo a la solución antes de aforar a 250 ml.

Indicador negro de eriocromo T

Mezclar 0.5 g del indicador negro de eriocromo, agregar 100 g de cloruro de sodio y triturar en el mortero hasta formar una mezcla homogénea.

Indicador rojo de metilo

Disolver 0.1 g de sal de sodio de rojo de metilo en agua desionizada y aforar a 100 ml.

Solución de EDTA (0.01 M)

Disolver 3.723 g de ácido etilendiaminotetra acético dihidratado en 1 L de agua desionizada. Valorar con una solución de carbonato de calcio.

Solución de NaOH (0.1 N)

Disolver 4 g de hidróxido de sodio en 1 L de agua desionizada.

Solución del ácido clorhídrico (1:1)

Diluir 100 ml de ácido clorhídrico en 100 ml de agua desionizada.

Solución de CaCO₃ (1 mg/ml)

Mezclar 1.0 g de carbonato de calcio anhidro con el ácido clorhídrico (1:1) poco a poco hasta la disolución total del carbonato de calcio (aprox. 4 ml), agregar 200 ml de agua desionizada y llevar a ebullición de 6 a 10 min para eliminar el CO₂.

Dejar enfriar y añadir de 1 a 2 gotas del indicador de rojo de metilo, ajustar a un color naranja intermedio adicionando unas gotas de hidróxido de sodio (0.1 N) o ácido clorhídrico (1:1) según se requiera. Aforar a 1 L en agua desionizada.

METODOLOGÍA

Titulación

Colocar 50 ml del agua reconstituida en un matraz erlenmeyer de 250 ml, añadir 1 o 2 ml de la solución amortiguadora para obtener un pH de 10.0 a 10.1.

Añadir una pizca (0.2 g) del indicador negro de eriocromo T. La muestra debe tomar un color vino rojizo.

Titular con la solución de EDTA (0.01 M), gota a gota y con agitación continua hasta la desaparición de los matices rojizos. En el punto final la muestra cambia de color rojo a azul (figura 6).

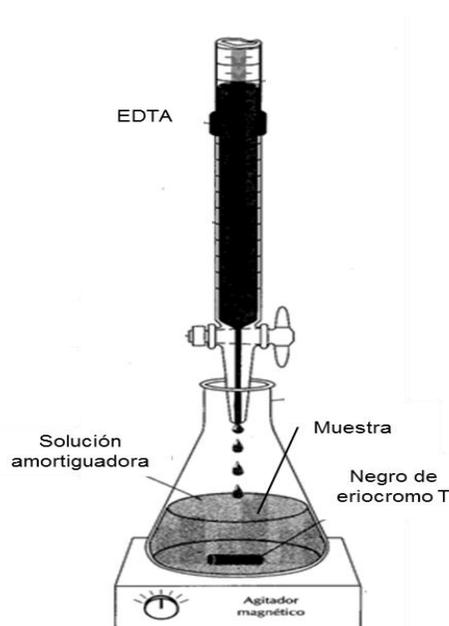


Figura 6. Valoración de dureza del agua reconstituida

Cálculos de la dureza total

Obtener la dureza total con la siguiente ecuación:

$$DT \text{ CaCO}_3 = \frac{(A - B) \times C \times 1\,000}{D}$$

Donde:

DT = Dureza total expresada como CaCO_3 (mg/L)

A = Volumen gastado de EDTA para la titulación de la muestra (ml)

B = Volumen gastado de EDTA para la titulación en el blanco (ml)

C = Cantidad de carbonato de calcio equivalente a 1 ml de EDTA (mg)

D = Volumen de la muestra (ml)

Ejemplo:

$$DT \text{ CaCO}_3 = \frac{(11.1 \text{ ml} - 0.2 \text{ ml}) \times 1.13 \text{ mg} \times 1\,000}{50 \text{ ml}} = 246.6 \text{ mg/L}$$

ANEXO II. CONDICIONES PARA EL MANTENIMIENTO DE *Daphnia magna*

Se recomienda que antes de utilizar el agua reconstituida preparada, ya sea para el mantenimiento de *D. magna* o para la dilución de las muestras, se debe realizar una prueba que permita comprobar que no presenten ningún efecto sobre la supervivencia de los organismos.

Para esta prueba, se colocan en tres frascos de vidrio un volumen de 30 ml de agua reconstituida y colocar 10 organismos (*D. magna*) por cada frasco. Al término de un periodo de 48 h la supervivencia deberá ser mayor al 90 %.

Los organismos se mantienen en frascos de vidrio que contienen 1 L de agua reconstituida y una densidad de 20 individuos (figura 7).



Figura 7. Mantenimiento de *D. magna*

Las condiciones óptimas para el crecimiento, desarrollo y reproducción son las siguientes:

- agua reconstituida con una dureza de 250 ± 25 mg/L de carbonato de sodio, suplementada con 0.2 ml de selenito de sodio (0.053 mM) por litro de agua.
- pH de 8 ± 2
- oxígeno disuelto mayor a 2 mg/L
- temperatura de 20 ± 2 °C
- fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad con una intensidad lumínica (luz blanca) de 800 a 1 000 luxes.
- alimentación tres veces por semana de una suspensión de algas de la especie *Chlorella vulgaris* administrando 2.5×10^6 células/*Daphnia*.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Soluciones madre para el cultivo de algas (Medio Bold Basal)

Para preparar el medio de cultivo Bold – Basal elaborar las siguientes soluciones madre, cada reactivo se disuelve previamente en agua destilada y se afora a 100 ml.

• Nitrato de sodio	2.94 M	25 g
• Cloruro de calcio dihidratado	0.17 M	2.5 g
• Sulfato de magnesio heptahidratado	0.30 M	7.5 g
• Fosfato de potasio monobásico	1.29 M	17.5 g
• Fosfato de potasio dibásico	0.52 M	7.5 g
• Cloruro de sodio	0.43 M	2.5 g
• Sulfato ferroso heptahidratado	17.9 mM	0.498 g
		adicionar 100 µl de H ₂ SO ₄ .
• Ácido bórico	0.18 M	1.142 g
• EDTA (0.13 M) e hidróxido de sodio	0.55 M	5 g y 3.1 g
• Solución stock de metales		
a) Sulfato de zinc heptahidratado	30 mM	0.882 g
b) Cloruro de manganeso tetrahidratado	7.3 mM	0.144 g
c) Trióxido de molibdeno	4.9 mM	0.071 g
d) Sulfato de cobre pentahidratado	6.3 mM	0.157 g
e) Nitrato de cobalto hexahidratado	1.7 mM	0.049 g

Todas estas soluciones madre se mantienen en refrigeración a 4 °C durante un tiempo máximo de seis meses. Al momento de su uso deben estar a temperatura ambiente.

Preparación del cultivo de algas (*Chlorella vulgaris*)

Para preparar 1 litro de cultivo de algas, agregar 990 ml de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer, adicionar 1 ml de cada una de las soluciones madre (medio Bold-basal) en el orden arriba mencionadas, esterilizar en autoclave a 15 psi, dejar enfriar a temperatura ambiente y adicionar 25 ml de una suspensión de algas (*Chlorella vulgaris*),

posteriormente colocar el matraz en aireación y con luz blanca durante 6 días para su reproducción.

Una vez obtenida la reproducción de la suspensión del cultivo de algas, centrifugar en tubos cónicos de 15 ml a 2 000 rpm y almacenar en refrigeración a 4 °C máximo durante dos semanas.

Preparación del alimento para *D. magna* (500 ml)

A dos tubos cónicos de la suspensión de algas, retirar el sobrenadante, resuspender en 15 ml de agua reconstituida, agitar y centrifugar a 2 000 rpm durante 10 minutos. Repetir por tres ocasiones. Posteriormente transferir dicha suspensión a un matraz Erlenmeyer y adicionar 470 ml de agua reconstituida.

Colocar una gota de la suspensión de algas en la cámara Neubauer (figura 8), contar el número de células en dos cuadrantes (A y B).

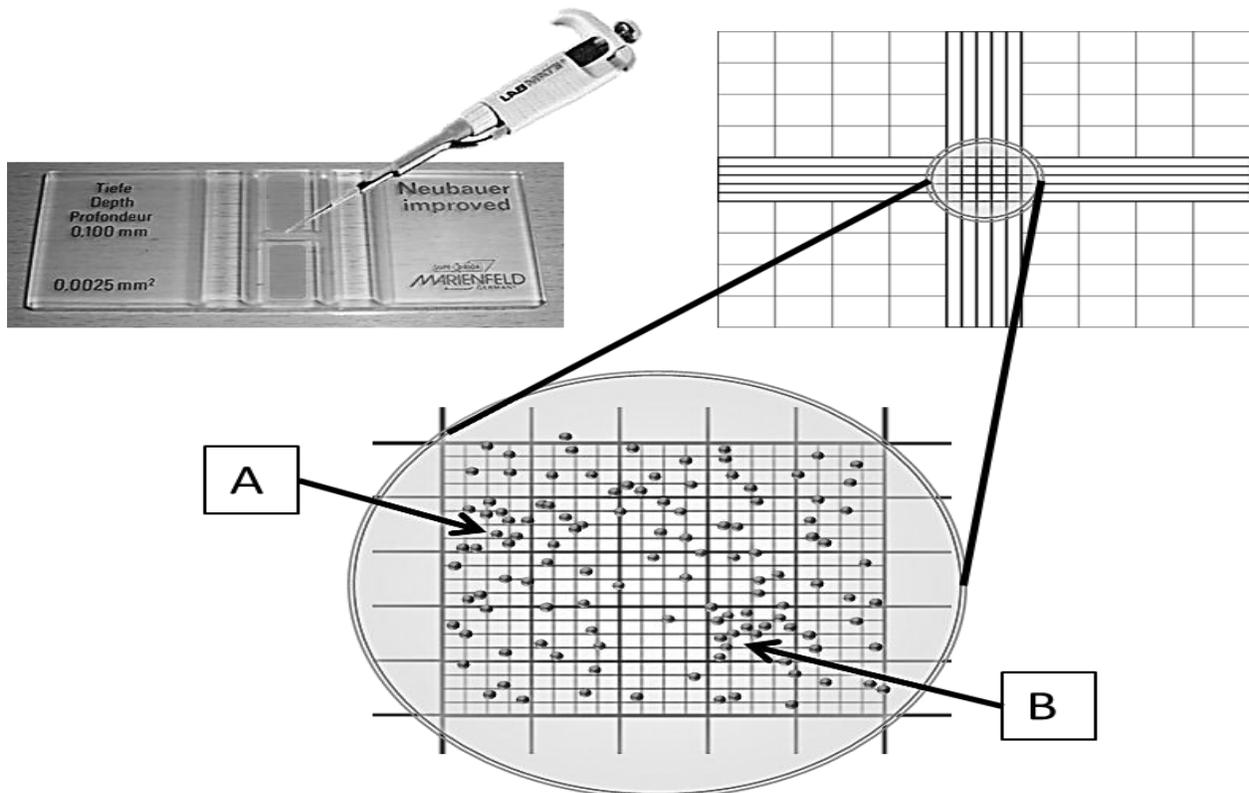


Figura 8. Conteo de células en dos cuadrantes (A y B) de la Cámara de Neubauer.

Calcular la concentración de células (cél/ml) aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{(A + B)}{2} \times 25 \text{ mm}^2 \times 10\,000 \text{ mm}$$

Donde:

A = número de células en el primer cuadrante

B = número de células en el segundo cuadrante

25 = Superficie de la cámara

10 000 = Profundidad de la cámara

Ejemplo:

$$\frac{\text{células}}{\text{ml}} = \frac{(25 + 21)}{2} \times 25 \text{ mm}^2 \times 10\,000 \text{ mm} = 5.75 \times 10^6$$

Añadir el volumen requerido de tal manera que cada organismo (*D. magna*) se alimente con 2.5×10^6 células /*Daphnia* de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Vol (ml)} = \frac{\text{CR}}{\text{CMO}} (n)$$

Donde:

CR = concentración requerida para cada organismo (2.5×10^6 células)

CMO = concentración de células obtenidas en el alimento

n = número de organismos por recipiente

Ejemplo:

$$\text{Vol} = \frac{2.5 \times 10^6}{5.75 \times 10^6} \times 20 = 8.7 \text{ ml}$$

PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR INCORPORACIÓN EN PLACA CON *Salmonella typhimurium*

Emma Socorro Soto Mora

Laboratorio de Mutagénesis y Química Ambiental

INTRODUCCIÓN

La prueba de mutagenicidad por incorporación en placa (Prueba de Ames), fue desarrollada por Ames y colaboradores en 1973 para la evaluación preliminar del potencial mutagénico de diversas sustancias químicas asociadas a alimentos, bebidas, medicamentos y mezclas complejas (Tabrez *et al.*, 2011) presentes en agua (Cyplik *et al.*, 2012; Gartiser *et al.*, 2012; Kmasniewska *et al.*, 2012), suelo (Katnoria *et al.*, 2011; Anjum y Malik, 2012) y aire (De Andrade *et al.*, 2011; Cohn *et al.*, 2011; Käffer *et al.*, 2012).

Universalmente, es quizá la prueba más difundida para la detección de mutágenos de forma simple, rápida y económica (Trossero, 2006) por agencias reguladoras y laboratorios de prueba como la FDA (Food and Drug Administration), la EPA (Environmental Protection Agency), la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) y la ICH (International Conference on Harmonization), para asegurar la uniformidad en los procedimientos de prueba utilizados en la aprobación y registro de nuevos productos químicos, medicamentos y biocidas (Mortelmans y Zeiger, 2000; Aufderheide y Gressmann, 2008; Nunes *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

La prueba de Ames emplea cepas derivadas de la bacteria *Salmonella typhimurium* (LT2), modificadas genéticamente, que poseen una serie de marcadores capaces de detectar compuestos que causan mutaciones por corrimiento en el marco de lectura o sustitución de pares de bases (Maron y Ames, 1983; Watanabe *et al.*, 1989,1990; Mortelmans y Zeiger, 2000; Kaleeswaran *et al.*, 2009) y se describen a continuación:

a) El marcador principal y fundamento de la prueba, lo constituye una mutación en el operón de la síntesis de histidina (*his*), que impide el desarrollo de bacterias auxotróficas en medios mínimos o carentes de este aminoácido, pero que al ser expuestas a compuestos mutagénicos revierten de auxotrófas (*his*⁻) a protótrofas (*his*⁺),

por lo que a esta prueba también se le conoce como prueba de reversión o retromutación.

b) Una mutación en el gen *rfa* ocasiona la alteración parcial de los lipopolisacáridos de la pared celular, incrementando la permeabilidad a moléculas grandes.

c) La delección en el gen *uvrB*, permite la detección de compuestos capaces de afectar el sistema de reparación por excisión del DNA y al extenderse al gen *bio* ocasiona que requieran biotina para su crecimiento.

d) El plásmido *pkM101* (*factor -R*) incrementa la frecuencia de reversión espontánea, proporciona resistencia al antibiótico ampicilina y codifica para los mecanismos de reparación propenso a error del DNA.

En un principio la prueba sólo aportaba información de compuestos con actividad mutagénica directa, porque los compuestos que requieren ser metabolizados para expresar su efecto mutagénico (promutágenos), como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y las nitrosaminas (figura 1), no eran detectados (Piekarska, 2010; Di Giorgio *et al.*, 2011; Singla *et al.*, 2012; Lübcke – von Varel *et al.*, 2012). Esto fue resuelto con la adición de mezclas enzimáticas de hígado de rata (fracción S9), inducidas previamente con aroclor o fenobarbital (Maron y Ames, 1983; Mortelmans y Zeiger, 2000; Sandoval *et al.*, 2009), que permiten la transformación de estos compuestos en intermediarios electrofílicos capaces de interactuar con el DNA o las proteínas, incrementando los efectos de toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Se ha encontrado que más del 80 % de los carcinógenos probados son mutágenos (Ames, 1973; Benigni y Bossa, 2011; Traversi *et al.*, 2011).

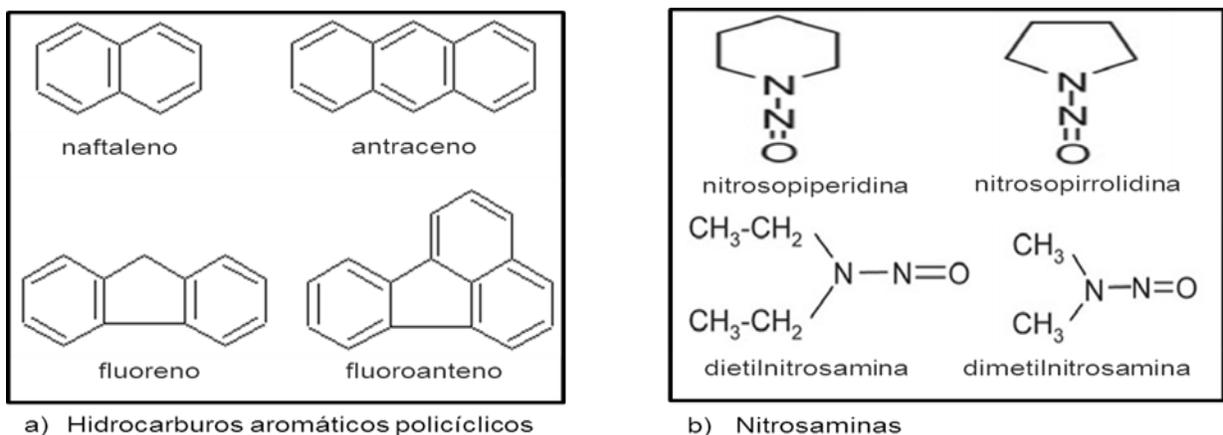


Figura 1. Compuestos promutágenos

Las cepas más empleadas son TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1538 y sus derivadas YG1021, YG1024, YG1041, y YG1042. Para la elección de la cepa es necesario tomar en cuenta el objetivo de estudio, la procedencia, disponibilidad y tipo de muestra (Arencibia y Rosario, 2003), como puede observarse en los ejemplos siguientes:

Para evaluar xenobióticos que revierten la mutación en el operón de la síntesis de histidina por corrimiento en el marco de lectura se elige la cepa TA98 y para sustitución de pares de bases a la cepa TA100.

Para la detección de mutágenos de acción directa como los derivados de HAPs (nitro, hidroxilo y metoxi), se emplea la cepa TA98 con y sin activación metabólica, y para la detección de nitroarenos se emplea su derivada, la cepa YG1021 por su alta sensibilidad y capacidad sobreproductora de nitroreductasa (Watanabe *et al.*, 1989; Reifferscheid *et al.*, 2011; Hesterberg *et al.*, 2012).

Para la detección de nitroarenos (1-nitropireno, 1,6 y 1,8 dinitropireno) la más recomendada es la cepa TA100 (Maron y Ames, 1983; Watanabe *et al.*, 1990), mientras que su derivada la cepa YG1042 detecta derivados nitro, amino e hidroxilamino de HAPs en muestras de aire por su capacidad sobreproductora de nitroreductasa y O-acetiltransferasa (Piekarska, 2009; Reifferscheid *et al.*, 2011).

Cada cepa revierte espontáneamente a las 48 h de incubación a una frecuencia característica (tabla 1 y 2), por lo que es importante encontrar la frecuencia de reversión espontánea en las condiciones particulares de cada laboratorio (Reifferscheid, *et al.*, 2012).

Tabla 1. Reversión espontánea en cepas de *Salmonella typhimurium* que detectan mutágenos que causan corrimiento en el marco de lectura del DNA

Cepa	Punto de mutación	Genotipo	(-S9)	(+S9)
TA1537	CG	HisC3076,rfa.uvrB,bio ⁻	5 - 20	5 - 20
TA1538	CG	HisD3052,rfa.uvrB,bio ⁻	5 - 20	5 - 20
TA97a	CG	HisD6610,rfa.uvrB,bio ⁻ , pKM101(ApR)	75 - 200	75 - 200
TA98	CG	HisD3052,rfa.uvrB,bio ⁻ , pKM101(ApR)	20 - 50	20 - 50

Tabla 2.Reversión espontánea en cepas de *Salmonella typhimurium* que detectan mutágenos que causan sustitución de pares de bases en el DNA.

Cepa	Punto de mutación	Genotipo	(-S9)	(+S9)
TA1535	CG	HisG46,rfa.uvrB,bio ⁻	5 - 20	5 - 20
TA100	CG	HisG46,rfa.uvrB,bio ⁻ pKM101(ApR)	75-200	75 - 200
TA102	AT	HisG428,rfa.uvrB,bio ⁻ pKM101(ApR), paQ1(TtR)	100-300	100-300

OBJETIVO

Proporcionar la metodología necesaria para la realización de la prueba de mutagenicidad, mediante la técnica de incorporación en placa con el empleo de las cepas TA98 y YG1021 de *Salmonella typhimurium* con y sin activación metabólica exógena.

EQUIPO

Agitador orbital
 Agitador tipo Vórtex
 Autoclave eléctrica
 Balanza granataria
 Balanza analítica
 Baño seco a 45 °C
 Cuenta colonias
 Equipo microfiltración
 Estufa de incubación
 Lámpara luz UV-15 W
 Placa de calentamiento y agitación
 Potenciómetro
 Refrigerador
 Ultracongelador -80 °C

MATERIAL

Algodón	Cajas de Petri estériles, desechables, de 100 x 15 mm
Asas bacteriológicas	Frascos vidrio (claro y ámbar) de 250, 500 y 1 000 ml
Charolas para pesar	Micropipetas y puntas 0.02, 0.2, 1 y 5 ml
Espátulas	Probeta graduada 100, 250 y 1 000 ml
Gasa	Filtros de celulosa estériles 0.22 µm y 2.5 cm de Ø
Gradillas	Filtro de polipropileno para esterilizar (Swinnex)
Mecheros Bunsen	Tubos con tapón de rosca de 13 x 10 cm
Papel filtro	Vasos de precipitado de 100 y 600 ml
Pinzas	Matraces Erlenmeyer de 125 a 1 000 ml

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. catálogo
Ácido cítrico monohidratado (C ₆ H ₁₀ O ₈)	JT BAKER	0118-01
Ácido clorhídrico (HCl)	JT BAKER	9529
Agar bacteriológico	BD BIOXON	215000
Ampicilina anhidra	SIGMA	A9393-25
Caldo nutritivo Oxoid No. 2	OXOID	CM0067
Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ . 6H ₂ O)	JT BAKER	2444 - 01
Cloruro de potasio (KCl)	JT BAKER	3040-01
Cloruro de sodio (NaCl)	JT BAKER	58.44
Cristal violeta	RACEL	
D - Biotina (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S)	SIGMA	B - 4501
Dextrosa Anhidra polvo (C ₆ H ₁₂ O ₆)	JT BAKER	1916-01
Dimetil sulfóxido (DMSO)	SIGMA	D - 5879
Fosfato de potasio dibásico anhidro (K ₂ HPO ₄)	JT BAKER	3252-01
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	JT BAKER	3828-01
Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	JT BAKER	3818-01
Fosfato de sodio y amonio (NaH ₂ NH ₄ PO ₄ - 4H ₂ O)	JT BAKER	3478
Hidróxido de sodio (NaOH)	JT BAKER	3722
L - Histidina (C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ .HCl.H ₂ O)	SIGMA	H - 8125
Fosfato de adenin dinucleótido nicotinamida (β-NADP)	SIGMA	N - 0505
Sal sódica de β-D-Glucosa-6-fosfato	ALDRICH	28597 - 8
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	JT BAKER	2500
Tetraciclina hidroclicorada	SIGMA	T3383-25

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución Vogel-Bonner

Disolver en 300 ml de agua destilada a 55 °C, cada una de las sales en riguroso orden, permitiendo la disolución completa antes de agregar la siguiente:

- Sulfato de magnesio heptahidratado 5 g
- Ácido cítrico monohidratado 50 g
- Fosfato de potasio dibásico anhidro 250 g
- Fosfato de sodio y amonio tetrahidratado 87.5 g

Aforar a 500 ml con agua destilada. Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente hasta por 60 días.

Agar medio mínimo de glucosa (AMMG)

Disolver por separado cada solución en matraces Erlenmeyer:

- 11.25 g de agar bacteriológico en 450 ml agua destilada
- 15 g de dextrosa anhidra en 150 ml agua destilada
- 15 ml de solución Vogel Bonner en 150 ml de agua destilada

Esterilizar las soluciones a 15 lb durante 20 min, enfriar a 55 °C. Verter al matraz que contiene el agar bacteriológico, la solución de dextrosa y posteriormente la solución de Vogel–Bonner. Mezclar y vaciar aproximadamente 30 ml de la mezcla en cada caja de Petri.

Almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

Cultivo nocturno

Disolver 1.25 g de caldo nutritivo Oxoid No. 2 en 50 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.

Agitar hasta la disolución completa y esterilizar a 15 lb durante 20 min. Enfriar la solución a 36 °C.

Agar de superficie con histidina y biotina 0.5 mM

Disolver 0.0105 g de L-histidina y 0.0122 g de biotina en 100 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb durante 20 min. Almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

Disolver 0.6 g de agar bacteriológico y 0.5 g de NaCl en 100 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb durante 20 min, dejar enfriar a 55 °C y agregar 10 ml de la solución de histidina y biotina 0.5 mM. Colocar alícuotas de 2.5 ml en tubos de ensaye con tapón de rosca, previamente esterilizados, para la detección de mutágenos directos y 2.0 ml para los de acción indirecta.

Mezcla S9

Buffer de fosfato de sodio (PBS 0.2 M, pH 7.4)

Disolver por separado 6.9 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado y 7.1 g de fosfato de sodio dibásico anhidro en 250 ml de agua destilada cada uno.

Almacenar cada solución en un frasco de vidrio claro en refrigeración a 4 °C durante un período máximo de 60 días. Mezclar el día de la prueba:

- 12 ml de la solución de fosfato de sodio monobásico monohidratado
- 88 ml de la solución de fosfato de sodio dibásico anhidro

Medir el pH y ajustar a 7.4 con la solución de fosfato de sodio monobásico. Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

Solución de β -NADP 0.1 M

Disolver el día de la prueba 0.383 g de β -NADP en 5 ml de agua destilada, esterilizar con una membrana de filtración de 0.22 μ m en un vial con tapa de rosca previamente esterilizado. Mantener la solución sobre hielo y protegida de la luz.

Solución de glucosa-6-fosfato 1 M

Disolver el día de la prueba 1.41 g de glucosa-6-fosfato en 5 ml de agua destilada, esterilizar con una membrana de filtración de 0.22 μ m en un vial con tapa de rosca previamente esterilizado.

Solución salina (KCl 1.65 M + MgCl₂.6H₂O, 0.4 M)

Disolver 12.3 g de KCl y 8.14 g de MgCl₂.6H₂O en 100 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb durante 20 min. Almacenar en un frasco de vidrio claro en refrigeración a 4 °C durante un período máximo de 60 días.

Preparar el día de la prueba la cantidad requerida de la mezcla S9, diluyendo las soluciones descritas a continuación, respetando el orden de mención y de acuerdo a la activación seleccionada.

Las cantidades siguientes son para preparar 50 ml de la mezcla:

	Activación estándar (ml)	Activación Alta (ml)
Agua destilada estéril	19.75	16.75
PBS 0.2 M pH 7.4	25.0	25.0
Solución de β-NADP 0.1 M	2.0	2.0
Solución de glucosa-6-fosfato 1 M	0.25	0.25
Solución salina (KCl 1.65 M + MgCl ₂ 0.4 M)	1.0	1.0
Fracción S9 (descongelar al momento)	2.0	5.0

Esterilizar con un Swinex y mantener sobre hielo a 4 ± 2 °C. Preparar solo la cantidad requerida y desechar el sobrante.

METODOLOGÍA

Requerimientos para la detección de mutágenos

Cultivo nocturno. Se preparan el día anterior a la prueba 2 matraces de 50 ml de cultivo nocturno.

Inocular con la cepa TA98 o YG 1021 e incubar a 37 °C durante un período de 17 h en el agitador orbital a 180 rpm (figura 2).



Figura 2. Preparación del cultivo nocturno

Cajas con AMMG y tubos con agar de superficie. Se retiran del refrigerador las cajas de Petri previamente preparadas con agar medio mínimo de glucosa y los tubos que contienen el agar de superficie, estos últimos se licúan en la autoclave durante 5 min a 15 lb y se mantienen en el baño seco a 45 °C (figura 3).



Figura 3. Medios de cultivo.

Muestra. Puede ser un compuesto puro o una muestra ambiental. En el caso de compuestos orgánicos presentes en muestras ambientales (HAPs) se realiza una extracción con solventes orgánicos (diclorometano), seguida de concentración y evaporación con nitrógeno, finalmente la muestra es resuspendida en DMSO. Se analiza un mínimo de tres diluciones por triplicado de cada muestra, con una repetición al tercer día (figura 4).

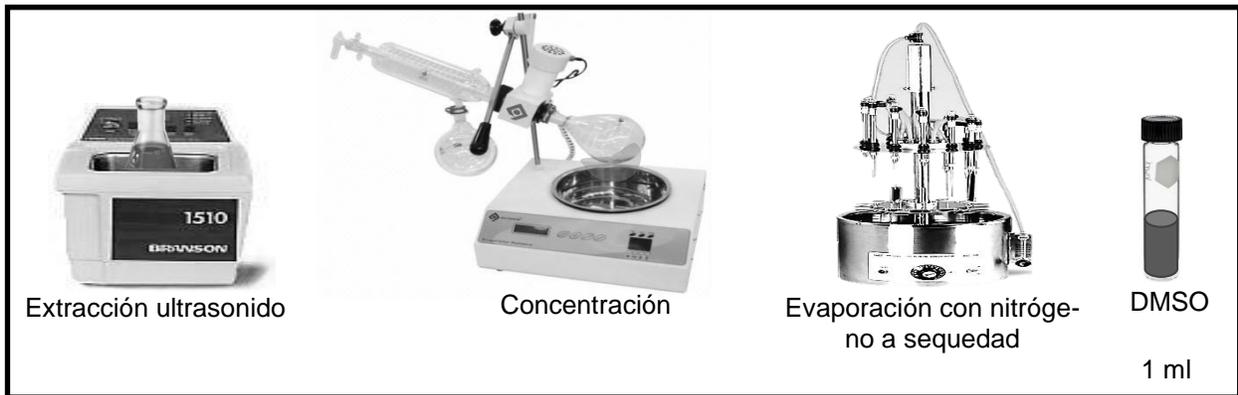


Figura 4. Preparación de la muestra.

Testigos. Es importante utilizar un testigo negativo para establecer el número de colonias que surgen espontáneamente para cada cepa, un testigo vehículo (DMSO), para establecer el número de colonias que revierten por acción del solvente y un testigo positivo (nitroantraceno o nitronaftaleno), mínimo en tres diluciones para confirmar las

propiedades de reversión y especificidad de cada cepa y la eficacia de la mezcla S9.

Mezcla S9. Esta mezcla se prepara el día de la prueba (figura 5).

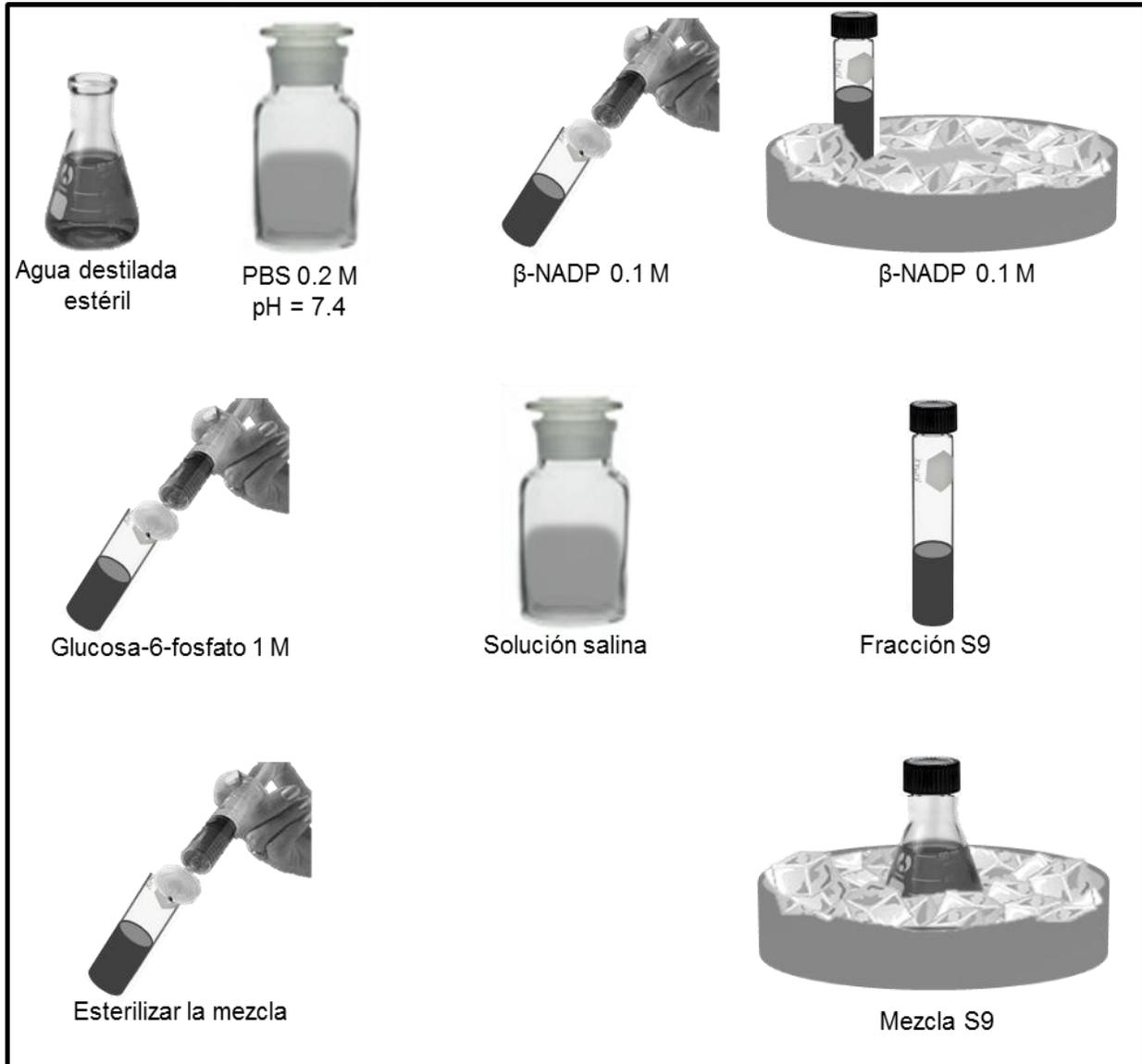


Figura 5. Preparación de la mezcla S9

Aplicación de la prueba

Para la detección de mutágenos de acción directa se utilizan los tubos que contienen 2.5 ml de agar de superficie con medio mínimo, se les añade el compuesto de referencia o muestra a probar y las bacterias provenientes del cultivo nocturno, mientras que para los de acción indirecta se emplean los tubos que contienen 2.0 ml del agar de superficie, se adicionan la muestra, las bacterias y la mezcla S9 (figura 6).

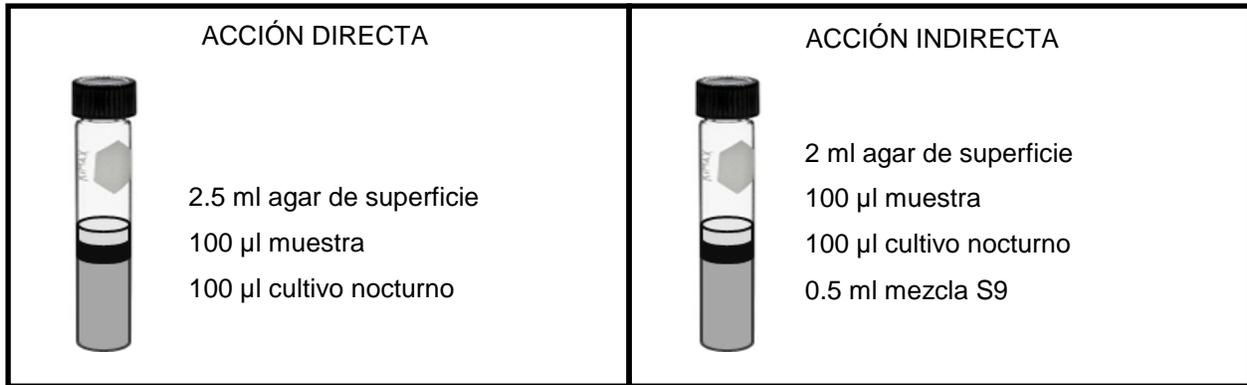


Figura 6. Preparación de los cultivos de acción directa e indirecta.

Mezclar los componentes con un vórtex, verter a las cajas de Petri que contienen agar medio mínimo de glucosa, rotar la caja uniformemente para lograr una superficie homogénea y dejar gelificar, finalmente incubar las cajas de Petri invertidas a 37 °C por 48 h (figura 7).



Figura 7. Preparación de cultivo en cajas Petri.

Cuenta de colonias revertantes

Contar el número de colonias revertantes en cada caja de Petri (figura 8), y registrar los valores obtenidos de acuerdo al formato de reporte (anexo 3).

Análisis de resultados

Los resultados de mutagenicidad se reportan como número de revertantes/ μg del compuesto analizado y se analizan estadísticamente mediante regresión lineal y análisis de varianza (ANOVA) (Reifferscheid *et al.*, 2012).

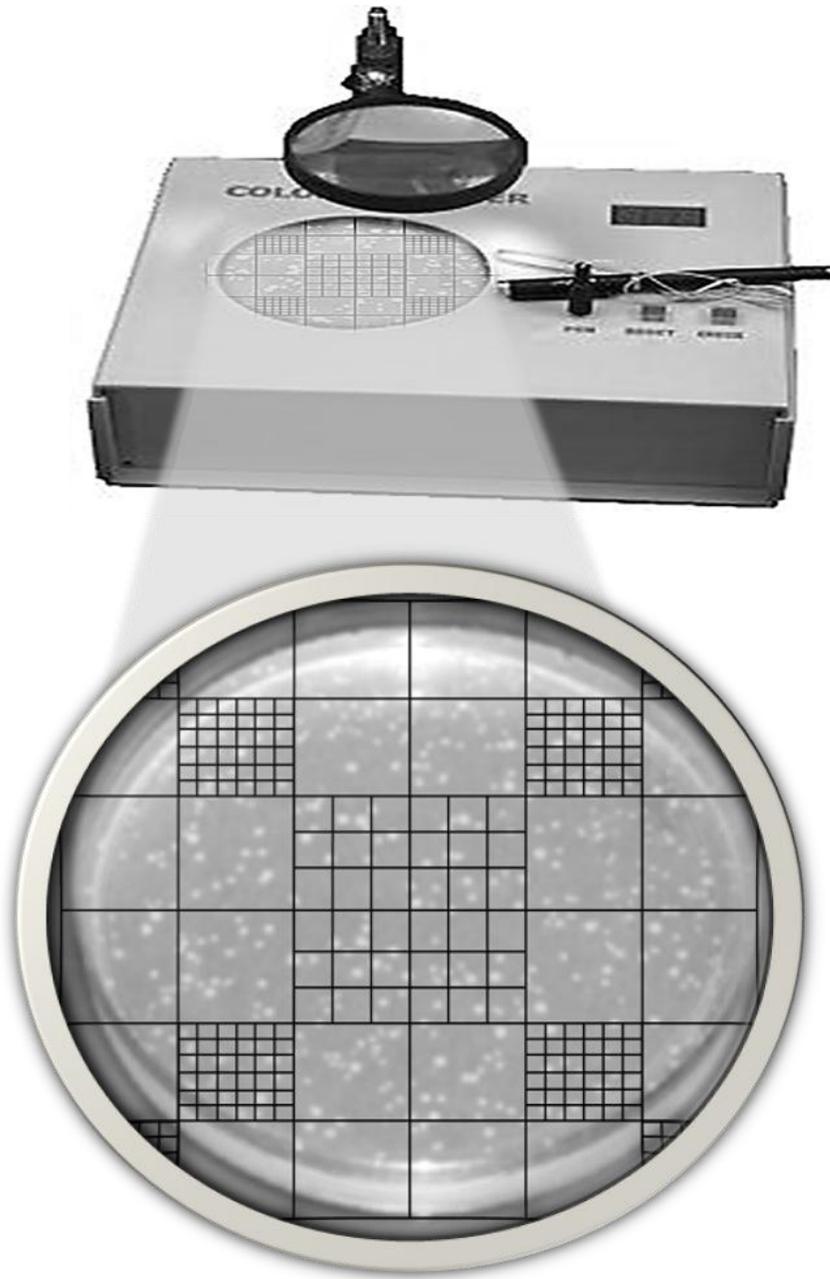


Figura 8. Conteo de colonias revertantes.

LITERATURA

- Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D. 1973. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection (frameshift mutagens/aflatoxin/benzo(a)pyrene/acetylaminofluorene). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol 70(8):2281-2285.
- Ames, B.N., Durston, W.E., Lee, F. D. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens (*Salmonella typhimurium* /lipopolysaccharide/ frameshift mutations). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol 70(3):782-786.
- Aufderheide, M., Gressmann, H. 2008. Mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas/vapour phase by use of different tester strains and cigarettes in a modified Ames assay. *Mutation Research* 656(1-2):82-7.
- Anjum, R., Malik, A. 2012. Mutagenicity assessment of contaminated soil in the vicinity of industrial area. *Environmental monitoring and assessment* 184 (5): 3013- 26.
- Arencibia, A. D. F., Rosario, F. L. A. 2003. Métodos de conservación de cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames. Trabajo de Revisión [Retel]. revista de toxicología en línea. 12 de marzo de 2012. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19002.pdf
- Benigni, R., Bossa, C. 2011. Alternative strategies for carcinogenicity assessment: an efficient and simplified approach based on in vitro mutagenicity and cell transformation assays. *Mutagenesis* 26(3):455-60.
- Cohn, C.A., Lemieux, C.L., Long, A.S., Kystol, J., Vogel U., White, P.A., Madsen, A.M. 2011. Physical-chemical and microbiological characterization, and mutagenic activity of airborne PM sampled in a biomass fueled electrical production facility. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52(4):319-30.
- Cyplik, P., Marecik, R., Piotrowska-Cyplik, A., Olejnik, A., Drożdżyńska, A., Chrzanowski, L. 2012. Biological Denitrification of High Nitrate Processing Wastewaters from Explosives Production Plant. *Water air and Soil Pollution* 223(4):1791-1800.
- De Andrade, S.J., Varella, S.D., Pereira, G.T., Zocolo, G. J., De Marchi, M.R., Varanda, E.A.. 2011. Mutagenic activity of airborne particulate matter (PM10) in a sugarcane farming area (Araraquara city, southeast Brazil). *Environmental Research* 111(4):545-50.
- Di Giorgio, C., Malleret, L., Gueydon-Morin, C., Rigaud, S., De Méo, M. 2011. Comparison of two extraction procedures for the assessment of sediment genotoxicity implication of polar organic compounds. *Mutation Research* 725(1-2):1-12.
- Gartiser, S., Hafner, C., Kronenberger-Schäfer, K., Happel, O., Trautwein, C., Kümmerer, K. 2012. Approach for detecting mutagenicity of biodegraded and ozonated pharmaceuticals, metabolites and transformation products from a drinking water perspective. *Environmental Science and Pollution Research International* 1.
- Hesterberg, T.W., Long, C. M., Bunn, W.B., Lapin, C.A., McClellan, R.O., Valberg, P.A. 2012. Health effects research and regulation of diesel exhaust: an historical overview focused on lung cancer risk. *Inhalation Toxicology*. Jun 4. [Epub ahead of print].
- Käffer, M.I., Lemos, A.T., Apel, M.A., Rocha, J.V., Martins, S.M., Vargas, V.M. 2012. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environmental Pollution* 163:24-31.
- Kaleeswaran, S., Sriram, P., Prabhu, D., Chinnathambi, V., Mathuram, L.N. 2009. Anti- and pro-mutagenic effects of silymarin in the Ames bacterial reverse mutation assay. *Phytotherapy Research* 23(10):1378-84.
- Katnoria, J.k., Arora, S., Bhardwai, R., Nagpal, A. 2011. Evaluation of genotoxic potential of industrial waste contaminated soil extracts of Amritsar, India. *Environmental Biology* 32(3): 363- 7.
- Kwasniewska, J., Nałęcz-Jawecki, G., Skrzypczak, A., Płaza, G.A., Matejczyk, M. 2012. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75(1):55-62.
- Lübcke-von Varel, U., Bataineh, M., Lohrmann, S., Löffler, I., Schulze, T., Flückiger-Isler, S., Neca, J., Machala, M., Brack, W. 2012. Identification and quantitative confirmation of dinitropyrenes and 3-nitrobenzantrone as major mutagens in contaminated sediments. *Environmental International* 44:31-9.

- Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455: 29 – 60.
- Nunes, L.G., Gontijo, D.C., Souza, C.J., Fietto, L.G., Carvalho, A.F., Leite, J.P. 2012. The mutagenic, DNA – damaging and antioxidative properties of bark and leaf extracts from *Coutarea hexandra* (Jacq.) K Schum *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33(2) 297-303.
- Maron, D. M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113: 173 – 215.
- Piekarska, K. 2009. Mutagenic effect of main groups of organic pollutants adsorbed on suspended particulate matter (PM10 and PM2.5) collected within Wrocław urban area. *Environment Protection Engineering V35(1)*.
- Piekarska, K. 2010. Mutagenicity of airborne particulates assessed by *Salmonella* assay and the SOS chromotest in Wrocław, Poland. *Journal of the Air and Waste Management Association V60(8):993 1001*.
- Reifferscheid, G., Buchinger, S., Cao, Z., Claus, E. 2011. Identification of mutagens in freshwater sediments by the Ames-fluctuation assay using nitroreductase and acetyltransferase overproducing test strains. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 52(5):397-408. doi: 10.1002/em.20638.
- Reifferscheid, G., Maes, H.M., Allner, B., Badurova, J., Belkin, S., Bluhm, K., Brauer, F., Bressling, J., Domeneghetti, S., Elad, T., Flückiger-Isler, S., Grummt, H.J., Gürtler, R., Hecht, A., Heringa, M.B., Hollert, H., Huber, S., Kramer, M., Magdeburg, A., Ratte, H.T., Sauerborn-Klobucar, R., Sokolowski, A., Soldan, P., Smital, T., Stalter, D., Venier, P., Ziemann, C., Zipperle, J., Buchinger, S. 2012. International round-robin study on the Ames fluctuation test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53(3):185-97. doi: 10.1002/em.21677.
- Sandoval-Villasana, A.M., Pulido-Flores, G.; Monks, S.; Gordillo-Martínez, A.J.; Villegas-Villareal C.V. 2009. Evaluación fisicoquímica, microbiológica y toxicológica de la degradación ambiental del río Atoyac, México. *Interciencia* 34 (12):880-887.
- Singla, V., Pachauri, T., Satsangi, A., Kumari, K.M., Lakhani, A. 2012. Comparison of BTX profiles and their mutagenicity assessment at two sites of Agra India. *Scientific World Journal*. 2012:272853.
- Tabrez, S., Shakil, S., Urooj, M., Damanhour, G. A., Abuzenadah, A. M., Ahmad, M. 2011. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface waters: an overview of the techniques and their efficacies. *Journal of Environmental Science and Health. Part C. Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews* 29(3):250-75.
- Traversi, D., Schilirò, T., Degan, R., Pignata, C., Alessandria, L., Gilli, G. 2011. Involvement of nitro compounds in the mutagenicity of urban PM 2.5 and PM 10 in Turin. *Mutat Res* 726(1):54-9.
- Trossero, C., Caffarena, G., Hure, H., Rizzotto, M. 2006. Detección de mutagenicidad en compuestos N-Nitroso con el test de Ames. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(1):139-144.
- Watanabe, M., Ishidate, M. Jr y Nohmi, T. 1989. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutation Research* 216(4):211-220.
- Watanabe, M., Ishidate, M. Jr y Nohmi, T. 1990. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O – acetyltransferase levels. *Mutation Research* 234(5)337–348.
- Zuluaga, Q., Valencia, M. Ruíz, A. M., Ortíz, T.I.C. 2009. Efecto genotóxico y mutagénico de contaminantes atmosféricos. Facultad de Medicina Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. 28(1): 33–41..
- Wu, J.C., Chye, S. M., Shink, M.K., Chen, C.H., Yang, H. L., Chen, S.C. 2012. Genotoxicity of dicrotophos, an organophosphorous pesticide, assessed with different assays in vitro. *Environmental Toxicology* (5):307-15.

ANEXO I. CONFIRMACIÓN DE GENOTIPOS

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Agar medio mínimo de glucosa con histidina 30 mM y biotina 0.5 mM

Solución de histidina 30 mM

Disolver 0.0629 g de L-histidina en 10 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb durante 20 min. Almacenar a 4 °C en un frasco de vidrio ámbar hasta por 30 días.

Solución de biotina 0.5 mM

Disolver 0.0012 g de Biotina en 10 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb por 20 min. Almacenar en refrigeración en un frasco de vidrio color ámbar a 4 °C hasta por 30 días.

Preparar 100 ml de agar medio mínimo de glucosa (ver prueba de mutagenicidad), por duplicado en matraz Erlenmeyer (M1 y M2). Agregar a ambos matraces 0.6 ml de la solución de biotina 0.5 mM y al matraz M2 añadir 1 ml de la solución de histidina 30 mM. Mezclar y verter 30 ml de la mezcla en cada caja de Petri, rotular las cajas y almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

Agar medio completo 0.6 %

Disolver 0.3 g de agar bacteriológico y 1.25 g de caldo nutritivo Oxoid No. 2 en 50 ml de agua destilada, esterilizar la solución a 15 lb por 20 min. Esterilizar por separado 20 tubos de ensaye con tapón de rosca, enfriar a 55 ± 5 °C y adicionar a cada tubo 3 ml del agar medio completo (AMC). Almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

Agar medio completo 1.5 %

Disolver 3 g de agar bacteriológico y 5 g de caldo nutritivo Oxoid No. 2 en 200 ml de agua destilada, esterilizar a 15 lb por 20 min y dejar enfriar a 55 °C. Verter aproximadamente 30 ml en cada caja de Petri. Almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

Solución de cristal violeta al 0.1 %

Disolver 0.01 g de cristal violeta en 10 ml de agua destilada. Almacenar en refrigeración en un frasco de vidrio ámbar a 4 °C por 6 meses.

Solución de ampicilina (8 mg/ml)

Solución de hidróxido de sodio 0.02 N

Disolver 0.08 g de NaOH en 100 ml de agua destilada. Almacenar en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente. Disolver 0.08 g de ampicilina en 10 ml de hidróxido de sodio 0.02 N, agitar y esterilizar por filtración con membrana de celulosa estéril de 0.22 µm. Almacenar en refrigeración en frasco de vidrio ámbar a 4 °C hasta por 60 días.

Solución de tetraciclina (8 mg/ml)

Solución de ácido clorhídrico 0.02 N

Disolver 0.6 ml de HCl concentrado en 100 ml de agua destilada. Almacenar en frasco de vidrio ámbar, a temperatura ambiente. Disolver 0.08 g de tetraciclina en 10 ml de HCl 0.02 N, agitar y esterilizar la solución por filtración con una membrana de 0.22 µm. Almacenar en refrigeración en un frasco de vidrio ámbar a 4 °C hasta por 30 días.

Agar medio mínimo de glucosa con antibióticos

Preparar 100 ml de agar medio mínimo de glucosa (ver prueba de mutagenicidad), por duplicado en matraz Erlenmeyer (M1 = TA98 y M2 = YG1021). Agregar a ambos matraces 0.6 ml de la solución de biotina 0.5 mM, 1 ml de la solución de histidina 30 mM y 0.3 ml de ampicilina 8 mg/ml. Añadir al matraz M2, 25 µl de tetraciclina 8 mg/ml. Verter 30 ml de la mezcla en cada caja de Petri, rotular y almacenar en refrigeración a 4 °C hasta por 30 días.

METODOLOGÍA

Confirmación de genotipos.

Esta prueba se realiza cada vez que se reciben cepas nuevas o cada 6 meses de rutina en condiciones de esterilidad.

Requerimiento de Histidina.

Se realiza en cajas de Petri que contienen agar medio mínimo de glucosa con biotina (AMMG-B) y que contienen biotina-histidina (AMMG-BH).

Sembrar con un asa bacteriológica en ambas cajas por estriado lineal y paralelo, bacterias provenientes de cultivos nocturnos de las cepas TA98, YG1021 y de la cepa silvestre LT2.

Incubar las cajas de Petri a 37 ± 2 °C por un período de 24 a 48 h. La ausencia del crecimiento en las cajas que contienen únicamente biotina, confirman el requerimiento de histidina (figura 10).

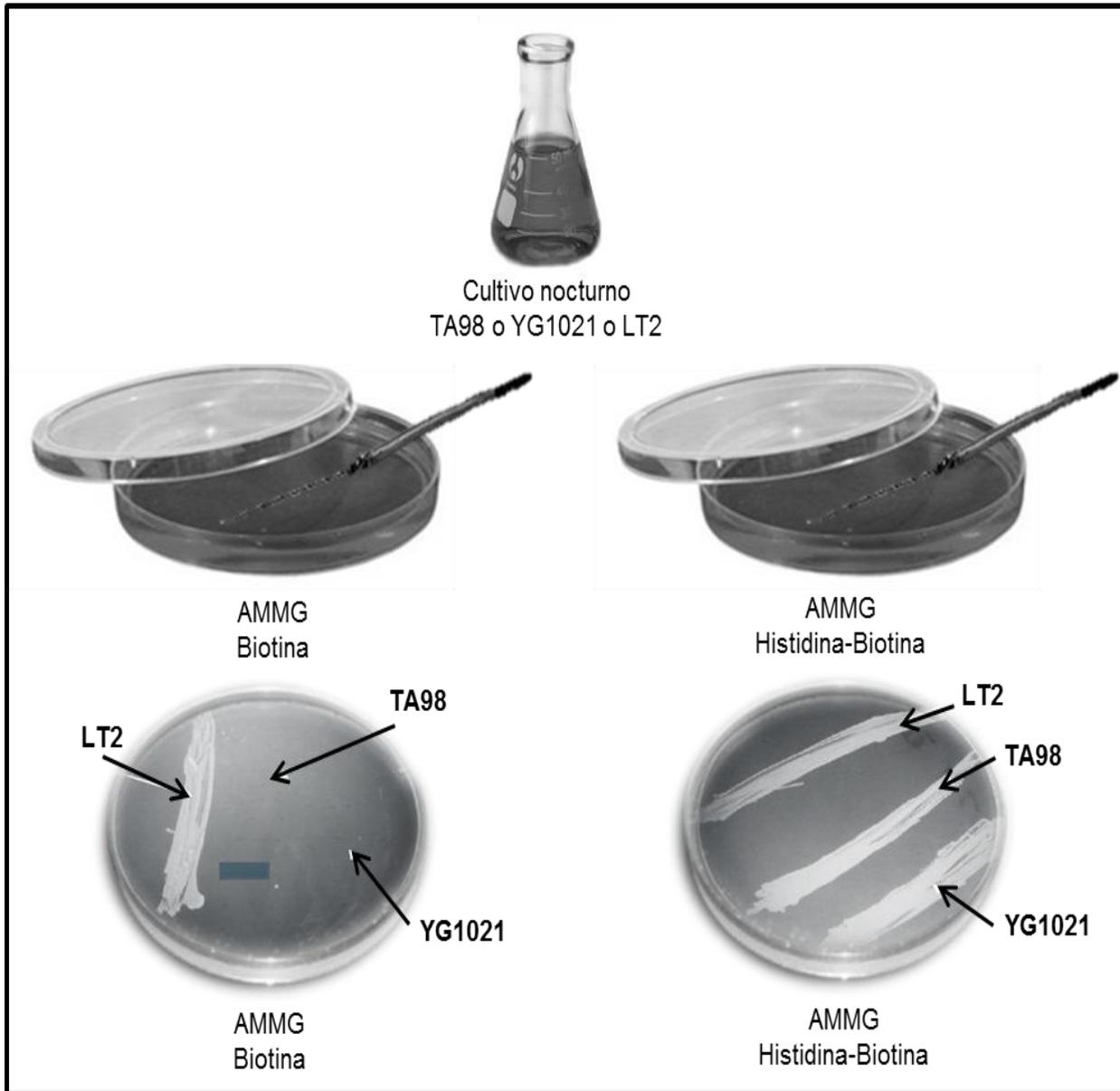


Figura 9. Confirmación de marcadores: requerimiento de histidina

Genotipo *rfa*

Introducir en autoclave los tubos de ensaye que contienen el agar con medio completo 0.6 % para su licuefacción y colocarlos en baño seco a 45 ± 2 °C.

Agregar las bacterias del cultivo nocturno a un tubo con AMC 0.6 % y agitar vigorosamente en un vórtex, verter el contenido en la caja de Petri con AMC 1.5 % y dejar solidificar.

Colocar círculos de papel filtro de 1/4 de pulgada de diámetro, previamente esterilizados, agregar 10 μ l de la solución de cristal violeta 0.1 % en el centro de cada uno de los círculos de papel filtro e incubar: La presencia de un halo de inhibición alrededor de los círculos de papel filtro con el cristal violeta, indica la presencia del genotipo *rfa* (figura 10).

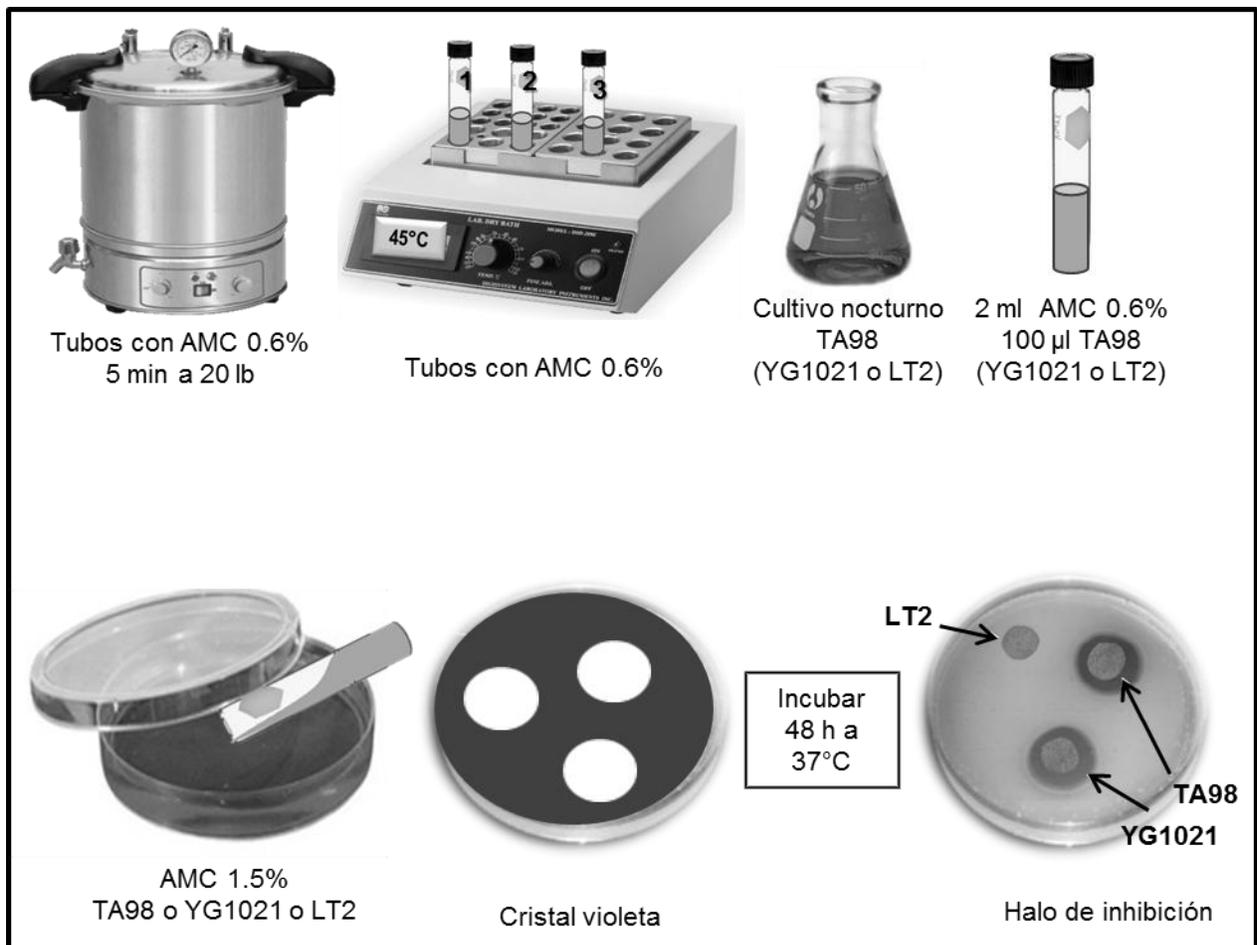


Figura 10. Confirmación de genotipos: *rfa*

Genotipo *uvrB*.

Aplicar con un asa bacteriológica por estriado lineal y paralelo, bacterias provenientes de cultivos nocturnos de las cepas TA98, YG1021 y la cepa silvestre LT2.

Destapar la caja de Petri, cubrir la mitad con papel aluminio, rotular la parte expuesta y aplicar radiación ultravioleta (UV) con una lámpara de 15 W a 33 cm de distancia, por 8 seg, tapar la caja Petri e incubar.

La ausencia de crecimiento bacterial en la parte expuesta confirma la presencia del genotipo *uvrB* (figura 11).

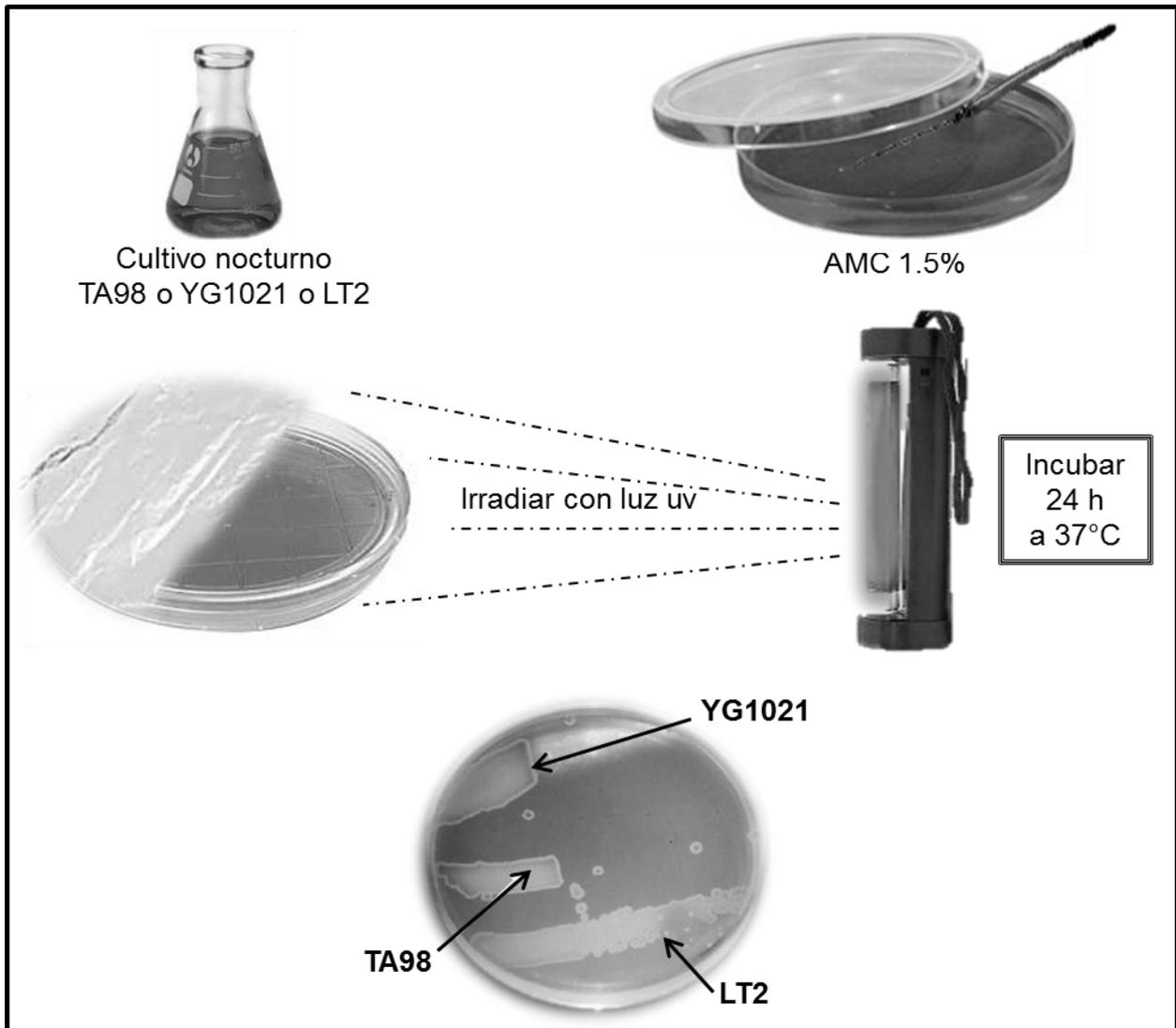


Figura 11. Confirmación de genotipo: *uvrB*

Presencia de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos (pK_M 101)

En una caja de agar medio mínimo de glucosa con ampicilina para la cepa TA98 y ampicilina-tetraciclina para la cepa YG1021, aplicar con asa bacteriológica por estriado lineal y paralelo, bacterias provenientes de cultivos nocturnos de las cepas TA98, YG1021 y de la cepa silvestre LT2.

Incubar y observar el crecimiento. El crecimiento bacterial confirma la presencia del plásmido (pK_M 101), que confiere resistencia a antibióticos (figura 12).

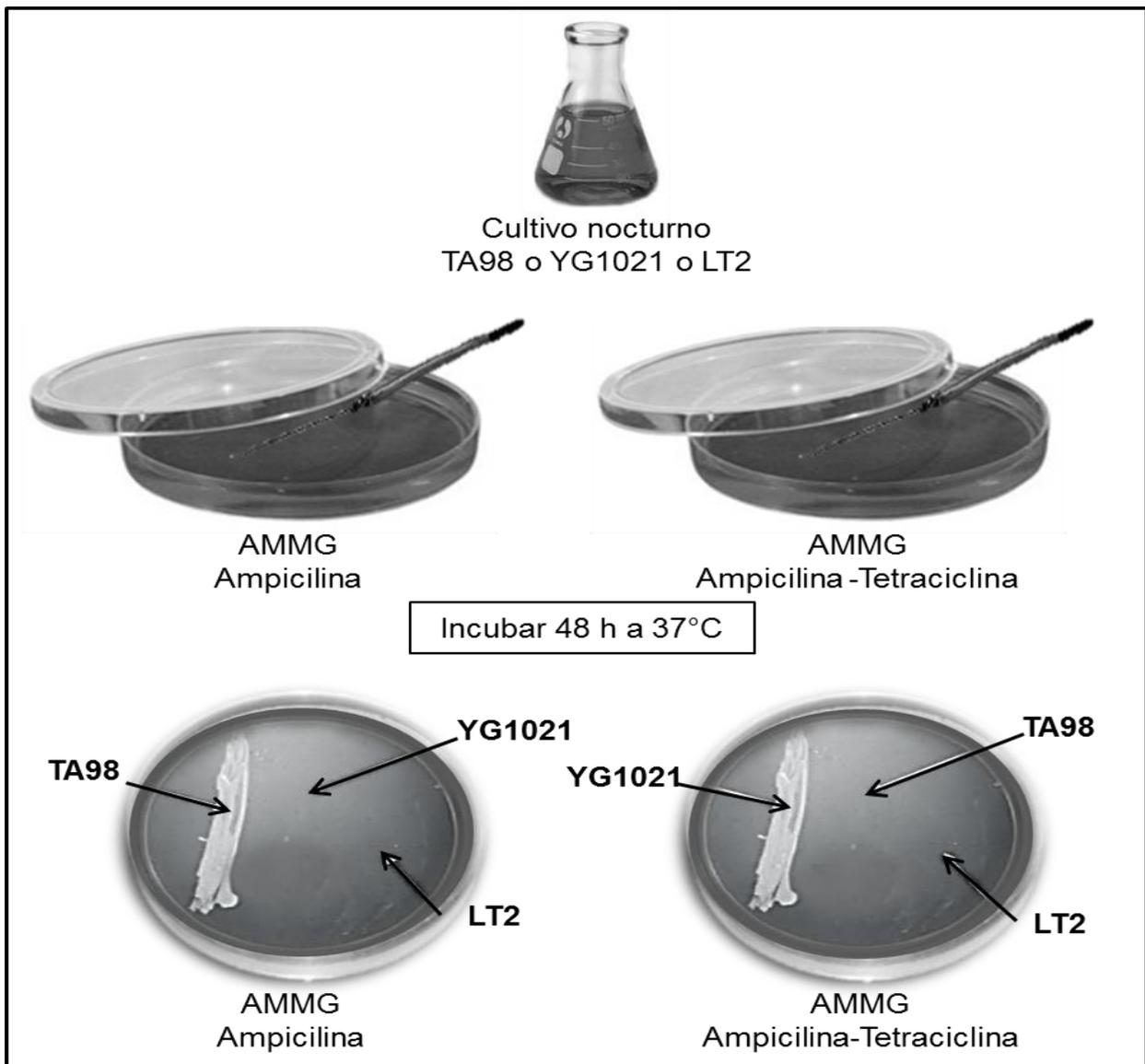


Figura 12. Confirmación de marcadores: resistencia a antibióticos

ANEXO II. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas de *Salmonella typhimurium* construidas por ingeniería genética son susceptibles a los cambios de temperatura y pueden perder total o parcialmente los marcadores fenotípicos. Los métodos de conservación de las cepas más eficaces lo constituyen la liofilización y la congelación a -80°C . Un método alternativo es mediante la conservación de la cepa en cajas de Petri con agar para reserva en caja y mantenerlas a temperatura ambiente por un periodo máximo de 30 días para la cepa YG1021 y hasta dos meses para la cepa TA98.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Agar medio completo 1.5 % con cloruro de sodio al 0.5 %

Disolver los siguientes reactivos en 300 ml de agua destilada:

- 2.4 g de caldo Oxoid No. 2
- 1.5 g de NaCl
- 4.6 g de agar bacteriológico

Esterilizar a 15 lb durante 20 min y verter en cajas de Petri. Mezclar y verter aproximadamente 30 ml de la mezcla en cada caja de Petri. Almacenar las cajas en refrigeración a 4°C hasta por 30 días.

METODOLOGÍA

En tres cajas de Petri con agar para reserva, sembrar por estría un inóculo proveniente del cultivo nocturno de la cepa TA98.

En tres cajas de Petri con agar para reserva, sembrar por estría un inóculo proveniente del cultivo nocturno de la cepa YG1021.

Incubar a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por un período de 48 a 66 h, revisar el crecimiento de la cepa. Guardar a temperatura ambiente y protegidas de la luz. De esta manera se conservan por 30 días la cepa YG1021 y hasta por 2 meses la cepa TA98.

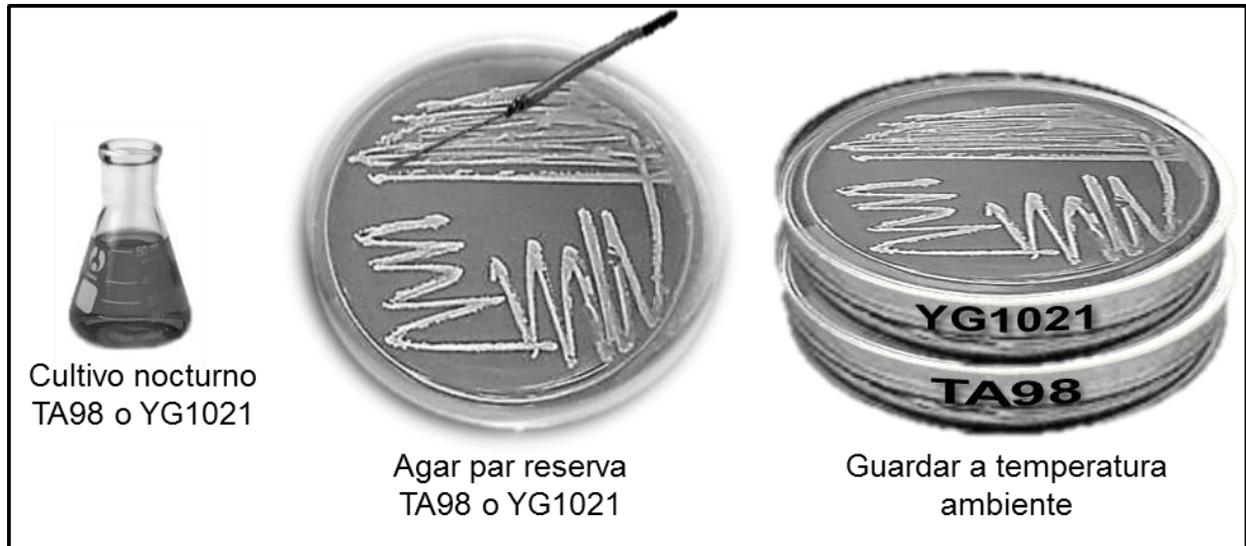


Figura 13. Conservación de las cepas de Salmonella: YG1021 y TA98

ANEXO III. FORMATO DE REPORTE

PRUEBA DE MUTAGENICIDAD POR INCORPORACIÓN EN PLACA CON <i>Salmonella typhimurium</i>				Muestra:			
				Fecha de muestreo:			
				Experimento No.			
				Fecha:			
No.	Concentración (µg/caja)	Bacteria (µl)	Muestra (µl)	R ₁	R ₂	R ₃	R _{prom}
REALIZÓ:				Vo.Bo.:			

PRUEBA DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN SOMÁTICA EN LAS ALAS DE *Drosophila melanogaster*

Raquel Ortíz Marttelo

Laboratorio de Mutagénesis y Química Ambiental

INTRODUCCIÓN

El uso de organismos en condiciones controladas ofrece múltiples ventajas en estudios de toxicología genética, uno de ellos es *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), un insecto díptero que ha resultado ser uno de los más sensibles y de más amplio alcance en la detección de daño genético inducido, debido a que detecta efectos a nivel somático (carcinogénesis), germinal (mutagénesis) y/o a lo largo del desarrollo embrionario (teratogénesis), además de detectar cambios desde una sola base nitrogenada, hasta aberraciones cromosómicas. Por otra parte, este bioindicador posee un paquete enzimático semejante al del hígado de mamífero, el citocromo P450, con el cual es posible evaluar los efectos genotóxicos directos e indirectos en sistemas *in vivo*; de igual manera, se utiliza como biomonitor de contaminantes ambientales (Gaytán, 2006).

Drosophila melanogaster es un díptero que presenta dimorfismo sexual en la etapa adulta, el macho es ligeramente más pequeño que la hembra, presenta un par de peines sexuales en el primer par de patas y en la región dorsal se observan los últimos terguitos fusionados; la hembra es más grande, no presenta peines sexuales y su abdomen es bandeado (figura 1).

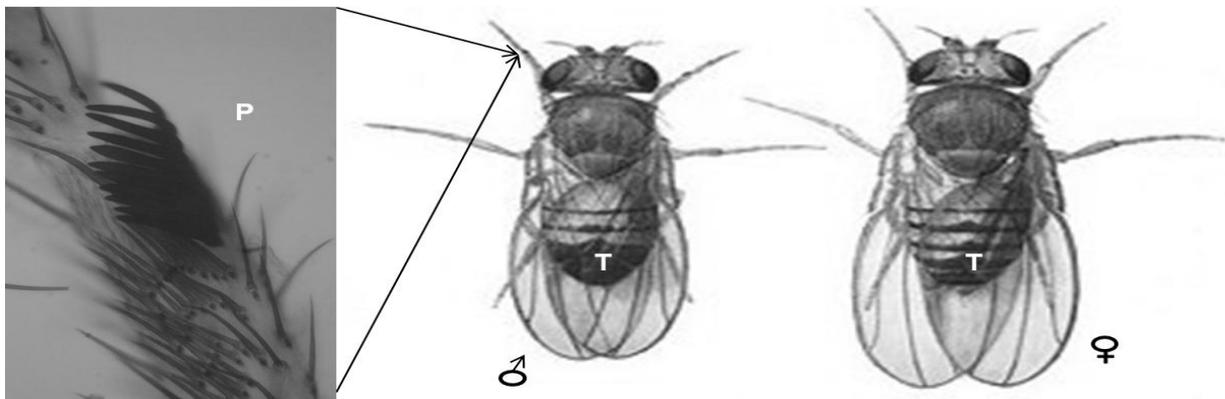


Figura 1. *Drosophila melanogaster*, macho (izquierda) y hembra (derecha).
P) Peines sexuales, T) Terguitos.

El uso de *Drosophila melanogaster* como sistema de prueba presenta diversas ventajas, es fácil de mantener en espacios reducidos, tiene cuatro cromosomas bien mapeados, se dispone de gran número de cepas específicas con marcadores genéticos adecuados, que permiten detectar *in vivo* diversos tipos de mutaciones en células germinales y somáticas (Graf *et al.*, 1984). El ciclo de vida es corto, por lo que se puede obtener una gran cantidad de progenie en poco tiempo.

El ciclo de vida es de 10 días a 25 °C y 60 % de humedad relativa, y consta de huevo y larva en tres estadios. A las 24 h de iniciado el ciclo emergen las larvas de primer estadio, que son las más pequeñas; a las 48 h se denominan larvas de segundo estadio, éstas son las que se utilizan en experimentos combinados de 24 h de exposición y 48 h de recuperación; y a las 72 h de edad las larvas son de tercer estadio y tienen el tamaño óptimo para manejarlas sin problemas, es en ésta etapa donde más se utilizan para la evaluación de contaminantes, aprovechando la gran necesidad de alimentarse para obtener las reservas de grasa y energía a fin de mantenerse vivas, secretar la pupa, la cual se forma a las 120 h del ciclo, y finalmente realizar la metamorfosis y emerger como adulto a las 240 h (figura 2).

Con este organismo es posible evaluar diversos daños al DNA a través de técnicas como la prueba de mutación y recombinación somáticas (SMART, por sus siglas en inglés), (Graf *et al.*, 1984). Esta técnica aprovecha la existencia de marcadores genéticos para analizar clones celulares que se expresan en forma de manchas tanto en los ojos como en las alas; asimismo, detecta el daño inducido por un amplio espectro de sustancias como hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus dinitroderivados (Delgado *et al.*, 1995), orto y para-fenilenediamina (Dueñas *et al.*, 2000), varias anisidinas (Rodríguez y Ordaz, 2002); además se ha utilizado como biomonitor de ambientes contaminados, aire (Delgado *et al.*, 1999; Amador *et al.*, 2001), agua (Pimienta *et al.*, 2008; Askin e Incekara, 2010) y sedimento (Popoca, 2001).

La prueba SMART en *Drosophila* presenta dos variantes, el ensayo con células somáticas de ojos y el ensayo con células somáticas de alas. Ambas se basan en el principio de que la pérdida de heterocigocidad de marcadores genéticos, en las células de los discos imagales de las larvas, origina la formación de clones celulares, los cuales se expresan como manchas en los ojos o en las alas de las moscas adultas. Con este

propósito se realizan cruzamientos con moscas que portan mutaciones recesivas, para así obtener progenie heterocigótica en cuanto a los marcadores seleccionados, las larvas obtenidas son tratadas crónicamente o en forma aguda con los compuestos a evaluar, y después de la eclosión se analizan las moscas adultas para identificar manchas en ojos o alas (Graf *et al.*, 1984).

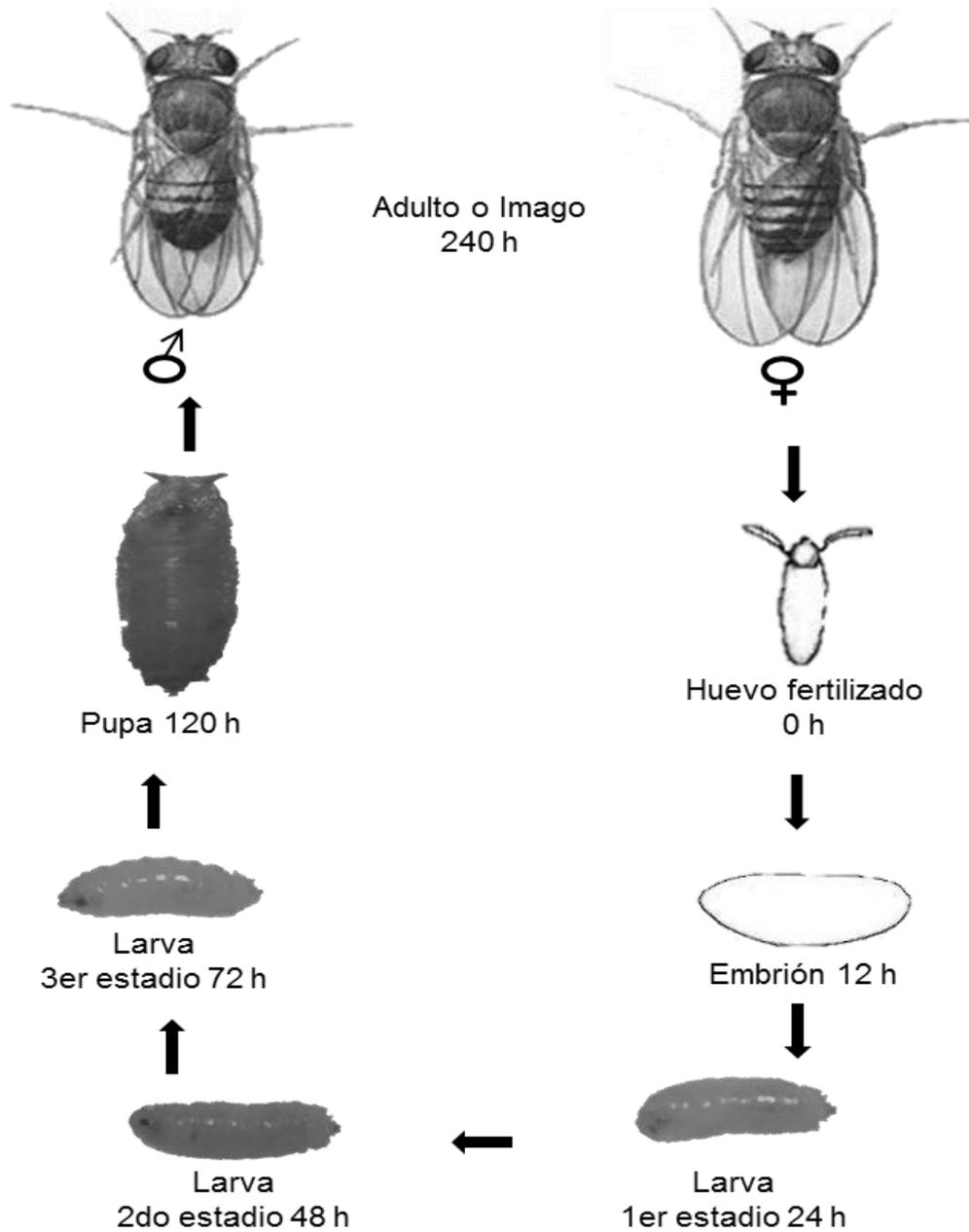


Figura 2. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

Con esta técnica se evalúan compuestos tanto de acción directa como aquellos que requieren ser metabolizados para que se exprese el daño. El método consiste en realizar dos cruzas, una estándar (E) y otra con una bioactivación elevada (BE). Las larvas que se obtienen de esta cruce poseen un elevado nivel de citocromo P-450, lo que facilita la detección de los promutágenos y cancerígenos (Graf y Van Schaik, 1992).

Líneas de *Drosophila melanogaster*

Para la prueba SMART en las alas de *Drosophila melanogaster* se emplean tres líneas progenitoras, las cuales se caracterizan por presentar mutaciones que alteran la diferenciación final de las células que dan origen a los tricomas o pelos:

- a) mwh/mwh
- b) flr³/TM3, Bd^S
- c) ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; flr³/TM3, Bd^S

Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos empleados en el ensayo de células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster* modifican el fenotipo normal de los tricomas presentes en ellas por medio de distintos mecanismos, como varios tipos de mutación (puntual, delección, translocación), recombinación mitótica y pérdida cromosómica (Graf *et al.*, 1984).

mwh (pelos múltiples en el ala).

Se localiza en el cromosoma 3 a 0.0 unidades de mapa. En el fenotipo se distingue por ser una alteración en la cantidad de tricomas en las células de las alas de los adultos, ya que se presentan de 3 hasta 11 pelos de igual o diferente tamaño, en lugar de uno por célula como en el fenotipo silvestre (Lindsey y Zimm, 1985) (figura 3).

flr³/TM3, Bd^S (pelos en forma de flama).

Se localiza en el cromosoma 3 a 39 unidades de mapa, los tricomas se observan fenotípicamente en forma de flama, en el tórax, el abdomen y las alas. En condición homocigótica es letal y para el mantenimiento de esta línea se requiere la presencia de

un cromosoma balanceador, TM3 (tercer múltiple de 3), el cual tiene una inversión pericéntrica en gran parte del cromosoma 3, por lo que se evita la recombinación entre los cromosomas homólogos; además posee el marcador serratia (Bd^S), que es dominante y permite reconocer a los individuos portadores de la inversión, debido a que las alas presentan bordes discontinuos. El uso de este balanceador (TM3) permite recobrar en cada generación individuos heterocigóticos, tanto para flr como para serratia, ya que este último también es letal en condición heterocigótica (figura 4).

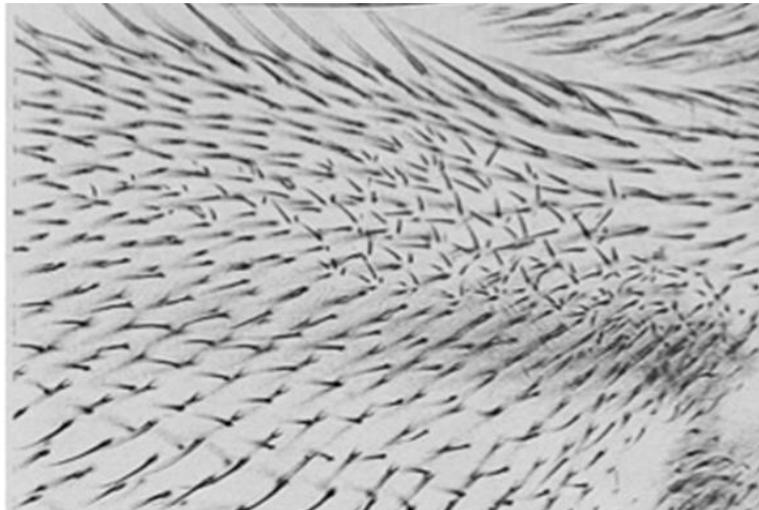


Figura 3. Mancha del fenotipo mwh.



Figura 4. Mancha del fenotipo flr.

ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; flr³/TM3, Bd^S.

ORR1 y ORR2 son el primero y segundo cromosomas de la línea Oregon R (R), la cual es resistente al insecticida DDT y muestra alta actividad metabólica, en particular frente a las reacciones dependientes del complejo microsómico P-450 (Frolich y Wurgler, 1990). El incremento metabólico se debe al gen R1, ubicado en el cromosoma 2 a 65.0 unidades de mapa; así, esta línea se caracteriza por la sustitución de los cromosomas 1 y 2 de las líneas originales flr³/TM3, Bd^S por los de la línea Oregon R (R).

OBJETIVO

Analizar el daño genético inducido por sustancias químicas o muestras ambientales de aire, agua o sedimentos, en células somáticas de las alas de *Drosophila melanogaster*.

EQUIPO

Agitador de tubos tipo vortex
Balanza analítica
Balanza granataria
Campana de extracción de humos
Centrífuga
Contador de células
Estufa de gas
Estufa de cultivo calibrada a 25 °C
Horno de secado
Microscopio estereoscópico
Microscopio óptico de campo claro
Placa térmica con intervalo de temperatura de 30 a 60 °C
Placa de calentamiento con agitación
Baño para ultrasonido
Refrigerador
Ultracongelador

MATERIAL

Barniz de uñas transparente
Cajas para preparaciones
Coladera de acero inoxidable
Cubreobjetos
Espátula
Etiquetas adhesivas
Frasco de plástico con tapa, para anestesiar a las moscas
Frasco ámbar con gotero
Frascos de vidrio, boca ancha de 250 ml
Gasa fina
Guantes desechables
Ligas de hule
Microespátula con extremo de cuchara
Micropipetas de volumen variable de 50 μ l hasta 5 ml
Papel absorbente
Pesas de metal de 2 x 1.4 cm y 37 g y de 5 x 3.1 cm y 197 g
Pincel de cerdas suaves del número 00
Pinzas de relojero INOX No. 5
Pipeta graduada de 10 ml
Película autoadherible Kleen pack
Porta objetos
Portaobjetos excavados
Probetas de 1 000 y 50 ml
Puntas para micropipeta
Recipiente de peltre de 2 L
Rectángulos de vidrio de 10 x 7 x 0.5 cm
Tapones de hule espuma
Tubos viales de vidrio, fondo plano de 5 ml, con rosca
Tubos viales de vidrio, fondo plano de 30 ml, sin rosca
Vasos de precipitados de 1 000, 600 y 250 ml

REACTIVOS

Nombre	No. de catálogo	Marca	Grado
Ácido propiónico	N13644	J.T. BAKER	Reactivo
Agar bacteriológico	5238883	BIOXON	Reactivo
Alcohol etílico absoluto	V41C51	BAKER	Reactivo
Alcohol al 96°		E. R. Tlax	Industrial
Azúcar estándar			Alimenticio
Eter etílico anhidro	X03C01	J.T. BAKER	Reactivo
Extrán neutro	1266	EM CIENCE	Reactivo
Goma arábiga		Droguería	Reactivo
Glicerina		DROGUERÍA	Reactivo
Harina de Maíz		MINSA	Alimenticio
Hidrato de Cloral	C8383	SIGMA	Reactivo
Levadura de cerveza		DROGUERÍA	Alimenticio
Levadura fresca		FLORIDA	Alimenticio
Medio instantáneo F-24		CAROLINA BIO- LOGY SUPPLY	
Nipagín simple		DROGUERÍA	Reactivo
Tween 80	93781	FLUKA	Reactivo

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Medio de cultivo básico para mantenimiento de *Drosophila melanogaster***

En un vaso de precipitados de 1 000 ml, colocar 870 ml de agua y añadir 112 g de harina de maíz (MINSA), con la espátula mezclar perfectamente, luego incorporar 55 g de levadura de cerveza y continuar agitando hasta obtener una mezcla homogénea.

En un recipiente de peltre de 2 L colocar 380 ml de agua, 7 g de agar bacteriológico y 70 g de azúcar, previamente mezclados en seco, calentar a fuego alto, mezclando constantemente. Al alcanzarse el punto de ebullición (aproximadamente 90 °C), se adicionan 0.4 g de nipagín y se continúa agitando hasta que éste se disuelva. Cuando esto sucede se añade la mezcla de harina y levadura, agitando ininterrumpidamente y

al iniciarse la ebullición (88 °C) se disminuye el fuego y se deja así de 15 a 18 min. Pasado este tiempo se retira del fuego y se añaden 4 ml de ácido propiónico, se mezcla perfectamente.

En frascos de vidrio de 250 ml de boca ancha se vierten 30 ml de este medio, se tapan con tapones de hule espuma y se deja enfriar a temperatura ambiente 24 h antes de utilizarse.

Medio para aislamiento

Se trata del mismo medio de cultivo básico para mantenimiento de *Drosophila melanogaster*, la diferencia es que sólo se vierten 10 ml de medio en cada frasco.

Medio de cultivo a base de agar y levadura

Base de agar bacteriológico

En un recipiente metálico agregar 250 ml de agua purificada y 12.5 ml de agar bacteriológico previamente medido en una probeta (v/v). Se calienta a fuego alto (mezclar constantemente), y cuando se alcance el punto de ebullición (92 °C), disminuir el fuego y se deja en ese estado de 2 a 3 min.

Retirar del fuego e inmediatamente vaciar 10 ml en frascos de vidrio de 250 ml, los frascos se tapan con película autoadherible, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se guardan en el refrigerador por un máximo de un mes.

Capa de levadura

En un vaso de precipitados, con una espátula se pulverizan 200 g de levadura (1 barra), se añaden 10 ml de agua purificada tibia (aprox. 30 °C) y se mezcla con cuidado, se tapa con una gasa y se coloca en baño María durante 30 a 45 min.

Posteriormente, se agrega una cucharadita de azúcar (3 g) y se agita vigorosamente; cuando se obtiene una consistencia líquida, inmediatamente se vierten 20 ml en los frascos que contienen la base de agar. Se tapan con papel absorbente y una liga, y se dejan enfriar a temperatura ambiente durante 24 h antes de utilizarse.

NOTA: Estos frascos se denominan frascos de sincronización

Medio de montaje (solución Fauré)

En un vaso de precipitados de 250 ml se hidratan 30 g de goma arábica con 50 ml de agua destilada, este recipiente se introduce en un vaso de 500 ml y se colocan en baño María, a fuego medio, agitando constantemente con una varilla de vidrio. Cuando los grumos desaparecen, se agregan 20 ml de glicerina y se continúa con la agitación, posteriormente se incorporan 50 g de hidrato de cloral, y después de 2 a 3 min se retira del fuego.

La solución se deja enfriar y se vacía en un frasco ámbar con tapa, se etiqueta y se almacena a temperatura ambiente, el tiempo máximo de utilización es de tres meses.

METODOLOGÍA

Cruzamientos (moscas progenitoras)

Para llevar a cabo la técnica de SMART en alas de *Drosophila* se requiere realizar dos cruza; una estándar (E), la cual se realiza con hembras $flr^3/TM3, Bd^S$ y machos mwh/mwh ; y otra de bioactivación elevada (BE); entre hembras $ORR1/ORR1; flr^3/TM3, Bd^S$ y machos mwh/mwh (figura 5).

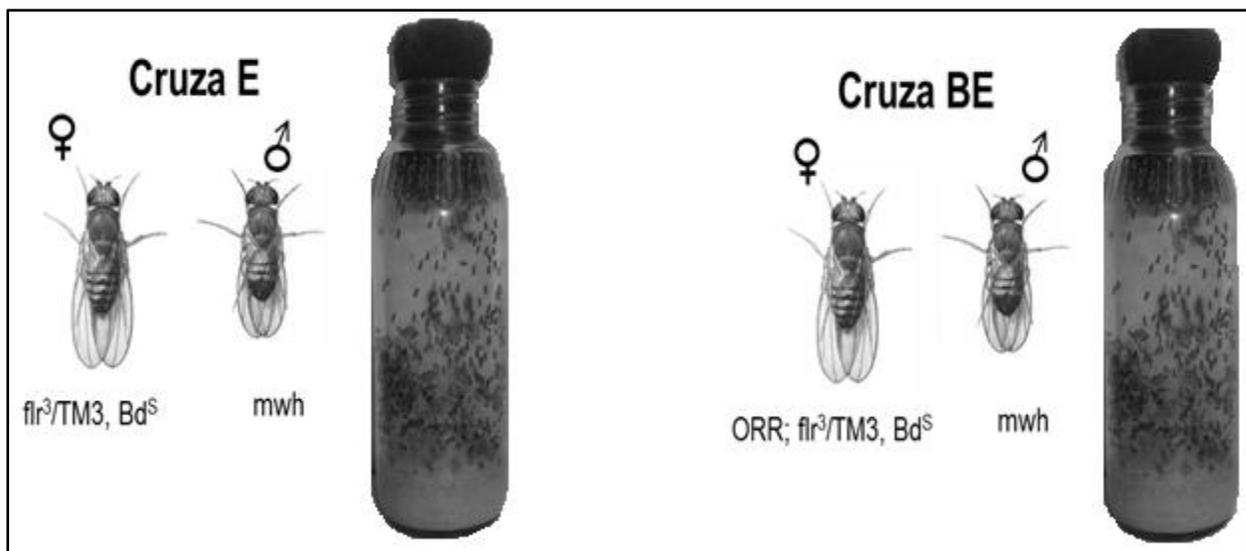


Figura 5. Cruzas E y BE

El primer paso para hacer la cruce es el aislamiento de hembras vírgenes (que aún no han sido fecundadas) de las líneas arriba mencionadas. Para ello se separan de los machos, basándose en las características de cada sexo (peines, terguitos y abdomen; las moscas recién nacidas son blancas). Los organismos se anestesian con éter y se identifican en un microscopio estereoscópico (figura 6). El aislamiento se realiza al menos dos veces al día, aproximadamente cada 3 h durante tres días; una vez separadas las hembras, se colocan en frascos con medio para aislamiento. Los frascos con las hembras aisladas se guardan en un cuarto de cultivo a 25 °C y 60 % de humedad.

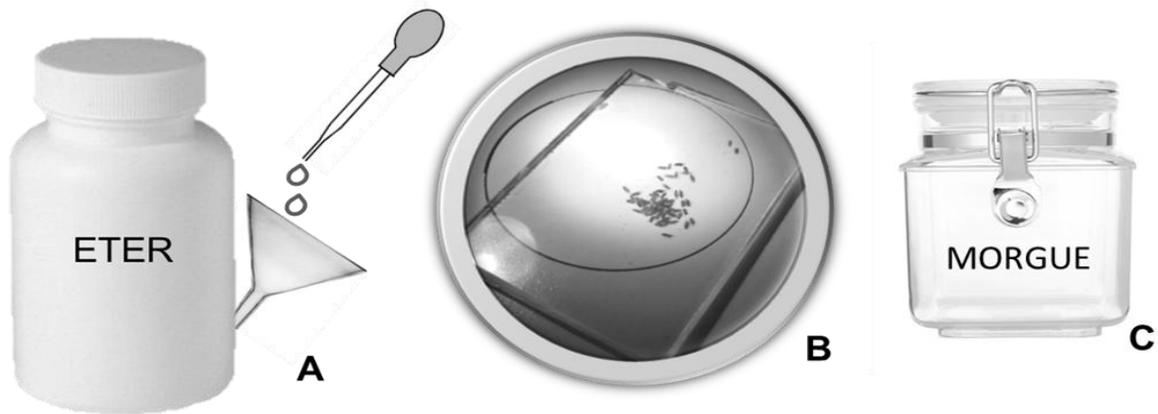


Figura 6. Aislamiento de hembras vírgenes. A) frasco anestesiador con éter; B) drosófilas anestesiadas; C) morgue

En el cuarto día, se aíslan los machos de la línea progenitora mwh y se colocan directamente en los frascos con medio de cultivo básico, previamente rotulados con las siglas de la cruce, la fecha y el número de frasco. A continuación, se introducen las hembras vírgenes en una proporción de dos hembras por cada macho. Lo anterior se realiza con las dos líneas progenitoras de hembras (flr y ORR), y se dejan reposar por 24 h.

NOTAS: Las moscas nacidas por la noche se matan para evitar la presencia de hembras fecundadas.

Los organismos no utilizados se desechan en la morgue (frasco de plástico con solución jabonosa).

Sincronización de larvas

A las 24 h de haber realizado las cruzas, tiempo en el cual las hembras ya han sido fecundadas, se lleva a cabo la colecta de huevos y de esta manera obtener individuos con poca variación de edad, para tal efecto se trasladan los organismos de los frascos de las cruzas progenitoras a los frascos de sincronización, los cuales se colocan en una estufa de cultivo a 25 °C durante 8 h (con el fin de que las hembras ovipositen). Al término de este tiempo, se regresan a su frasco de crusa original, ambos frascos (cruza y sincronización) se guardan en una estufa de cultivo hasta que se vuelvan a ocupar (figura 7). Los frascos de sincronización se utilizan a las 72 h después de retirar los organismos, tiempo en el cual los huevos han alcanzado el tercer estadio larvario.

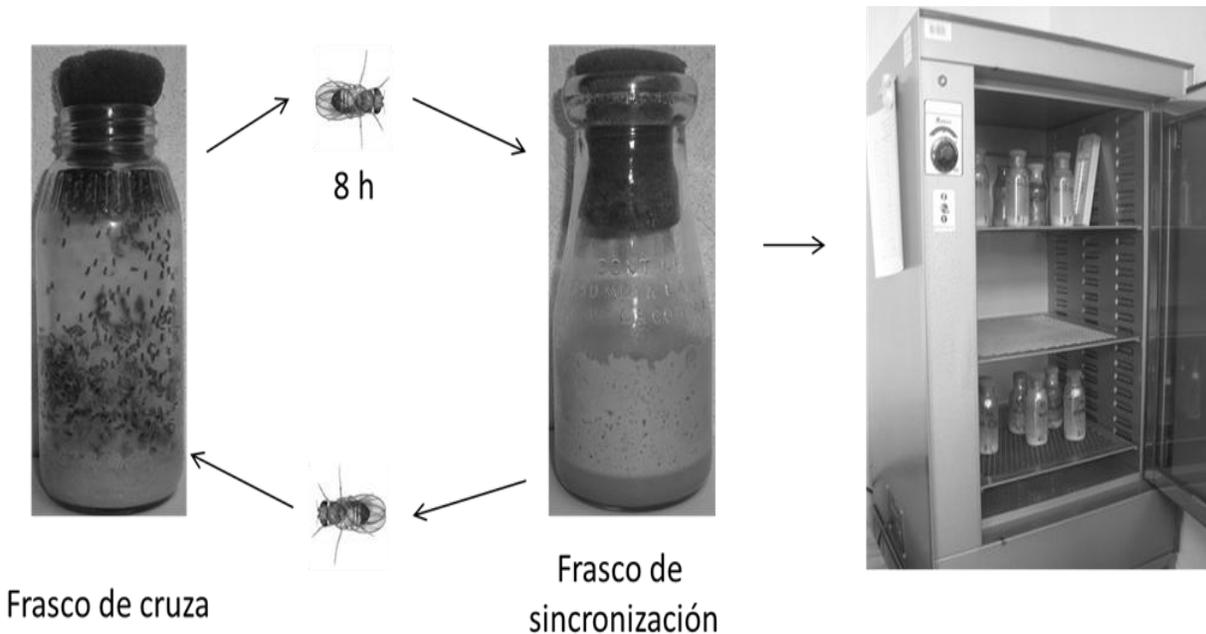


Figura 7. Cruzas en sincronización

NOTAS: Las cruzas se pueden someter a este procedimiento tres o cuatro días consecutivos, posteriormente se eliminan.

Se realizan de seis a ocho frascos de sincronización.

En cada frasco de sincronización se obtiene una cantidad de larvas suficiente para realizar una serie de experimentos con tres réplicas.

Exposición

La exposición se realiza con larvas de *Drosophila melanogaster* de 72 h de edad (tercer estadio) que son alimentadas crónicamente por 48 h hasta concluir su desarrollo larvario. Las larvas se recuperan del medio vaciando el contenido del frasco de sincronización en una coladera de acero inoxidable de poro fino, se lavan con agua de la llave para eliminar los residuos de levadura; finalmente, se enjuaga con agua destilada. Con una cucharilla se transfieren aproximadamente 100 larvas a viales que contienen 1.5 g de medio instantáneo, hidratado con 5 ml del compuesto a evaluar. Se utilizan tres concentraciones como mínimo, un testigo positivo y uno negativo. Una vez que emergen los adultos, se colectan en frascos viales con tapa de rosca y se fijan en alcohol etílico al 70 % (figura 8).

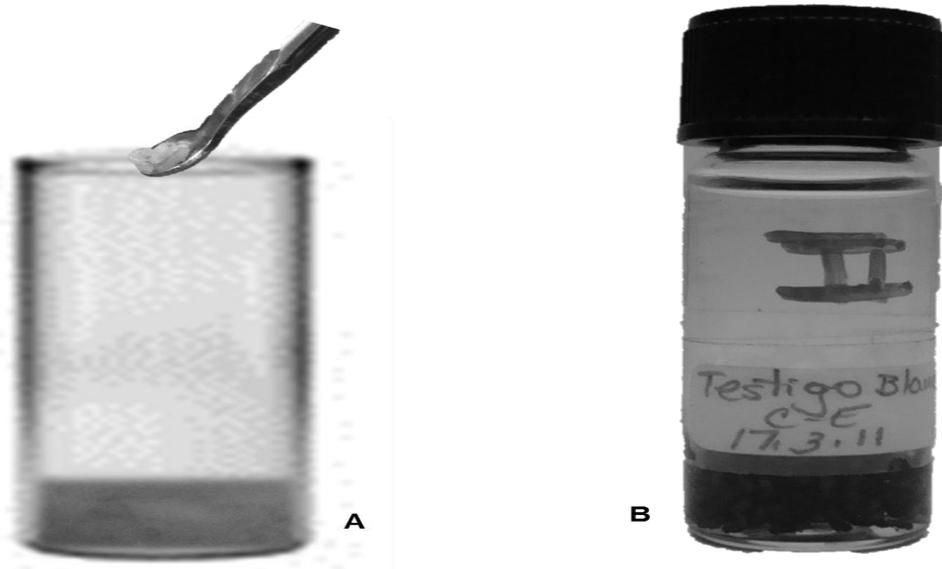


Figura 8. A) Exposición de larvas, B) adultos conservados en etanol al 70 %.

Elaboración de preparaciones semipermanentes

Las moscas conservadas en alcohol al 70 % se vacían en un vaso de precipitado de 50 ml de capacidad, y se preparan dos vasos con 20 ml de agua destilada. Con las pinzas de relojero y en el microscopio estereoscópico, se separan 30 hembras y 30 machos

con alas enteras y se colocan en los vasos antes preparados. Las moscas de alas discontinuas se regresan al frasco original; si es necesario, se les añade más alcohol al 70%.

En un portaobjetos excavado se colocan dos gotas de solución Fauré, en la cual se introducen de uno en uno los organismos seleccionados y con unas pinzas de relojero se separan cada par de alas, las cuales se van acomodando en un portaobjetos, formando 4 filas y 10 columnas.

Las alas se colocan por pares cuidando que en las dos primeras líneas estén las alas de 10 hembras y en los siguientes dos, las de 10 machos. Asimismo, la parte angosta del ala siempre se coloca hacia abajo, la región A del ala a la izquierda, con la misma separación entre cada una de las alas, dejando espacio del lado izquierdo para la etiqueta (figura 9). Se realizan como mínimo tres preparaciones por concentración.

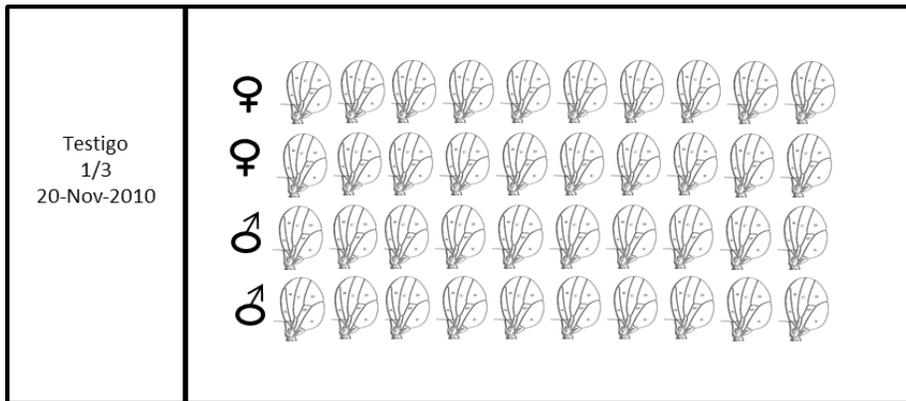


Figura 9. Preparaciones semipermanentes.

Una vez efectuado lo anterior, se coloca un cubreobjetos al cual se le agrega una gota de solución Fauré. Las preparaciones se acomodan sobre una placa térmica a 40 °C, y se presionan con una pesa de 37 g y una de 197 g; se dejan prensadas al menos 48 h.

Al secarse, se limpian los bordes del cubreobjetos, y se sella con barniz de uñas transparente, luego se dejan secar las preparaciones y se guardan en una caja para portaobjetos.

Análisis al microscopio

Las alas se observan en un microscopio óptico a un aumento de 40 X, las manchas se registran de acuerdo a la sección del ala en la que se localizan (figura 10), el número de células que las forman y los fenotipos que las constituyen, sencillas (mwh o flr³) o gemelas (mwh y flr³ en zonas adyacentes).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos son evaluados por medio de la prueba de X^2 de proporciones con la corrección de Yates y el programa de computo SMART versión PC de Frei y Wurgler (1995). Las frecuencias de manchas por alas se evalúan empleando el procedimiento de decisión múltiple, lo que permite concluir cuando se trata de un resultado claramente positivo, es débil positivo, indeciso, o negativo.

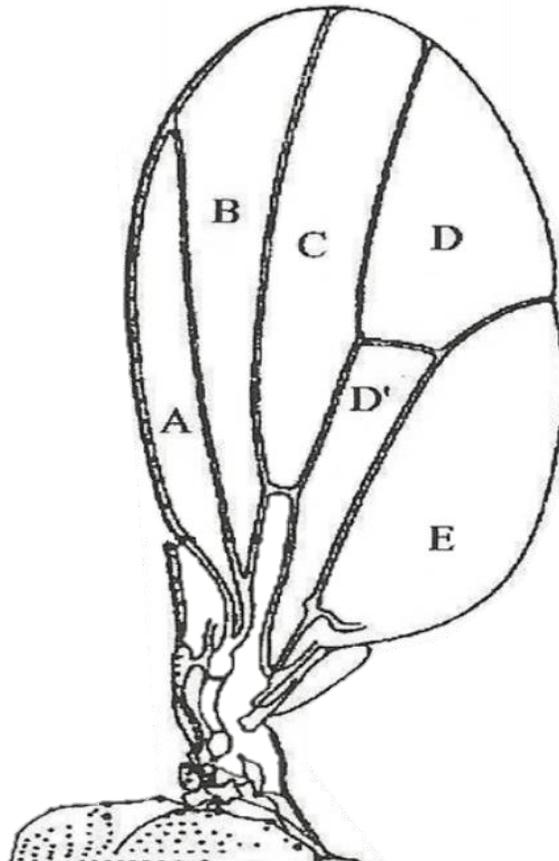


Figura 10. Secciones del ala de *Drosophila melanogaster*

LITERATURA

- Amador, M. O., Delgado, R. A., Villalobos, P. R., Munive, C. Z., Ortíz, M. R., Díaz, G. G., Bravo, C. J. L., Gómez, A. S. 2001. Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suroeste de la Ciudad de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 17 (4): 193-204.
- Askin, H. y Incekara, U. 2010. The study of the genotoxic effect of the Karasu River surface water containing local fat plant waste water on the *Drosophila melanogaster* using the Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). *Ekoloji* 19, 74, 45-50.
- Delgado, R. A., Ortíz, M. R., Graf, U., Villalobos, P. R., Gómez, A. S. 1995. Genotoxicity activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 341: 235-247.
- Delgado, R. A., Ortíz, M. R., Villalobos, P. R., Gómez, A. S., Graf, U. 1999. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatics cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere* 39 (1): 33-43.
- Dueñas, I. E., Rangel, Y. G. E., Graf, U., Frei, H., Rosales, A., Castañeda, P. L., Heres, M. E. 2000. Evaluación del efecto genotóxico de orto y parafenienediamina en *Drosophila melanogaster*. Utilizando la prueba SMART. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Vol. 2, edición especial, Genética y Biomedicina Molecular.
- Frei, H. y Wurgler, F. E. 1995. Optimal experimental design and simple size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 334: 247-258
- Frolich, A. y Wurgler, F. E. 1990. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. *Mutation Research*. 216: 179-187.
- Gaytán, O., J. C. 2006 Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera. Tesis de Doctorado. UAEH. 82 p.
- Graf, U., Würigler, F., Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C., Kale, P. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* 6:153-188.
- Graf, U., y Van, Schaik, N. 1992. Improved High bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*. 289: 59-67.
- Lindsey, D.L. y Zimm, G. 1985. The genome of *Drosophila melanogaster*. Parte I: genes A-K. DIS. Academic Press, Inc. USA.
- Pimienta, V. M. S. D., Nepomuceno J.C., Pavanin L.A. 2008. Genotoxicity of water from the Paraguay River near Caceres-MT, Brazil in the *Drosophila* wing spot test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49, 458-466.
- Popoca, C. M. A. 2001. Actividad mutagénica de compuestos orgánicos asociados a sedimentos del Río Zahuapan, mediante el empleo de *Drosophila melanogaster*. Tesis de licenciatura. BUAP.
- Rodríguez, A. R. y Ordaz, T. M. G. 2002. Structure activity relationships of several anisidine and dibenzanthracene isomers in the w/w⁺ somatic assay of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514: 193-200.

ANEXO 1. MANTENIMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LÍNEAS DE *Drosophila melanogaster*

Se cuenta con tres líneas progenitoras:

- 1) mwh/mwh
- 2) flr³/TM3, Bd^S
- 3) ORR1/ORR1; ORR2/ORR2; flr³/TM3, Bd^S

Las líneas progenitoras se mantienen en cultivo en frascos con medio básico, se colocan al menos 60 parejas de organismos en cada frasco. A los 5 días se retiran del frasco con medio de cultivo, 5 días después se realiza una nueva siembra con organismos nuevos.

Los frascos con los organismos se mantienen en un cuarto de cultivo con condiciones controladas a 25 °C y 60 % de humedad relativa.

Se preparan 24 frascos por cada línea.

Los organismos no utilizados se matan en la morgue (frasco con solución saturada de jabón).

ENSAYO DE GENOTOXICIDAD: MICRONÚCLEOS

Libertad Juárez Santacruz

Laboratorio de Toxicología Ambiental

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se realizan bioensayos con organismos de los diferentes niveles tróficos de la cadena alimentaria; éstas pruebas de toxicidad consisten en exponer organismos de prueba directamente a una matriz ambiental (agua, suelo o sedimento) contaminada para determinar los efectos tóxicos y la biodisponibilidad de los contaminantes presentes en el ambiente. Los organismos utilizados como sistema de prueba deben tener características específicas: fácil de obtener o cultivar, abundantes durante todo el año, sensibilidad conocida a los tóxicos, además los resultados obtenidos deben ser repetibles. Entre los organismos más empleados se encuentran bacterias, hongos, protistas, algas, plantas vasculares, lombrices de tierra, peces, ranas y mamíferos como ratones, ratas, cobayos y conejos, entre otros (Iannacone *et al.*, 1998; Carballo *et al.*, 2010).

En términos generales, un bioensayo es una prueba útil para determinar la naturaleza y la magnitud de los efectos que producirá un agente dado cuando un organismo o sistema biológico es expuesto a él. Entre los efectos de particular importancia están los de naturaleza genética (clastogénicos, mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos), que se pueden generar como consecuencia de la exposición a bajas concentraciones y por períodos prolongados (Iannacone *et al.*, 1998).

Uno de los usos de los ensayos de genotoxicidad es su empleo continuo en el monitoreo y la evaluación *in situ* del aire, el suelo y los ambientes acuáticos, los cuales pueden realizarse a escala global. Los resultados obtenidos proporcionan datos que pueden ser utilizados como centinelas para proteger a la población de agentes que causen mutaciones.

Sistemas vegetales (*Vicia faba*)

Los bioensayos con plantas son parte importante de una batería de pruebas usadas para la detección de mutágenos y genotóxicos ambientales.

La simplicidad de estos ensayos, su costo relativamente bajo, su versatilidad y su requerimiento mínimo de equipo para su aplicación así como su capacidad para estudiar diferentes alteraciones genéticas y cromosómicas, los hacen sistemas particularmente deseables para el monitoreo ambiental. Algunas especies vegetales utilizadas frecuentemente son: *Arabidopsis thaliana* (berro común), *Hordeum vulgare* (cebada), *Lycopersicon esculentum* (jitomate), *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Zea mays* (maíz), *Allium cepa* (cebolla), *Tradescantia paludosa* (hierba del pollo) y *Vicia faba* (haba) (Grant, 1994).

V. faba es un excelente material citogenético para evaluar el daño cromosómico inducido por contaminantes ambientales gracias a que sus cromosomas son grandes, está disponible todo el año, es poco costoso, y las raíces de esta planta contienen una alta proporción de células en diferentes etapas de la mitosis, tienen una frecuencia muy baja de aberraciones espontáneas y un número pequeño de cromosomas (Kihlman, 1975).

El cariotipo de *V. faba* está constituido por 6 pares de cromosomas ($2n = 12$) (figura 1), los cuales según la posición del centrómero son: 1 par metacéntrico, con el centrómero en posición media y 5 pares de cromosomas subacrocéntricos, con el centrómero en posición subterminal. El ciclo celular tiene una duración de 19.3 h a 19 °C, el período presintético (G1) y el período postsintético (G2) duran 4.9 h cada uno; la síntesis de DNA (S), 7.5 h; y la mitosis (M), 2 h (Evans y Scout, 1964).

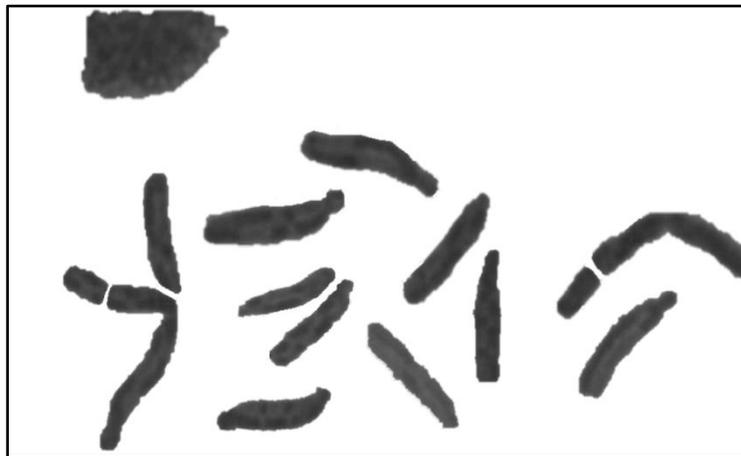


Figura 1. Cariotipo de *Vicia faba* ($2n=12$).

Con *V. faba* como sistema de prueba, se emplean diferentes marcadores de daño entre ellos destacan los intercambios de cromátidas hermanas (ICH) (Juárez-Santacruz, 2005), micronúcleos (MN) (Marcato-Romain *et al.*, 2009) y el ensayo cometa (Koppen y Verschaeve, 2001).

Sistemas animales

Los organismos animales utilizados como herramientas ecotoxicológicas requieren ser sencillos, de manejo fácil, sensible y capaz de proporcionar resultados repetibles. Grupos taxonómicos como peces y anfibios se utilizan ampliamente ya que es posible exponerlos a xenobióticos de manera directa y por aportes de residuos que llegan a los cuerpos de agua provenientes de ambientes terrestres y atmosféricos, por lixiviación, escorrentía y precipitación, además los eritrocitos de los peces y anfibios están nucleados y se pueden obtener fácilmente (Akcha *et al.*, 2003; Freeman y Rayburn, 2004; Torres-Bugarin *et al.*, 2007).

Los peces son considerados organismos bioindicadores idóneos debido a que constituyen varios eslabones de la cadena alimentaria, son capaces de bioacumular sustancias tóxicas y reaccionar fácilmente a bajas concentraciones de agentes mutagénicos (Gustavino *et al.*, 2001). Por esas razones, diversas especies de peces han sido propuestas como bioindicadores para evaluar la toxicidad y genotoxicidad de sustancias químicas contaminantes, entre esas especies se encuentra la carpa común (*Cyprinus carpio*). Esta especie es de grandes dimensiones alcanza 1 m de longitud y 30 kg de peso. Son organismos altamente sensibles a la perturbación ambiental, su importancia ecológica radica en el control de las poblaciones de insectos, microcrustáceos y algas, ayudan a la recirculación, remoción y resuspensión del material orgánico en los ecosistemas acuáticos y además se emplea para consumo humano (Torres-Bugarin *et al.*, 2007).

Por otra parte, los anfibios como bioindicadores son muy sensibles ya que pueden intercambiar de sustancias y gases a través de la piel, que es permeable. Viven en el agua y el suelo, sus huevos no tienen caparazón duro, su desaparición de un lugar significa que podría existir una importante concentración de contaminantes en el ambiente. Los anfibios son de interés particular debido a que por su fisiología y ciclo de

vida están expuestos a una gran variedad de cambios ambientales y su proceso de metamorfosis parece ser una etapa muy sensible a la contaminación del agua la cual alteran y prolonga el período crítico de transición entre la vida acuática y la terrestre, por lo que son muy vulnerables a riesgos ambientales (Freeman y Rayburn, 2004).

Micronúcleos (MN)

El ensayo de MN es ampliamente usado para estudios de contaminación ambiental (De Simone *et al.*, 2005), y es útil como biomonitor en organismos expuestos a clastógenos y aneugénicos; recientemente se ha considerado como una herramienta para predecir riesgos de cáncer (OECD, 2010). Los MN, están constituidos por cromosomas y fragmentos de cromosomas; se forman por la acción de clastógenos y el incremento depende de la dosis o concentración del agente en la matriz ambiental (Chakraborty *et al.*, 2009).

Los mecanismos básicos que dan origen a los MN en la fase-M del ciclo celular, son rompimientos cromosómicos y defectos en el huso mitótico. Un MN se origina a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos y/o de cromosomas enteros retardados que no se incorporan al núcleo de la nueva célula. Un segundo origen son los fragmentos inducidos por rompimiento de puentes en la anafase. El destino de los MN después de aparecer en la fase de mitosis es incierto. En ocasiones, se encuentran en el citoplasma en el citoplasma durante la progresión del ciclo celular, lo cual puede tener un impacto significativo debido a que los genes del MN pueden ser transcritos extracromosómicamente e influir en el fenotipo celular (Terradas *et al.*, 2010).

Finalmente los MN, se forman en la telofase donde una envoltura nuclear envuelve a los fragmentos o cromosomas no incorporados que quedaron incluidos en el citoplasma de las células hijas y se transforman en núcleos secundarios, de forma redonda o almendrada, mucho más pequeños que los núcleos verdaderos (Terradas *et al.*, 2010).

El ensayo de MN se desarrolló utilizando médula ósea de ratón, posteriormente se implementó en una gran variedad de células y especies tanto vegetales como animales. Para la realización de esta prueba es indispensable contar con células en constante división; las ventajas que presenta son: facilidad, rapidez, la posibilidad de probar diver-

esos compuestos con potencial clastogénico y que los MN formados durante la división celular persisten al menos en la siguiente interfase (Zúñiga y Gómez, 2006).

OBJETIVO

Proporcionar una metodología que permita evaluar el daño al DNA generado por contaminantes con potencial genotóxico presentes en matrices ambientales.

EQUIPO

Agitador magnético
 Balanza analítica
 Baño de recuperación
 Baño María
 Contador de células
 Microscopio óptico
 Potenciómetro
 Ultracongelador

MATERIAL

Algodón	Jeringas
Bisturí	Matraz aforado de 100 ml
Cajas Coplin	Micropipetas de 5 y 100 μ l
Charola de plástico	Papel filtro
Cristalizador 190 x 100mm	Pipetas Pasteur
Cristalizadores 80 x 40 mm	Portaobjetos 26 x 76 mm
Cubreobjetos 22 x 22 mm	Probeta de 100 ml
Espátula	Tijeras
Frascos de vidrio de 50, 100 y 200 ml	Vasos de precipitados de 10 y 100 ml

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de catálogo
Ácido acético (CH ₃ -COOH)	J.T. BAKER	9508-02
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	J.T. BAKER	0110-01
Ácido clorhídrico (HCl)	J.T. BAKER	9530-33
Bálsamo de Canadá	SIGMA	
Butanol (C ₄ H ₁₀ O)	J.T. BAKER	9054-01
Carbón activado	J.T. BAKER	E343-07
Citrato de sodio (NaH ₂ (C ₃ H ₅ O (COO) ₃)	J.T. BAKER	3646-01
Etanol (C ₂ H ₆ O)	J.T. BAKER	B5924-03
Fucsina básica	J.T. BAKER	B660-03
Colorante Giemsa	SIGMA	
Glicerina	J.T. BAKER	
Heparina		
Metabisulfito de sodio	J.T. BAKER	3552-01
Metanol absoluto	J.T. BAKER	9070-18
Pectinasa	FLUKA	17389

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Ácido acético 45 %**

Para preparar 100 ml, mezclar 45 ml de ácido acético con 55 ml de agua destilada, guardar en el refrigerador a 4 °C hasta usar la totalidad de la mezcla.

Ácido clorhídrico 5 N

Para preparar 100 ml, en un matraz aforado se colocan 16 ml de HCl y se añade agua destilada hasta el aforo, agitar suavemente. Guardar de preferencia en frasco de vidrio color ámbar en el refrigerador a 4 °C hasta que se agote la mezcla.

Ácido clorhídrico 0.15 N

En un matraz aforado de 100 ml se agrega aproximadamente 50 ml de agua destilada,

posteriormente se añade con cuidado 600 µl de HCl, finalmente se agrega agua destilada hasta el aforo.

Buffer de citratos, pH 4.7

Se preparan soluciones al 0.01 M de ácido cítrico para lo cual se pesan 0.192 g y 0.294 g de citrato de sodio y se disuelve cada reactivo por separado en 100 ml de agua destilada. Después se mezclan partes proporcionales de cada uno hasta ajustar el pH a 4.7. Esta solución se prepara al momento de utilizarla.

Etanol al 70 %

Mezclar 70 ml de etanol con 30 ml de agua destilada, guardar en frasco de vidrio a temperatura ambiente.

Etanol-ácido acético 3:1 (v/v)

Para preparar 100 ml, se mezclan tres volúmenes de etanol y uno de ácido acético, se guarda en frasco de vidrio en refrigeración a 4 °C hasta terminar la mezcla.

Colorante Giemsa (solución madre)

Calentar 66 ml de glicerina a 60 °C, agregar 1 g de colorante Giemsa, incubar en baño María a 60 °C por 30 min. Agregar 132 ml de metanol y agitar por 4 h, se filtra y guarda en frasco ámbar en el refrigerador a 4 °C hasta que se agote.

Metanol-ácido acético 3:1 (v/v)

Se mezclan tres partes de metanol y una de ácido acético. Preparar minutos antes de su uso sólo el volumen requerido (40 ml por cada caja Coplin).

Reactivo de Schiff

Mezclar 100 ml de HCl 0.15 N, 1.9 g de metabisulfito de sodio y 0.35 g de fucsina básica, agitar por 2 h, añadir 0.5 g de carbón activado y agitar por 15 min, filtrar con papel filtro grueso y guardar en frasco ámbar en el refrigerador a 4 °C hasta que el reactivo se agote.

METODOLOGÍA

Ensayo de MN en células de *Vicia faba*

Preparación y germinación de las semillas.

Las semillas de haba (*V. faba*) se lavan con agua corriente, se colocan en un cristalizador para su imbibición con agua destilada por 24 h. Posteriormente se ponen a germinar entre dos capas de algodón humedecido con agua de la llave, y se mantienen a una temperatura constante de 20 °C en condiciones de oscuridad (figura 2). Al aparecer la radícula, remover la testa (cubierta de la semilla); cuando la raíz principal alcance 2 a 3 cm de longitud y previo a la exposición al contaminante se elimina la cofia (recubrimiento protector en la punta de la raíz).

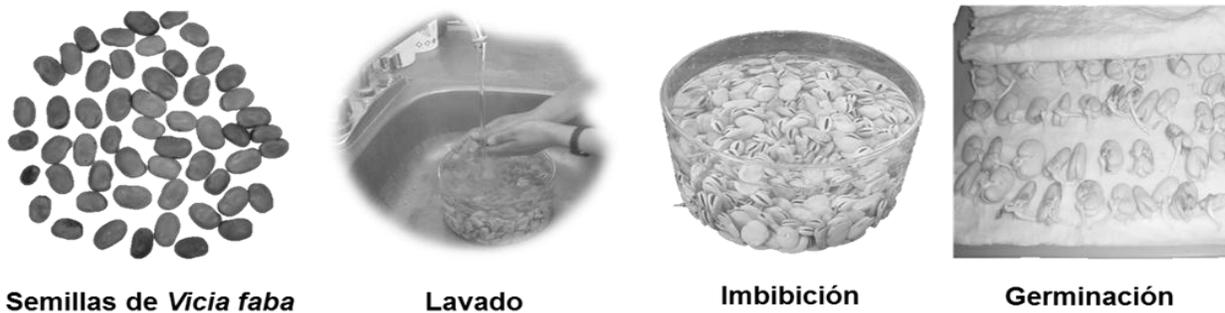


Figura 2. Preparación y germinación de semillas de *V. faba*.

Exposición

En cristalizadores tapados con papel aluminio, perforado con la punta de un lápiz, se colocan las muestras del contaminante y/o matriz ambiental a evaluar (si es agua contaminada, 100 ml; si es suelo y/o sedimento, 50 g humedecidos con 50 ml de agua destilada). A continuación se colocan 4 semillas germinadas de modo que la raíz quede en contacto con la muestra a evaluar durante 6 h.

Posteriormente se enjuagan con agua corriente y se colocan en un baño de recuperación por 22 h con flujo de agua y aireación constante en oscuridad, al mismo tiempo y en las mismas condiciones se coloca un testigo negativo con agua destilada. Pasado éste tiempo se cortan aproximadamente 5 mm de los meristemas y se fijan en

etanol-ácido acético 3:1, en volumen suficiente para cubrirlos completamente; se guardan en el congelador hasta la tinción (figura 3).

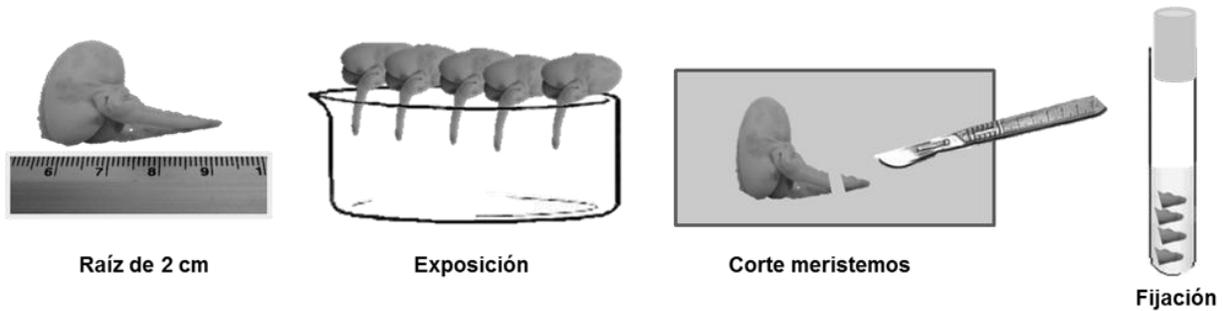


Figura 3. Exposición de raíces a contaminantes, corte y fijación.

Tinción

Colocar los meristemos de *V. faba* en etanol al 70 % por 10 min a 28 °C, transcurrido el tiempo se elimina el etanol y se hidrolizan con HCl 5 N en baño María a 28 °C durante 20 min, se lavan tres veces con agua destilada, se secan con un papel absorbente y se les agrega reactivo de Schiff, se colocan en baño María a 28 °C durante 20 min y en condiciones de obscuridad.

Transcurrido el tiempo de tinción, cada mesristemo se coloca sobre un portaobjetos, se adiciona una gota de ácido acético al 45 %, se cubre con un cubreobjetos y se aplasta el tejido con la goma de un lápiz hasta formar una monocapa; mantener en congelación hasta su preparación permanente (figura 4).

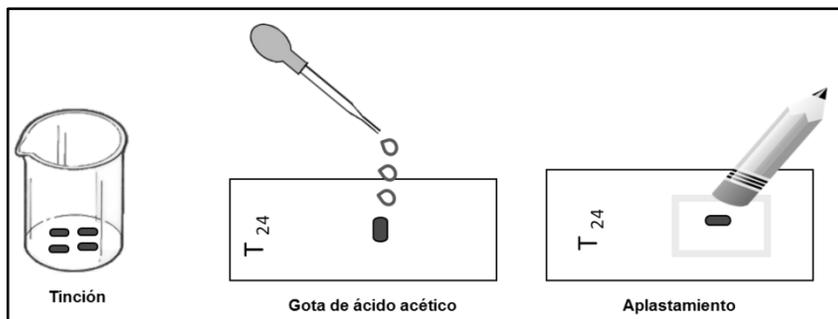


Figura 4. Tinción de raíces de *V. faba*.

Montaje

Para realizar las preparaciones permanentes los cubreobjetos con tejido se colocan sobre hielo seco para que se congele y se adhiera el tejido al portaobjetos. Una vez congelado se desprende el cubreobjetos con un bisturí, las laminillas se pasan por dos cajas Coplin que contienen butanol absoluto (3 min en cada una), se retiran de la caja y cuidando de no tocar el tejido se seca el exceso de butanol. Colocar una gota de bálsamo de Canadá sobre el tejido y colocar un cubreobjetos nuevo, dejar secar a temperatura ambiente (figura 5).



Figura 5. Elaboración de preparaciones permanentes de *V. faba*.

Análisis al microscopio

Para analizar la frecuencia de MN se contabiliza en 1 000 células en interfase utilizando un microscopio óptico con aumento mínimo de 40 X, aplicando los siguientes criterios: (Zalacain *et al.*, 2005) (figura 6).

- a) El diámetro del MN oscila entre 1/16 a 1/3 de la media del diámetro del núcleo principal;
- b) Los MN son no refractarios;
- c) La intensidad de tinción del MN es similar al núcleo principal;
- d) El MN no está conectado con el núcleo principal
- e) Los MN se encuentran en el mismo plano del núcleo principal

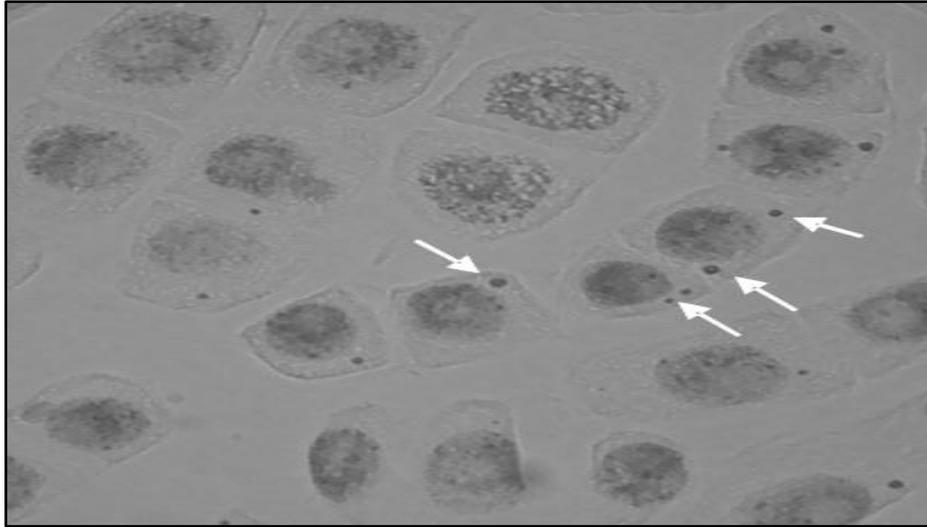


Figura 6. Células de *V. faba* en interfase con micronúcleos (señalados con las flechas).

Ensayo de micronúcleos en células animales.

Organismos de prueba.

Como material biológico se emplean células sanguíneas de organismos expuestos a contaminantes ambientales, y como testigos se utilizan organismos no expuestos, (figura 7).



Figura 7. Organismos de prueba.

Obtención de células sanguíneas

Con jeringas previamente heparinizadas se obtiene una muestra de sangre de peces (por punción o corte en la vena o aleta caudal) (figura 8) y en ranas y ratones por punción cardíaca.



Figura 8. Obtención de sangre por punción en aleta caudal

Frotis sanguíneo

En portaobjetos limpios se colocan 5 μ l de sangre, con la ayuda de un cubreobjetos se realiza un frotis y se deja secar por 24 h (figura 9).

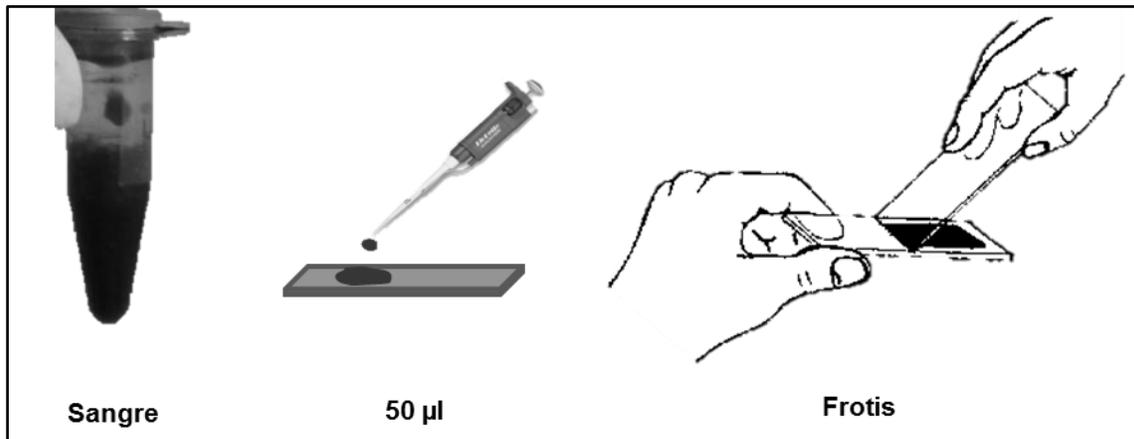


Figura 9. Frotis sanguíneo.

Tinción

Los portaobjetos con frotis se colocan en una caja Coplin que contiene 40 ml de fijador (metanol-ácido acético 3:1 v/v) por 30 min. Posteriormente se tiñen con Giemsa al 5 % durante 5 min (figura 10), pasado este tiempo se enjuagan con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente.



Figura 10. Tinción de eritrocitos.

Análisis al microscopio

Los MN se contabilizan en 1 000 eritrocitos (figura 11) siguiendo los criterios descritos en la sección análisis al microscopio del ensayo de micronúcleos en *V. faba*.

Expresión de resultados

Para determinar si las muestras analizadas son o no genotóxicas, se comparan los valores promedio de la frecuencia de micronúcleos del grupo expuesto contra el testigo negativo, se le aplica una t-student con una significancia de $p < 0.05$.

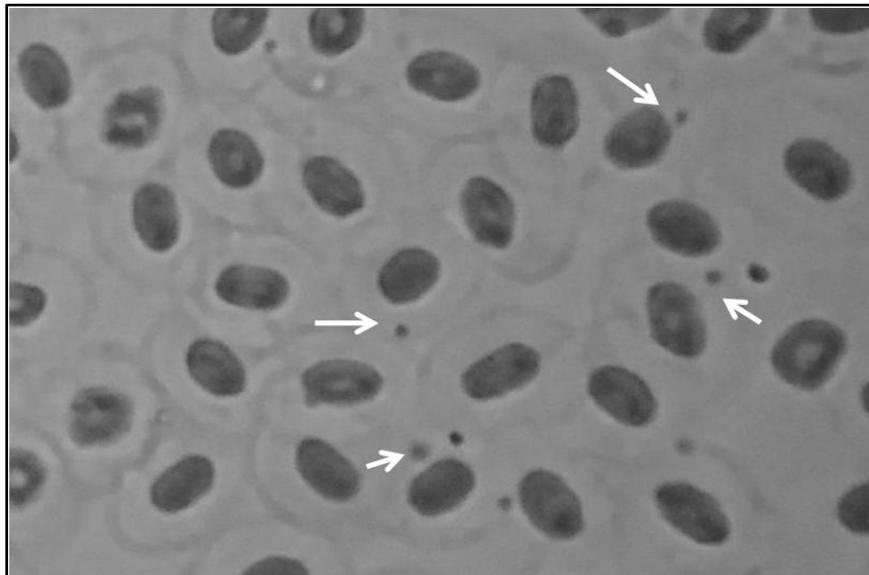


Figura 11. Micronúcleos (señalados con flecha) en eritrocitos de peces

LITERATURA

- Akcha, F., Hubert, F. V., Pfohl-Leszkowicz, A. 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of *in situ* exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research* 534:21-32.
- Carballo, H. O., Arencibia, C. G., Concepción, J., Isla, M. M. 2010. Los bioensayos de toxicidad en sedimentos marinos. *Revista de toxicología en línea* No. 32. En <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>. 33-69.
- Chakraborty, R., Mukherjee, A. K., Mukherjee, A. 2009. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environmental Monitoring and Assessment* 153(1-4):351-357.
- De Simone, C., Angelucci, R., Errichetti, M. F., Marconi, F., Rossi, M., Selvi, S. 2005. A statistical approach to evaluate compost genotoxicity. *Biology and Fertility of Soils* 41: 9-14.
- Evans, H. J. y Scout, D. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49: 17-38.
- Freeman, J. L. y Rayburn, A. L. 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 560:69-78.
- Grant, W. F. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* 310:175-185.
- Gustavino, B., Scornajenghi, K. A., Minissi, S., Ciccotti, E. 2001. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei pisces) by X-rays and colchicine. *Mutation Research* 494(1):151-159.
- Iannacone J., Alvarioño L., Dale, W. 1998. Pruebas ecotoxicológicas como una herramienta para la evaluación del impacto ambiental. *Bol. Lima, Perú* 113: 53-68
- Juárez-Santacruz, L. 2005. Efecto citogenético de efluentes industriales sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Tlaxcala. 115 pp.
- Kihlman, B. A. 1975. Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Research* 31:401-412.
- Koppen, G. y Verschaeve, L. 2001. The alkaline single-cell gel electrophoresis/comet assay: a way to study DNA repair in radicle cells of germinating *Vicia faba*. *Folia biologica* 47: 50-54.
- Marcato-Romain, C. E., Guirese, M., Cecchi, M., Cotelle, S., Pinelli, E. 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere* 77: 345-350.
- OECD, 2010. *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, OECD Publishing. doi: 10.1787/9789264091016 Disponible en: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- Terradas, M., Martín, M., Tusell, L., Genesca, A. 2010. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research* 705(1):60-67.
- Torres-Bugarin, O., Zavala-Aguirre, J. L., Gómez-Rubio, P., Buelna-Osben, H. R., Zúñiga-González, G., García-Ulloa M. 2007. Especies de peces con potencial como bioindicadoras de genotoxicidad en el lago "La Alberca", Michoacán, México. *Hidrobiológica* 17(1): 75-81.
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., Patiño, A. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28(2):227-236.
- Zuñiga, G. G. M. y Gómez, M. B. C. 2006. La prueba de micronúcleos. *La ciencia y el hombre*. 19(1).

EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EMPLEANDO EL ENSAYO COMETA

Edelmira García Nieto

Laboratorio de Toxicología Ambiental

INTRODUCCIÓN

El ensayo cometa o electroforesis unicelular en gel es una técnica para medir el daño al ácido desoxirribonucleico (DNA) en células individuales causado por agentes genotóxicos. Se basa en la capacidad que tienen los fragmentos del DNA, cargados negativamente, de migrar o desplazarse hacia el ánodo (electrodo positivo) a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico. En esta técnica, el grado de migración depende directamente del daño experimentado por el DNA de la célula.

Este ensayo fue creado por Ostling y Johanson en 1984 empleando una línea celular de hepatoma (cáncer de hígado) de ratón. Las células embebidas en agarosa se extendían sobre un portaobjetos, y luego se sumergían en una solución de ácido etilendiaminotetraacético y el detergente dodecil sulfato de sodio para lisar las membranas celulares. Al aplicar un campo eléctrico en condiciones neutras de pH, los fragmentos de DNA emigraban hacia el ánodo; el frotis se teñía con naranja de acridina y se observaba en el microscopio de fluorescencia. La imagen obtenida se parecía a un cometa, con una cabeza bien definida que correspondía al DNA intacto y una cauda formada por fragmentos de DNA (figura 1). A esta figura se debe que la técnica se conozca como ensayo cometa.

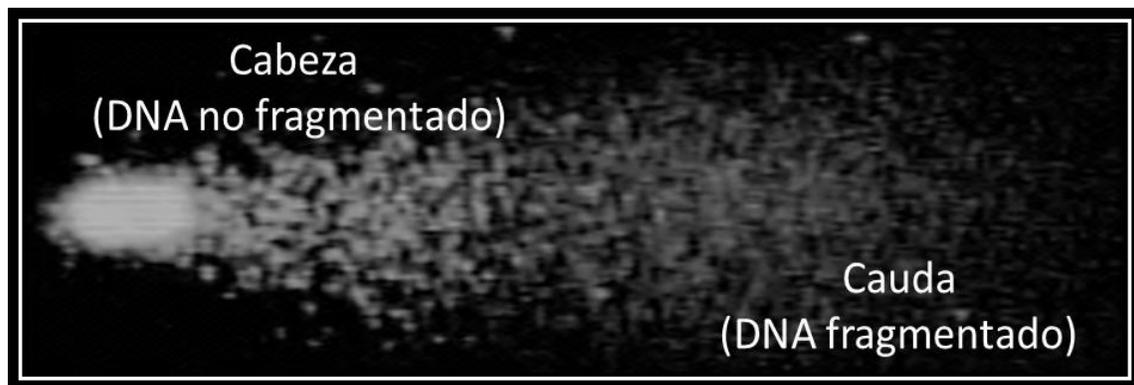


Figura 1. Molécula de DNA.

Sin embargo, las condiciones neutras sólo permitían analizar el daño producido por la ruptura en las dos hebras (RDH) del DNA. Por lo que en 1988, Singh y colaboradores introdujeron la modificación consistente en efectuar la electroforesis en condiciones alcalinas extremas ($\text{pH} > 13$). Con un pH alcalino se rompen los puentes de hidrógeno que mantienen unida a la doble hélice, el DNA superenrollado se relaja y las hebras separadas liberan o exponen los fragmentos presentes en la molécula. De esta manera, cuando se aplica un campo eléctrico estos fragmentos emigran fácilmente hacia el ánodo. Este procedimiento hizo posible la detección de rupturas directas de una sola hebra (RUH), o relacionadas con procesos de reparación por escisión y con sitios sensibles a álcalis (SSA). Lo anterior incrementa la sensibilidad del ensayo, debido a que la mayoría de los agentes genotóxicos originan un mayor número de RUH y SSA que de RDH.

Casi al mismo tiempo y con el fin de facilitar la detección de rompimientos en una sola hebra, Olive en 1989 efectuó un cambio en la metodología consistente en realizar la electroforesis en condiciones alcalinas ($\text{pH} = 12.3$). Al presente se ha encontrado que en estas condiciones de pH se detectan no solamente RUH sino también RDH, entrecruzamientos y sitios incompletos del proceso de reparación por escisión. Desde entonces la flexibilidad y utilidad de este método se ha incrementado para detectar, además de rupturas en una y dos hebras, otros daños al DNA.

Con algunas modificaciones, esta técnica es capaz de indicar daño oxidativo en las bases púricas y pirimidínicas, entrecruzamientos DNA-DNA, DNA-proteína y DNA-xenobiótico; así como reparación del DNA en prácticamente cualquier célula eucariota. El tamaño, la forma y la distribución del DNA en el cometa están relacionados con la magnitud del daño. En general, las rupturas de hebras expresadas por el tratamiento alcalino o mediante la combinación con algunas enzimas como las endonucleasas incrementan la migración del DNA, mientras que los entrecruzamientos DNA-DNA y DNA-proteína resultan en una disminución de la migración del DNA en comparación con los testigos negativos.

Entre las ventajas de esta técnica se encuentran las siguientes: a) requiere un número reducido de células ($<10\ 000$), b) los datos que se obtienen provienen de células individuales, c) evalúa el daño a nivel de hebras del DNA, mientras que otras técni-

cas citogenéticas lo hacen a nivel de cromosomas, d) una gran variedad de células eucariotas de diversos tejidos de animales y vegetales pueden ser analizadas, e) los resultados se obtienen en horas, en comparación con otras técnicas citogenéticas convencionales que duran varios días, f) es muy sensible para detectar el daño y la reparación del DNA, una ruptura en 1 010 daltones, g) basta con analizar 100 células por individuo dentro de un grupo de tratamiento, h) si no se cuenta con el software Komet que permite efectuar un análisis estadístico más robusto, se tiene la opción de realizar un análisis semicuantitativo, agrupando las células en 4 categorías basándose en la extensión de la cauda.

Aplicaciones

Entre las múltiples aplicaciones del ensayo cometa se encuentran los estudios de biomonitoreo ecotoxicológico y ambiental para evaluar el potencial genotóxico de suelos, sedimentos y agua en diversos entornos, en los cuales se emplean organismos tanto animales como vegetales (Salagovic *et al.*, 1996; Belpaeme *et al.*, 1998; Gichner *et al.*, 2000; Tice *et al.*, 2000; Avishai *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2003; Jasso *et al.*, 2007; Dhawan *et al.*, 2009).

Este bioensayo se utiliza ampliamente en el biomonitoreo de poblaciones humanas para evaluar el daño al DNA en individuos expuestos a diversos xenobióticos por causas ocupacionales, clínicas y ambientales; en estos estudios se emplean varios tipos celulares, desde linfocitos, células del epitelio nasal y de la mucosa bucal, hasta células espermáticas (Rojas *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1998; Piperakis *et al.*, 1998; Srám y Binková, 2000; Bajpayee *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2003; Yañez *et al.*, 2003; Codrington *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Kapiszewska *et al.*, 2005; Dusinska y Collins, 2008).

Una variante de esta técnica es la combinación con ciertas enzimas bacterianas (formamidopirimidina-DNA glicosilasa, endonucleasa III, uracilo-DNA glicosilasa), las cuales reconocen bases púricas y pirimidínicas oxidadas, para evaluar el daño oxidativo al DNA implicado en varias condiciones patológicas (Collins *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2001b; Kruman *et al.*, 2002).

Otra aplicación es la evaluación de la genotoxicidad de la radio y la quimioterapia

en pacientes con cáncer (Vaghef *et al.*, 1997; Kopjar *et al.*, 2002). Se ha observado que el daño al DNA es mayor en pacientes con cáncer lo que probablemente está relacionado con procesos deficientes de reparación del DNA (Collins *et al.*, 2001a; Smith *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2006).

En el campo de la nutrición la aplicación del ensayo cometa se centra en analizar individuos con diversas deficiencias nutricionales, los resultados indican una relación inversa entre el grado de daño al DNA y una dieta rica en vegetales.

Asimismo, se investiga la anti-genotoxicidad de algunas especies de hongos y de sustancias como la coenzima Q10 que favorecen la recuperación del DNA dañado (Tomasetti *et al.*, 2001; Giovannelli *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2006; Bichler *et al.*, 2007).

OBJETIVO

Evaluar el daño al DNA en células provenientes de diversas especies de animales aplicando el ensayo cometa en la versión alcalina.

EQUIPO

Agitadores magnéticos y agitador vórtex
Balanza analítica
Cámara de electroforesis
Cámara de Neubauer
Campana de extracción y de flujo laminar
Centrífuga
Contador de células
Fuente de poder
Horno de microondas
Microscopio de fluorescencia
Placa de agitación y calentamiento
Potenciómetro
Refrigerador

MATERIAL

Algodón	Matraz volumétrico (500 ml y 1 L)
Bandeja de vidrio (tipo refractario)	Pinzas de precisión
Bandeja de metal y de plástico con rejilla	Pipetas Pasteur y bulbos
Cajas para guardar laminillas	Portaobjetos esmerilados
Cepillo dental	Probeta (100 ml)
Cubreobjetos	Recipientes Coplin de plástico opacos
Guantes de nitrilo	Recipientes Coplin de vidrio
Juego de pipetas automáticas y puntas	Papel absorbente y papel filtro No. 1
Lámpara de luz amarilla	Tubos Eppendorf de 2 ml
Liga	Vasos de precipitado (10 ml, 0.25, 1 y 2 L)
Matraz Erlenmeyer (25 ml)	Tubos y adaptador Vacutainer

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de catálogo
Ácido clorhídrico concentrado (HCl)	JT BAKER	9530-33
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	SIGMA	E-5134
Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF)	SIGMA	A-9414
Agarosa regular (AR)	SIGMA	A-9918
Azul de tripano (AT)	MERCK	1.11732.0025
Bromuro de etidio (BE)	SIGMA	E-8751
Cloruro de potasio (KCl)	JT BAKER	3040-01
Cloruro de sodio (NaCl)	JT BAKER	3624-01
Dimetil sulfóxido (DMSO)	SIGMA	D-5879
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	JT BAKER	3246-01
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	JT BAKER	3828-01
Heparina sódica 1000 UI/ml	PISA	NA
Hidróxido de sodio (NaOH)	JT BAKER	3722-01
Histopaque -1077	SIGMA	1077-1
Laurilsarcosinato de sodio (LSS)	SIGMA	L9150
Medio de cultivo (RPMI-1640)	SIGMA	R-6504
Metanol (CH ₃ OH)	JT BAKER	9070-07
Tripsina 1:250	SIGMA	85450C
Tritón X-100 (TX)	SIGMA	X-100
Trizma base (TB)	SIGMA	T-1503

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Agarosa regular (AR) al 0.5 %

Para preparar 25 ml, se pesan 0.125 g de AR y se colocan en un matraz Erlenmeyer. Añadir 25 ml de agua desionizada y calentar en un horno de microondas de 2 a 3 veces por 10 segundos hasta lograr la disolución completa.

Agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al 0.5 %

Se elabora justo antes de preparar las laminillas. Para 25 ml se pesan 0.125 g de ABPF y se colocan en un matraz Erlenmeyer. Agregar 25 ml de agua desionizada y calentar en un horno de microondas de 2 a 3 veces por 10 s hasta lograr la disolución completa.

Solución de lisis

Para preparar 1 L, se pesan los siguientes reactivos, excepto el DMSO y el Tritón X-100:

NaCl	2.5 M	141.1 g	
Trizma base	10.0 mM	1.2 g	
EDTA	100.0 mM	37.2 g	
NaOH	lentejas	12.0 g	
LSS	1.0 %	10.0 g	(exclusivo para <i>Eisenia foetida</i>)
DMSO	10.0 %	100 .0 ml	
Tritón X-100	1.0 %	10.0 ml	

A continuación disolverlos en un vaso de precipitado con agua desionizada y agitación constante en el orden que se citan arriba, el EDTA se añade poco a poco alternando con el NaOH, hasta la disolución completa del primero. En el caso de la solución de lisis para los celomocitos de *Eisenia foetida*, el LSS se disuelve por separado y enseguida se añade al resto de la solución. Ajustar el pH a 10 con HCl, aforar a 890 ml, filtrar y guardar en un frasco ámbar hasta por un mes. El día de su uso, se mezcla en un recipiente Coplin: 44.5 ml de la solución de lisis, 4.5 ml de DMSO y 0.5 ml de Tritón X-100. La mezcla se refrigera por lo menos una hora antes de su uso.

Amortiguador de electroforesis

Solución madre de NaOH 10 N.

Para preparar 500 ml, se pesan 200 g de hidróxido de sodio y se afora a 500 ml con agua desionizada.

Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente para aforar.

Solución madre de EDTA 200 mM.

Para preparar 200 ml, se pesan 14.89 g de EDTA, se colocan en un matraz volumétrico y continuación aforar con agua desionizada, si es necesario añadir hidróxido de sodio para lograr una completa disolución. Ajustar el pH a 10 con ácido clorhídrico.

La solución amortiguadora se prepara el día de su uso. Para preparar 1 L, mezclar en un vaso de precipitado 30 ml de la solución madre de NaOH 10 N y 5 ml de la solución madre de EDTA 200 mM.

Ajustar a un pH de 13 con NaOH o con HCl para obtener una concentración final de 300 mM de NaOH y 1 mM de EDTA.

Amortiguador de neutralización

Para preparar 1 L del buffer Trizma base 0.4 M.

Pesar 48.5 g de Trizma base y disolver con agua desionizada, ajustar a un pH de 7.5 y aforar a 1 000 ml.

Almacenar en un frasco ámbar hasta por un mes a temperatura ambiente.

Bromuro de etidio (BE)

Solución madre de BE 0.02 %.

Pesar 10 mg de BE y aforar con agua desionizada a 50 ml. Preparar una dilución 1:10 mezclando 1 ml de la solución madre y 9 ml de agua desionizada. Vaciar en un frasco ámbar.

NOTA: Manejar con guantes debido a que este reactivo es carcinogénico.

Tripsina 0.25 %

Para preparar 50 ml, pesar 0.125 g de tripsina y aforar a 50 ml con PBS.

Amortiguador de fosfatos (PBS)

Para preparar 1 L de este amortiguador, pesar los siguientes reactivos:

NaCl	138 mM	8 g
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	2.5 mM	1.15 g
KCl	2.7 mM	0.2 g

Todos los reactivos se disuelven con agua desionizada y con agitación constante, ajustar el pH a 7.5 con HCl antes de aforar a 1 L. Guardar en frasco ámbar hasta por un mes a temperatura ambiente.

Solución de extrusión

Para preparar 250 ml, se miden los siguientes reactivos:

Etanol 95 %	4.8 %	12 ml
NaCl	0.85 %	2.125 g
EDTA	0.25 %	0.625 g

Disolver el NaCl y el EDTA con agua desionizada, calentar entre 80 a 90 °C con agitación suave. Enfriar con agua de grifo, añadir el etanol, ajustar el pH a 7.3 con NaOH 1 M y aforar a 250 ml. Mantener en refrigeración (4 °C) máximo por un mes.

METODOLOGÍA

Preparación de laminillas

Lavar los portaobjetos con metanol y secar con gasa. Con el dedo extender 150 µl de agarosa regular sobre un portaobjetos, evitando la formación de grumos. Dejar solidificar la agarosa en la estufa a una temperatura entre 50 a 60 °C, o en la placa de calentamiento (figura 2). Las laminillas se almacenan hasta su uso.

NOTA: Mantener la AR en baño María a una temperatura entre 50 y 60 °C.



Figura 2. Preparación de la superficie de las laminillas con agarosa regular.

Aislamiento celular

Sangre total (ST).

La muestra de sangre humana se obtiene por punción venosa utilizando tubos de Vacutainer que contengan EDTA como anticoagulante, o por pinchazo en el dedo pulgar. En el caso de peces la sangre se obtiene por punción en la vena caudal, o mediante corte de la aleta caudal. En ranas y ratones la muestra se extrae por punción cardiaca. Las jeringas y tubos de recolección deberán estar previamente heparinizados (figura 3).

NOTA: EDTA puede lisar los eritrocitos de anfibios y reptiles.

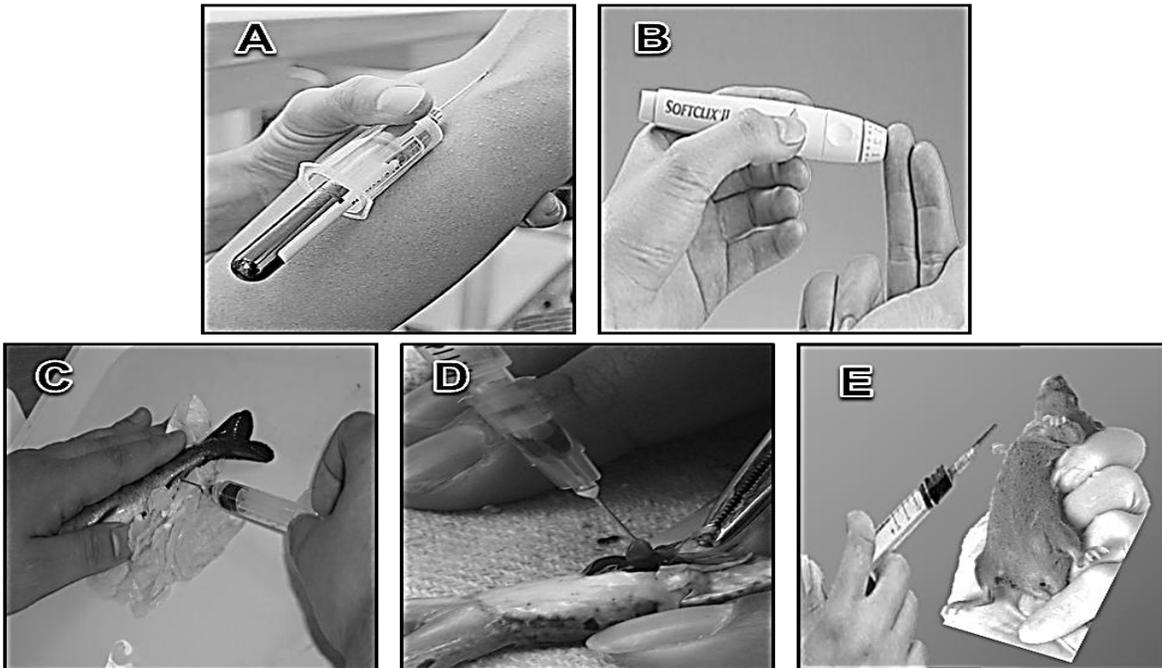


Figura 3. Obtención de sangre. Extracción de sangre humana: A, con vacutainer; B, por pinchazo. Extracción de sangre de animales con jeringa heparinizada: C pez; D, rana; E, ratón.

Células mononucleares humanas (CMN).

Extraer por punción venosa de 4 a 5 ml de sangre utilizando tubos de Vacutainer, que contengan EDTA como anticoagulante. En un tubo cónico colocar 3 ml de sangre y un volumen igual de RPMI, mezclar por inversión. Con una pipeta, vaciar esta mezcla por las paredes de otro tubo que contenga 1 800 µl de Histopaque-1077 y centrifugar a 2 500 rpm durante 20 min.

Separar el suero y desecharlo, extraer la capa de CMN y transferirlas a otro tubo que contenga 9 ml de RPMI, a continuación centrifugar a 1 500 rpm durante 10 min. Decantar y resuspender el precipitado en 1 ml de RPMI. Colocar 10 µl de la suspensión en un tubo Eppendorf y mezclar con 90 ul de azul de tripano (AT). Colocar una gota de la suspensión celular en la cámara de Neubauer, contar 100 células y calcular el porcentaje de viabilidad (las células muertas se tiñen de azul) (figura 4).

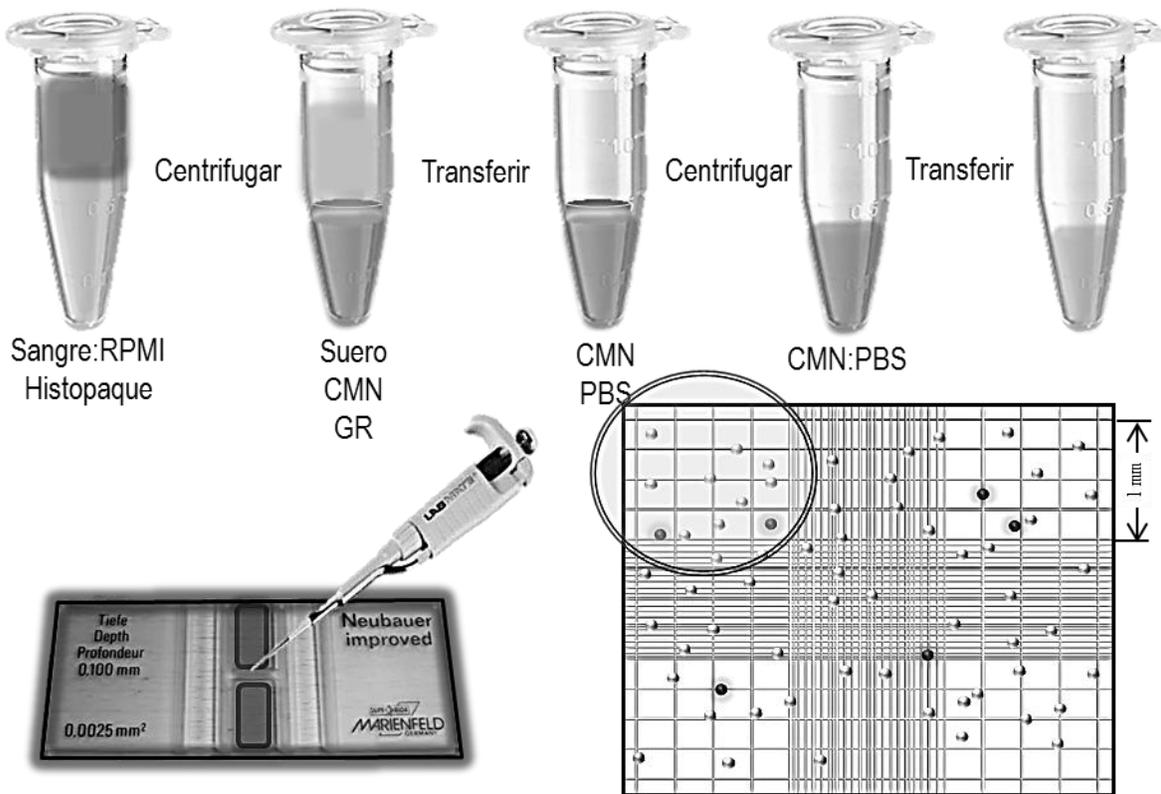


Figura 4. Extracción de células mononucleares de la sangre (arriba) y conteo para calcular la viabilidad celular (abajo). RPMI, medio de cultivo; CMN, células mononucleares; GR. glóbulos rojos; PBS, buffer de fosfatos; AT, azul de tripano.

Por último, contar el número de células vivas en tres cuadrantes de la cámara y aplicar la fórmula siguiente:

$$X = (NPC) \times (FC) \times (VR) \times (FDAT)$$

Donde:

X = número de células por mililitro

NPC = número promedio de células por cuadrante

FC = factor de conversión de la cámara de Neubauer , un cuadrante = 0.1 μ l (10 000)

VR = volumen de RPMI para la resuspensión del precipitado final de CMN (1 ml)

FDAT = factor de la dilución 1:10 con el colorante azul de tripano (10)

Ejemplo: suponiendo un conteo de 36 células en 3 cuadrantes

$$X = 12 \text{ cél} \times 10\,000 \times 1 \text{ ml} \times 10 = 1\,200\,000 \text{ células/ml}$$

Ajustar a 200 000 células/ml, añadiendo RPMI de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de RPMI} = \frac{X}{AR}$$

Donde:

X = células contadas en el hematocitómetro

AR = ajuste de células requerido

Ejemplo:

$$\text{Volumen de RPMI} = \frac{1\,200\,000 \text{ células/ml}}{200\,000 \text{ células}} = 6 \text{ ml}$$

Mucosa bucal (MB).

Solicitar al individuo donante que se enjuague la boca tres veces con agua destilada, frotar suavemente con un cepillo dental la cara interna de las mejillas cuidando no tocar lengua, dientes y encía. Sumergir el cepillo en 5 ml de PBS y agitar en vórtex (figura 5).



Figura 5. Obtención de células de la mucosa bucal.

Celomocitos de la lombriz roja californiana *Eisenia foetida* (CEF).

Para purgar o limpiar el sistema digestivo de las lombrices, colocarlas sobre papel filtro húmedo dentro de una caja de Petri durante 24 h. Luego transferirlas a un tubo de centrífuga que contenga 3 ml de solución de extrusión durante 2 min a temperatura ambiente. Retirar las lombrices y añadir 6 ml de PBS (4 °C). Centrifugar a 3 500 rpm durante 5 min, decantar y resuspender el precipitado en 200 μ l de PBS (figura 6).



Figura 6. Obtención de celomocitos de *Eisenia foetida*.

Preparación celular y liberación de DNA

Mezclar en un tubo Eppendorf cualquiera de las siguientes opciones dependiendo del tipo celular que se quiera analizar: a) 15 μ l de ST humana, b) 200 μ l de la suspensión de CMN, c) 10 μ l de la suspensión de MB, d) 10 μ l (dilución 1:30) de ST de animales silvestres o e) 200 μ l de la suspensión CEF con ABPF al 0.5 %. Mezclar en el agitador vórtex por 5 segundos (figura 7).

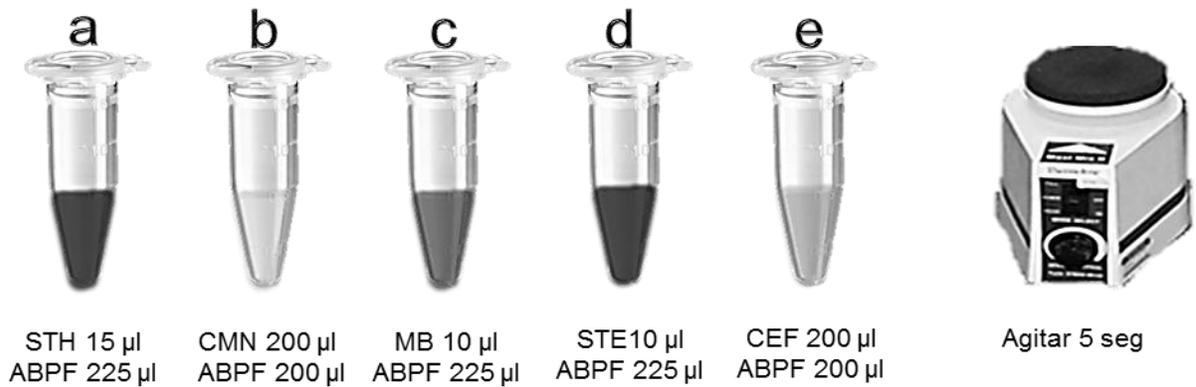


Figura 7. Mezcla de células de diversas especies con agarosa de bajo punto de fusión. STH, sangre total humana; CMN, células mononucleares; MB, mucosa bucal; STE, sangre total de especies silvestres; CEF, celomocitos de *Eisenia foetida*.

Colocar 75 μ l de la mezcla sobre las laminillas previamente preparadas y coloque un cubreobjetos, introducir las laminillas en el refrigerador a 4 °C durante 5 minutos hasta que solidifiquen (figura 8).

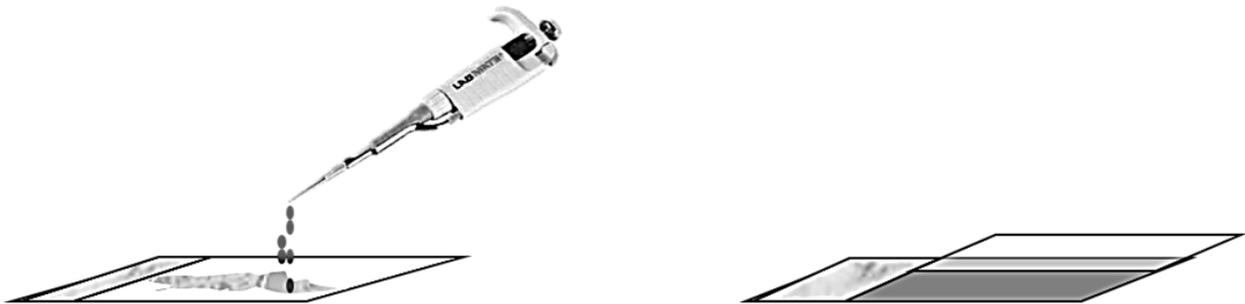


Figura 8. Extensión de las células sobre las laminillas.

Retire cuidadosamente el cubreobjetos y agregue una capa de ABPF al 0.5 %, volver a colocar el cubreobjetos y deje solidificar a 4 °C (figura 9).

NOTA: La temperatura de la ABPF debe mantenerse entre 34 a 37 °C en baño María para evitar la formación de grumos y la muerte celular.

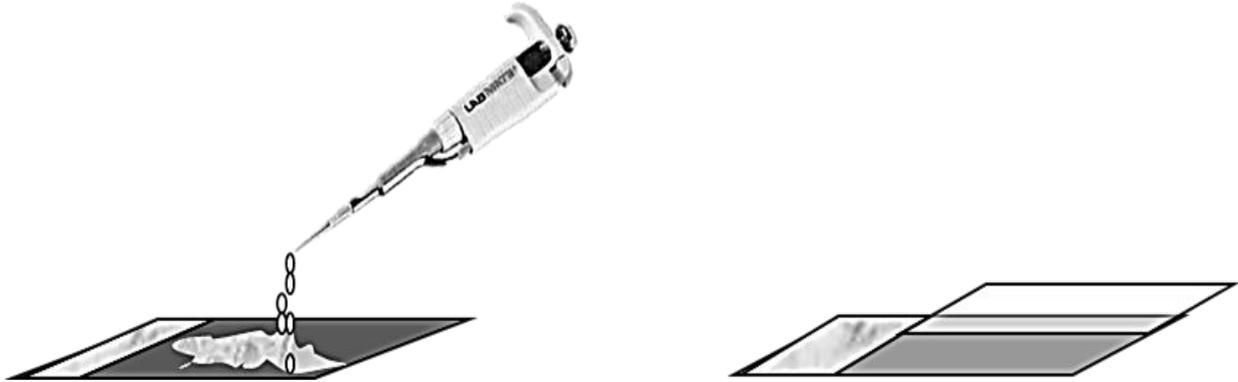


Figura 9. Extensión de agarosa de bajo punto de fusión.

Retirar el cubreobjetos (en el caso de células de la mucosa bucal sumergir las laminillas en tripsina diluida con PBS al 0.25 % por 30 min a 37 °C), y enjuagar con PBS. Colocar las laminillas en la solución de lisis, previamente enfriada. Almacenar a 4 °C durante toda la noche (figura 10).



Figura 10. Ruptura de las membranas celular y nuclear por inclusión en la solución de lisis.

Desenrollamiento y electroforesis

En un cuarto oscuro, disponer las laminillas en una cámara de electroforesis colocada dentro del refractario con hielo picado, añadir el amortiguador de electroforesis durante 20 min (STH, CMN, MB) o 10 min (STE, CEF) para que se lleve a cabo el desenrollamiento de las hebras del DNA. Por último, se aplica una corriente de 25 V y 300 mA durante 20 min (STH, CMN, MB) o 10 min (STE, CEF) (figura 11).

NOTA: esta etapa se realiza en cuarto obscuro para evitar el daño al DNA por la luz ultravioleta.

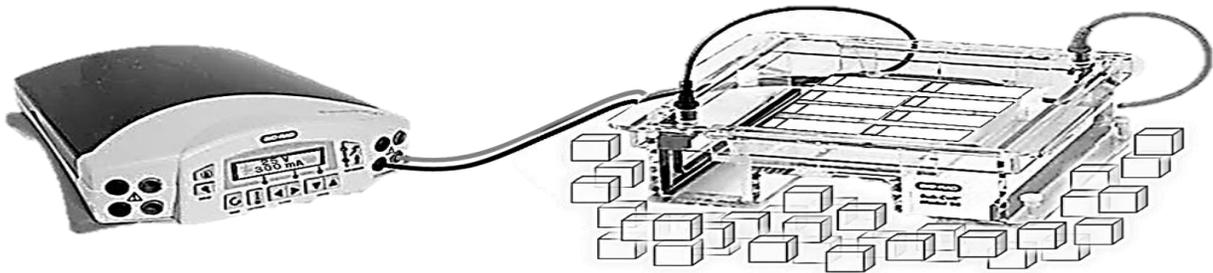


Figura 11. Desenrollamiento del DNA y electroforesis.

Posteriormente y utilizando una pipeta Pasteur, lavar las laminillas con 5 ml de amortiguador de neutralización (dos veces) y también dos veces con 5 ml de agua desionizada. Finalmente, sumergirlas en un recipiente Coplin con metanol durante 5 minutos. Dejar secar a temperatura ambiente y guardar hasta su observación en el microscopio de fluorescencia (figura 12).



Figura 12. Neutralización de las laminillas y almacenamiento.

Observación de los cometas en el microscopio

Las laminillas se tiñen con 20 µl de bromuro de etidio. La migración del DNA se determina en el microscopio de fluorescencia con un aumento de 20 X. Con el Software Komet se evalúan 100 moléculas de DNA y se obtiene el parámetro de Olive Tail Moment (momento de la cauda), el cual integra la longitud de la cauda y el porcentaje de fragmentación de DNA en la cauda (figura13).

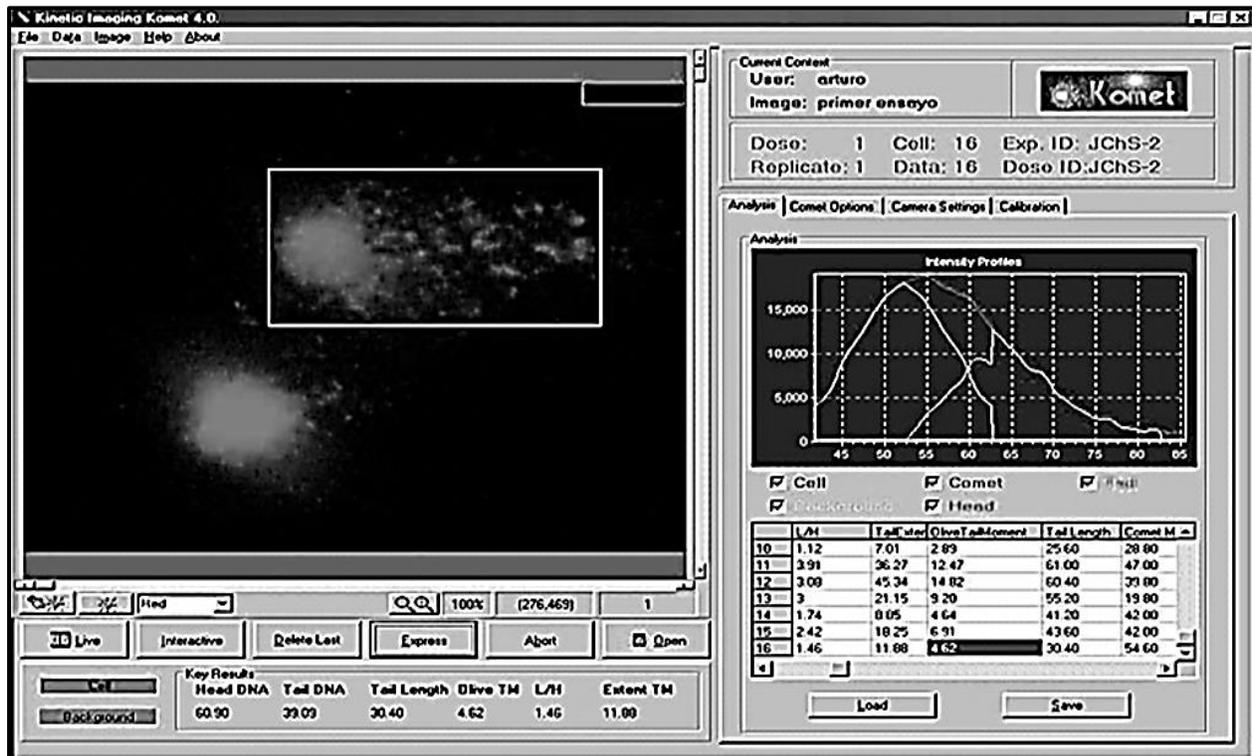


Figura 13. Análisis de las moléculas del DNA con el software Komet 4.0.

En caso de no contar con el software Komet, se cuentan 100 células y se obtiene el porcentaje de cada clase, así como la puntuación de daño al DNA (figura 14).

- Clase 0: DNA no fragmentado, llamado también DNA normal.
- Clase 1: longitud de la cauda menor al diámetro de la cabeza.
- Clase 2: longitud de la cauda entre una y dos veces el diámetro de la cabeza.
- Clase 3: longitud de la cauda mayor a dos veces el diámetro de la cabeza.

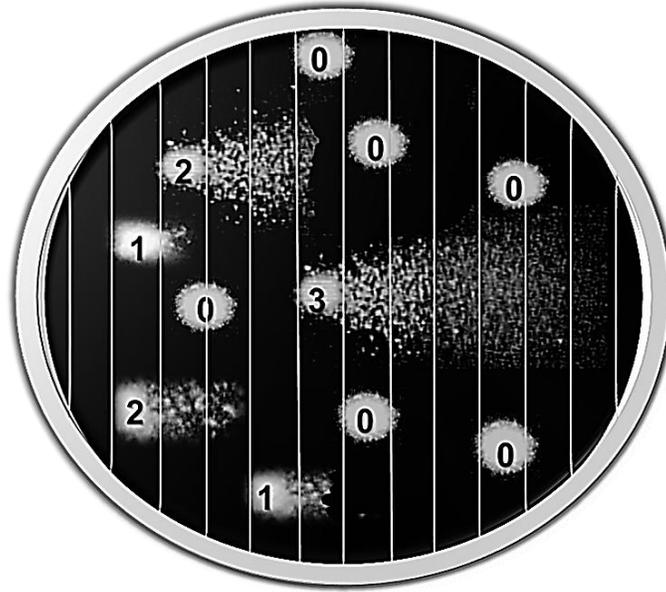


Figura 14. Clasificación de las moléculas del DNA en categorías.

La puntuación se obtiene sumando el resultado de la multiplicación del número de células en cada categoría por el valor de la categoría (tabla 1). El valor más alto de puntuación que se puede obtener es de 300, considerando que las 100 moléculas de DNA que se analizan se encuentran en la categoría 3.

Tabla 1. Obtención de la puntuación de daño al DNA

	CATEGORÍAS				PUNTUACIÓN
	0	1	2	3	
MOLÉCULAS DE DNA	53	15	18	14	93

Interpretación de resultados

Se realizan las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, dependiendo de los resultados se realiza un análisis paramétrico para comparar las medias aritméticas o un análisis no paramétrico para comparar las medianas entre los grupos de individuos analizados, mediante un programa estadístico como el SPSS o el Sigma Plot.

LITERATURA

- Anderson, D., Dobrzynska, M. M., Basaran, N., Basaran, A., Yu, T. 1998. Flavonoids modulate comet assay responses to food mutagens in human lymphocytes and sperm. *Mutation Research* 402(1-2):269-77.
- Avishai, N., Rabinowitz, C., Moiseeva, E., Rinkevich, B. 2002. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. *Mutation Research* 518(1):21-37.
- Bajpayee, M., Dhawan, A., Parmar, D., Pandey, A. K., Mathur, N., Seth, P. K. 2002. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline comet assay. *Mutation Research* 520(1-2):83-91.
- Belpaeme, K., Cooreman, K., Kirsch-Volders, M. 1998. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research* 415(3):167-84.
- Bichler, J., Cavin, C., Simic, T., Chakraborty, A., Ferk, F., Hoelzl, C., Schulte-Hermann, R., Kundi, M., Haidinger, G., Angelis, K., Knasmüller, S. 2007. Coffee consumption protects human lymphocytes against oxidative and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole acetate (Trp-P-2) induced DNA-damage: results of an experimental study with human volunteers. *Food and Chemical Toxicology* 45(8):1428-36.
- Codrington, A. M., Hales, B. F., Robaire, B. 2004. Spermiogenic Germ Cell Phase-Specific DNA Damage Following Cyclophosphamide Exposure. *Journal of Andrology* 25(3):354-362.
- Collins A. R., Dusinská, M., Horváthová, E., Munro, E., Savio, M., Stetina, R. 2001a. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. *Mutagenesis* 16(4):297-301.
- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinská, M., Kennedy, G., Stetina, R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research* 29:375(2):183-93.
- Collins, A. R., Dusinská, M., Horská, A. 2001b. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica* 48(3):611-4.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., Dobson, V. L. 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14(9):1733-1735.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology* 25:5-32.
- Dusinska, M. and Collins, A. R. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *in vivo Comet assay workgroup. Mutagenesis* 23:191-205.
- Gichner, T., Menke, M., Stavreva, D. A., Schubert, I. 2000. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the comet assay in tobacco and field beans. *Mutagenesis* 15(5):385-389.
- Giovannelli, L., Saieva, C., Masala, G., Testa, G., Salvini, S., Pitozzi, V., Riboli, E., Dolara, P., Palli, D. 2002. Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: a study in a Mediterranean population. *Carcinogenesis* 23(9):1483-9.
- 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(1):45-51.
- Jasso, P. Y., Espinosa-Reyes, G., González-Mille, D., Razo-Soto, I., Carrizales, L., Torres-Dosal, A., Mejía-Saavedra, J., Monroy, M., Ize, A., Yarto, M., Díaz-Barriga, F. 2007. An integrated health risk assessment approach to the study of mining sites contaminated with arsenic and lead. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3(3):344-350.
- Kapiszewska, M., Kalemba, M., Grzesiak, A., Koemba, K. 2005. The level of endogenous DNA damage in lymphocytes isolated from blood is associated with the fluctuation of 17 β -estradiol concentration in the follicular phase of healthy young women. *Acta Biochimica Polonica*, 52(2):535-539.
- Kopjar, N., Garaj-Vrhovac, V., Milas, I. 2002. Assessment of chemotherapy-induced DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer patients using the alkaline comet assay. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis* 22(1):13-30.
- Kruman, I. I., Kumaravel, T. S., Lohani, A., Pedersen, W. A., Cutler, R. G., Kruman, Y., Haughey, N., Lee, J., Evans, M., Mattson, M. P. 2002. Folic acid deficiency and homocysteine impair DNA repair in hippocampal neurons and sensitize them to amyloid toxicity in experimental models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 22(5):1752-1762.

- Lee, E., Oh, E., Lee, J., Sul, D., Lee, J. 2004. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological Sciences* 81:121-132.
- Machado, M. P., Filho, E. R., Terezan, A. P., Ribeiro, L. R., Mantovani, M. S. 2005. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined in vitro by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. *Toxicology in Vitro* 19:533-539.
- Martins de Oliveira, J., Jordao, B. Q., Ribeiro, L. R., Ferreira da Eira, A., Mantovani, M. S. 2002. Antigenotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 40:1775-1780.
- Olive, P. L. 1989. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiation Research* 117:79-92.
- Ostling, O. and Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communications* 123(1):291-298.
- Piperakis, S. M., Visvardis, E. E., Sagnou, M., Tassiou, A. M. 1998. Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis* 19:695-698.
- Rojas, E., Valverde, M., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 370:115-120.
- Salagovic, J., Gilles, J., Verschaeve, L., Kalina, I. 1996. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42(1-2):17-21.
- Singh, N. P. 2000. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research* 455:111-127.
- 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 Reserach* 175:84-191.
- Singh, N. P., Muller, C. H., Berger, R. E. 2003. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and Sterility* 80(6):1420-1430.
- Smith, T. R., Miller, M. S., Lohman, K. K., Case, L. D., Hu, J. J. 2003. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis* 24(5):883-889.
- Srám, R. J. and Binková, B. 2000. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. *Environmental Health Perspectives* 108(1):57-70.
- Thompson, H. J. 2006. Oxidative DNA Damage and Cancer Risk Assessment. *The Journal of Nutrition* 136(10):2693S-2694S.
- Thompson, H. J., Heimendinger, J., Diker, A., O'Neil, C., Haegele, A., Meinecke, B., Wolfe, P., Sedlacek, S., Zhu, Z., Jiang, W. 2006. Dietary botanical diversity affects the reduction of oxidative biomarkers in women due to high vegetable and fruit intake. *The Journal of Nutrition* 136(8):2207-2212.
- 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.
- Tomasetti, M., Alleva, R., Collins, A. R. 2001. In vivo supplementation with coenzyme Q10 enhances the recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage. *FASEB Journal* 15(8):1425-1427.
- Vaghef, H., Nygren, P., Edling, C., Bergh, J., Hellman, B. 1997. Alkaline single-cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a pilot study on breast cancer patients undergoing chemotherapy including cyclophosphamide. *Mutation Research* 395(2-3):127-38.
- Yañez, L., García-Nieto, E., Rojas, E., Carrizales, L., Mejía, J., Calderón, J., Razo, I., Díaz-Barriga, F. 2003. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environmental Research* 93:231-240.

**BIOENSAYO DE GENOTOXICIDAD:
INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS EN *Vicia faba***

**Libertad Juárez Santacruz
Laboratorio de Toxicología Ambiental**

INTRODUCCIÓN

En los estudios de monitoreo genotóxico es importante contar con biomarcadores de gran sensibilidad y bajo costo que permitan aplicarse a diferentes tipos de muestras o poblaciones.

Los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), son transposiciones simétricas en un mismo locus entre las cromátidas de un cromosoma que no producen alteraciones estructurales (Wolff, 1977; Tucker y Preston, 1996; Norppa, 2004). La frecuencia de ICH es utilizada como indicador del daño producido al material genético, se producen durante la síntesis de DNA y se presume que pueden ser la consecuencia de errores en el proceso de replicación,

El análisis de los ICH se realiza a partir de un método de tinción diferencial, que permite detectarlos aun cuando el segmento que intervenga en ellos sea muy pequeño. Esta técnica se basa en incorporar un análogo de la timidina (Thd), el nucleósido halogenado 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) al DNA durante dos ciclos de división, de este modo se obtiene una proporción máxima de células en metafase de segunda división. La técnica de tinción permite diferenciar DNA no substituido, unifilarmente substituido (cromátidas se tiñen con un tono oscuro) y bifilarmente substituido (una cromátida se tiñe en tono claro) (Tempelaar *et al.*, 1982).

Los ICH no representan situaciones letales para la célula, además, por sí mismos, no pueden ser considerados mutaciones debido a que no producen cambios en la información genética; sin embargo, se ha observado que la frecuencia de ICH aumenta cuando las células son expuestas a agentes mutagénicos y cancerígenos conocidos (Erdem *et al.*, 2012).

Los ensayos con ICH proporcionan el índice más sensible para detectar el daño genético inducido por una amplia gama de contaminantes ambientales genotóxicos (Tucker y Preston, 1996).

OBJETIVO

Evaluar el daño al DNA generado por contaminantes con potencial genotóxico presente en matrices ambientales (agua, suelo o sedimento).

EQUIPO

Agitador magnético
Balanza analítica
Baño de recuperación (agua y aireación constante)
Baño María
Microscopio óptico
Potenciómetro
Ultracongelador

MATERIAL

Algodón
Bisturí
Charola de plástico
Cristalizadores 80 x 40 mm
Cristalizadores 190 x 100 mm
Cubreobjetos 22 x 22 mm
Hielo seco
Matraz aforado de 10 100 y 1 000 ml
Micropipeta de 5 y 100 μ l
Papel filtro
Pipetas Pasteur
Portaobjetos 26 x 76 mm
Tubos de ensayo de 5 ml
Tubos de vidrio de 5 ml con tapón de rosca

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. De catalogo
5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU)	SIGMA	B5002
Ácido acético	J.T. BAKER	9508-02
Ácido cítrico	J.T. BAKER	0110-01
Ácido clorhídrico (HCl)	J.T. BAKER	9530-33
Bálsamo de Canadá	SIGMA	
Butanol	J.T. BAKER	9054-01
Citrato de sodio	J.T. BAKER	3646-01
Colchicina	SIGMA	C-3915
Etanol	J.T. BAKER	B5924-03
5-Fluoro-2'-desoxiuridina (FdU)	SIGMA	F-0503
Fucsina básica	J.T. BAKER	B660-03
Metabisulfito de sodio	J.T. BAKER	3552-01
Pectinasa	Fluka	17389
Uridina (U)	SIGMA	U-3750

PREPARACIÓN DE REACTIVOS**Ácido acético 45 %**

Para preparar 100 ml se mezclan 45 ml de ácido acético con 55 ml de agua destilada, la mezcla se guarda en frasco de vidrio transparente a temperatura ambiente.

Ácido clorhídrico al 5 N

En un matraz aforado de 100 ml se agregan 30 ml de agua destilada, posteriormente se añaden poco a poco 16 ml de HCl, añadir agua destilada hasta el aforo y agitar. Guardar en frasco de vidrio en el refrigerador; hasta que la mezcla se agote.

Ácido clorhídrico 0.15 N

Para preparar 100 ml, en un matraz aforado se agregan 30 ml de agua destilada, posteriormente se agregan poco a poco 600 µl de HCl se añade agua destilada hasta el afo-

ro, se agita suavemente y se guarda en frasco de vidrio a temperatura ambiente.

Buffer de citratos pH 4.7

Se preparan soluciones al 0.01 M de ácido cítrico, para lo cual se pesaron 0.192 g y 0.294 g de citrato de sodio, se disuelve cada reactivo por separado en 100 ml de agua destilada, después se mezclan partes proporcionales de cada uno hasta ajustar el pH a 4.7. Esta solución se prepara al momento de utilizarla.

Etanol al 70 %

Mezclar 70 ml de etanol con 30 ml de agua destilada.

Etanol-ácido acético 3:1

Se mezclan 3 volúmenes de etanol y 1 de ácido acético (v/v), se mantiene en refrigeración.

Pectinasa al 2 %

En un matraz aforado de 100 ml colocar 2 g de pectinasa y aforar con buffer de citratos pH 4.7; disolver suavemente evitando la formación de espuma (preparar en el momento sólo el volumen a utilizar, no almacenar).

Reactivo de Schiff

Mezclar 100 ml de HCl 0.15 N, 1.9 g de metabisulfito de sodio y 0.35 g de fucsina básica agitar por 2 h, añadir 0.5 g de carbón activado, agitar por 15 min. Filtrar con papel filtro grueso humedecido con HCl y guardar en frasco ámbar en el refrigerador.

Solución de análogos

La solución de análogos debe contener 100 μM de BrdU, 0.1 μM de FdU y 5 μM de U. En un matraz aforado de 10 ml mezclar 0.0025 g de FdU con agua destilada. De ésta se toman 100 μl y junto con 0.31 g de BrdU y 0.0013 g de U se colocan en un matraz aforado de 1 L. Aforar con agua destilada y guardar en el refrigerador en frasco de vidrio color ámbar. Evitar la presencia de luz, incluso en la preparación de la solución.

METODOLOGÍA

Preparación y germinación de las semillas

Siga el mismo procedimiento descrito para el ensayo de MN.

Exposición

Tubos de ensayo de 5 ml se llenan con solución de análogos, y en cada uno se coloca una semilla germinada, todo en condiciones de oscuridad a una temperatura de 20 °C durante 20 h para un primer ciclo de división (figura 1).

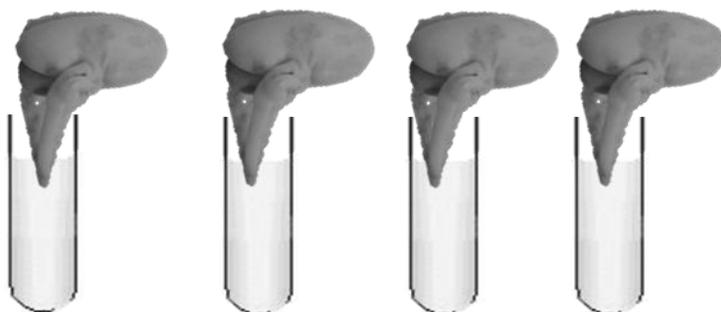


Figura 1. Exposición en solución de análogos.

Transcurrido el tiempo, las raíces de las plántulas son expuestas a soluciones frescas de las sustancia (metales, plaguicidas, etc.) o matriz ambiental (agua, suelo o sedimento) a evaluar, la cual se coloca en cristalizadores tapados con papel aluminio perforado con la pinta de un lápiz (figura 2).



Figura 2. Exposición en solución a evaluar.

El tiempo de exposición depende del tipo de contaminante, si es metal 1 h; plaguicidas, 2 h; y aguas contaminadas, 3 h (Gómez-Arroyo y Villalobos Pietrini, 1995). Transcurrido el tiempo de exposición se colocan en una solución nueva de análogos durante 20 h para un segundo ciclo de división (figura 1).

Posteriormente, se cortan aproximadamente 5 mm de los meristemos apicales y se colocan en colchicina al 0.05 % durante 3 h, luego se elimina y se adiciona ácido acético al 100 % por una hora; finalmente se colocan en etanol-ácido acético 3:1 y se introducen al congelador por 2 días como mínimo (figura 3).

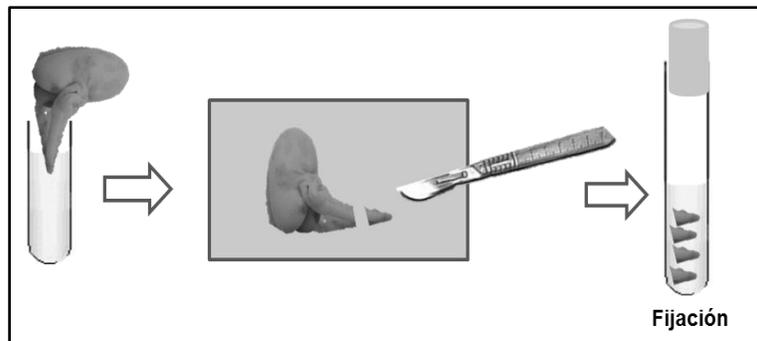


Figura 3. Corte de meristemos y fijación en etanol-ácido acético 3:1.

Tinción

La tinción se realiza mediante la técnica de tinción diferencial de Feulgen descrita por Tempelaar *et al.* (1982). Los meristemos radicales de *V. faba* se colocan en etanol al 70 % por 10 min a 28 °C, se hidrolizan con HCl 5 N en baño María a 28 °C durante 80 min. Se enjuagan 3 veces con agua destilada dejando 5 min de reposo entre cada lavado, se secan con papel absorbente y se tiñen con reactivo de Schiff durante 20 min en la oscuridad. Pasado este tiempo se colocan en pectinasa al 2 % durante 2 h a 28 °C en baño María; posteriormente se decoloran ligeramente en ácido acético al 45 % frío (4 °C) durante 10 min; finalmente se pasan a etanol al 70 % frío y se introducen al congelador por 30 min (figura 4).

Los meristemos se colocan uno a uno sobre portaobjetos, se le agrega una gota de ácido acético al 45 %, se coloca un cubreobjetos y con la goma de un lápiz se realiza el aplastamiento del tejido en monocapa y se introducen al congelador.

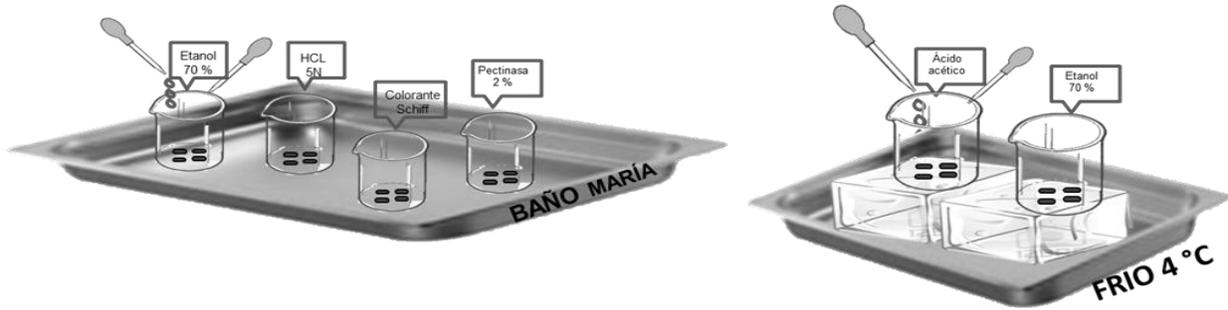


Figura 4. Proceso de tinción de ICH.

Montaje

Para realizar las preparaciones permanentes los cubreobjetos con tejido se colocan sobre hielo seco para que se congele y se adhiera el tejido al portaobjetos. Se desprende el cubreobjetos con un bisturí, las laminillas se pasan por dos cajas Coplin que contienen butanol absoluto (3 min en cada una), se retiran de la caja y cuidando de no tocar el tejido se seca el exceso de butanol. Colocar una gota de bálsamo de Canadá sobre el tejido y colocar un cubreobjetos nuevo, dejar secar a temperatura ambiente.

Análisis al microscopio

El análisis de los ICH se realiza en 25 células en metafase para cada experimento y su réplica. Debido a que sólo se obtienen unas cuantas metafases unidas, el análisis se realiza en 250 cromosomas subacrocentricos y 50 metacéntricos (figura 5), los cuales representan las 25 metafases requeridas.

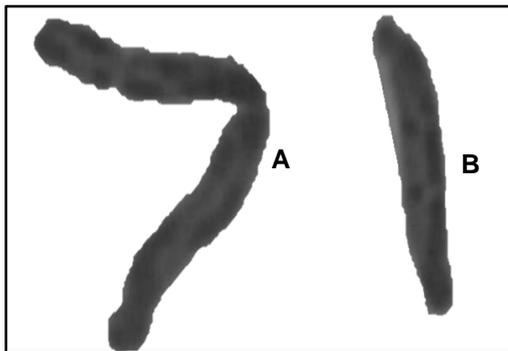


Figura 5. Tipos de cromosomas de *Vicia faba*
A) metacéntrico,
B) subacrocentrico

Se cuentan los intercambios terminales y los intercambios intersticiales, considerando a los terminales como un solo evento debido a que para su formación, la cadena de DNA sólo se rompe una vez; y los intersticiales como dos eventos porque la cadena de DNA se fragmenta en dos ocasiones (figura 6).



Figura 6. Cromosomas subacrocéntricos: (A) intercambio terminal, (B) intercambio intersticial.

Expresión de resultados

Para determinar si las muestras analizadas son o no genotóxicas, se comparan los valores promedio de la frecuencia de ICH del grupo expuesto contra el testigo negativo, se le aplica una t-student con una significancia de $p < 0.05$.

LITERATURA

- Erdem, O, Sayal, A, Eken, A, Akay, C, Aydın, A. 2012. Evaluation of genotoxic and oxidative effects in workers exposed to jet propulsion fuel. *Int Arch Occup Environ Health*. 85(4): 353-361.
- Gómez-Arroyo, S. y Villalobos-Pietrini, R. 1995. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in *Vicia faba* as genetic monitors of environmental pollutants. *En Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Eds by F.M. Butterworth *et al.* New York. 95-113.
- Norppa, H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.* 149, 309-334
- Tempelaar, M.J., de Both, M.T.J. y Versteegh, J.E.G. 1982. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutation Research*. 103: 321-326.
- Tucker, J.D. y Preston, J.R. 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research*. 365: 147-159.
- Wolff, S. 1977. Sister chromatid exchanges. *Ann Rev. Genet.* 11: 183-201

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD BÁSICA DE LA MADERA

Eunise M. Zamora Campos

Laboratorio de Ecología Forestal

INTRODUCCIÓN

El crecimiento en diámetro de los árboles se debe principalmente a la formación periódica de capas de células de xilema, el cual en términos botánicos significa madera y está constituido por tres tipos de células alargadas: traqueidas, elementos vasculares o vasos y fibras. En su madurez transporta agua y sales inorgánicas en forma ascendente desde la raíz a toda la planta y proporciona soporte mecánico gracias a que está lignificado.

La madera está constituida por dos componentes bien diferenciados: i) la capa de *madera temprana* que se forma al inicio de la estación de crecimiento (primavera) y se caracteriza por presentar células anchas con pared celular delgada, y ii) la capa de *madera tardía* que produce células con paredes sustancialmente engrosadas pero con dimensiones radiales más angostas, durante y al final de la estación de crecimiento (verano) (Larcher, 1995; Kozłowski y Pallardy, 1996; Vavrčík, 2002, citado por Přemyslovská, *et al.*, 2007). Debido a las discontinuidades de los tipos de células, la madera no es homogénea y los anillos anuales de crecimiento son los que mejor ejemplifican dichas discontinuidades, pues cada anillo contiene ambas capas. El crecimiento en diámetro de los árboles de zonas templadas está caracterizado por un solo anillo (figura 1). En muchas zonas del bosque tropical es difícil de llevar a cabo la diferenciación de los anillos de crecimiento, ya que las estaciones no están marcadas (García *et al.*, 2003).

La madera es un recurso renovable con infinidad de usos. Sus propiedades físicas y mecánicas la hacen uno de los materiales estructurales, combustibles o celulósicos más importantes. Dichas propiedades son definidas por su estructura anatómica y densidad, al tiempo que reflejan todos los factores ambientales y genéticos que operan sobre un árbol en el transcurso de su vida (Přemyslovská, *et al.* 2007).

La densidad de la madera se define como el peso en relación con su volumen y se expresa como g/cm^3 o kg/m^3 (Zobel y Talbert, 1988). Sus valores pueden ser inferior-



Figura 1. Corte mostrando la médula, madera temprana (franja clara) y tardía (franja oscura) componentes de cada anillo de crecimiento anual en las especies leñosas.

res a 0.2 o superiores a 0.86 g/cm³, calificando a las maderas como livianas o pesadas con un amplio rango de variaciones (tabla 1).

Densidad básica (g/cm³)	Clasificación
Menor de 0.20	Extremadamente liviana
0.20 - 0.25	Excesivamente liviana
0.25 - 0.30	Muy liviana
0.30 - 0.36	Liviana
0.36 - 0.42	Moderadamente liviana
0.42 - 0.50	Moderadamente pesada
0.50 - 0.60	Pesada
0.60 - 0.72	Muy pesada
0.72 - 0.86	Excesivamente pesada
0.86 - o más	Extremadamente pesada

La importancia de la densidad radica en ser un excelente indicador del comportamiento de la madera durante los distintos procesos de transformación, de la capacidad para conducir corriente eléctrica, de la resistencia mecánica general, elasticidad, trabajabilidad, calidad de los acabados, rendimiento en la elaboración de pulpa y papel, de las unidades caloríficas generadas al utilizarla como combustible y es un dato trascendental para realizar cálculos relacionados con su transporte (Fuentes, 1995).

Gracias a la estrecha relación entre las características mecánicas y la densidad, esta última propiedad de la madera constituye un excelente criterio de evaluación tecnológica (Jovanovski, *et al.*, 2002). Por ejemplo, las especies o individuos que tienen una densidad igual o mayor a la denominada madera moderadamente liviana son útiles como materia prima para la producción de papel kraft o papeles de empaque, aquellos correspondientes a maderas desde moderada hasta extremadamente pesadas son ideales para la producción de madera sólida destinada al aserrío, chapa para triplay, postes, vigas y otros productos estructurales y especiales para la construcción. Por último, los árboles con densidades de 0.36 g/cm^3 e inferiores son ideales en la elaboración de papel periódico y pulpa para papel (Landrach, 1986).

Así mismo, la madera es un depósito importante de los gases de efecto invernadero (GEI) y contribuye al almacenamiento de carbono en el suelo a través de la acumulación de materia orgánica (en forma de fustes, corteza, ramas y ramillas, etc.). El almacenamiento y la fijación del carbono es uno de los servicios ambientales de los ecosistemas forestales que se produce durante la fotosíntesis, por lo que la vegetación constituye un sumidero de carbono (Dávalos *et al.*, 2008). Para calcular el almacenamiento de carbono se precisa, a) la densidad de la madera y, b) el tipo de vegetación (por ejemplo bosque tropical, templado, mesófilo de montaña, de galería, etc.) (Calero, 2008).

La densidad de la madera es susceptible de ser manejada no solo en términos de interés industrial sino también de conservación, gracias a la fuerte influencia genética que opera sobre el metabolismo del árbol, específicamente con su crecimiento en diámetro y está cerca de ser la ideal para manipularse genéticamente debido a la variación que existe de un árbol a otro, a su heredabilidad ($h^2 = 0.5 - 0.7$ en coníferas), a su mínima interacción genotipo-ambiente y a sus efectos sobre el rendimiento y la calidad

de la madera (Panshin y De Zeeuw, 1980). Entre las estrategias que pueden seguirse para mejorar o controlar las cualidades de la madera y obtener buenas ganancias se encuentran: a) la selección de especies, b) de procedencias, c) de árboles individuales y el entrecruzamiento de los mejores árboles (Zobel y Talbert, 1988).

OBJETIVO

Determinar la densidad de la madera mediante el método de máximo contenido de humedad.

EQUIPO

Taladro de Pressler
 Balanza analítica
 Horno de secado
 Desecador
 Pinzas

MATERIAL

Bolsas de polietileno de 2 kg	Contenedores plásticos individuales (popotes)
Cinta masking tape	Marcador indeleble punto fino
Etiquetas	Marcador indeleble punto grueso
Exacto (cutter)	Perforadora
Muestras de madera/virutas	Recipiente plástico de 40 L, como mínimo
Papel aluminio	Sílica

METODOLOGÍA

Muestreo

En el caso de muchas coníferas, la altura de muestreo es de importancia fundamental y el sistema que más se utiliza es a 1.3 m de altura (Dap).

En una población de árboles, debe muestrearse un mínimo de 30 árboles para poder obtenerse un valor promedio significativo (Zobel y Talbert, 1988); sin embargo cuando se integran criterios de selección del arbolado (rectitud del fuste, calidad de copa, ángulo de las ramas, entre otras), el tamaño de muestra dependerá del número de individuos que puedan reunirlos.

Para la obtención de muestra se utiliza un taladro de Pressler con diámetro interior de 5 mm (figura 2). La broca hueca se introduce en el tronco del árbol en pie (árbol que no ha sido derribado) estimando llegar un poco más allá de la médula. El taladro se gira con sumo cuidado para evitar dañar la broca (figura 3).

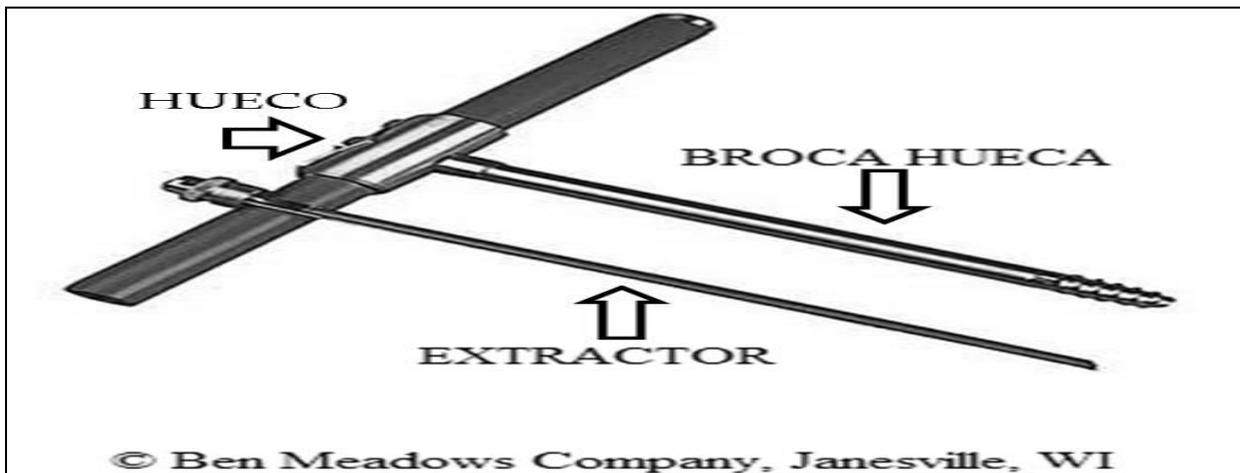


Figura 2. Taladro de Pressler y sus componentes.



Figura 3. Extracción de muestras de madera de un árbol en pie.

El extractor se introduce en el hueco del taladro y con un giro en sentido contrario al que se realizó para barrenar el tronco, se corta la muestra y esta sale junto con el extractor (figura 4).



Figura 4. Muestra de madera obtenida con el taladro de Pressler.

Una vez obtenida la muestra o viruta se almacena en contenedores plásticos individuales (popotes), se etiquetan adecuadamente, se sellan los extremos con cinta masking tape y se traslada al laboratorio.

Determinación de la densidad de la madera

Obtención del peso saturado de las muestras.

Las bolsas plásticas se perforan con un exacto o perforadora y se etiquetan con los datos de la muestra que va a contener, usando el marcador indeleble punto grueso. Las muestras de madera o virutas se retiran cuidadosamente de los contenedores donde se almacenaron, se separa la porción completa de la médula a la periferia o de los años que se deseen evaluar (figura 5), se elimina la corteza, se cuentan y registran los anillos de crecimiento (figuras 6 y 7), para tener el control de las edades que se están ma-

nejando lo cual ayuda a inferir condiciones ambientales sobre el crecimiento del árbol. Por último, las muestras se etiquetan con ayuda del marcador punto fino, para ser aseguradas dentro de las bolsas.



Figura 5. Separación de la porción que va de la médula a la corteza.



Figura 6. Conteo de anillos de crecimiento.



Figura 7. Retirado de la corteza.

Las bolsas conteniendo las muestras se colocan en el recipiente plástico el cual deberá estar lleno con agua del grifo a su máxima capacidad y, cuidando que las virutas no se trocen, deberán sumergirse vigilando que cada bolsa esté llena de agua para que los trozos de madera se hidraten hasta su máxima capacidad (figura 8).



Figura 8. Muestras en imbibición.

A partir de que las muestras bajen al fondo del recipiente se considerarán saturadas. El hecho de que las muestras alcancen un peso constante, deberá ser ratificado a través de pesar periódicamente (cada tercer día) tres muestras al azar. Las virutas deberán ser manipuladas con pinzas en todo momento, secarse rápidamente sobre sa-nitas (figura 9) para proceder a su pesado tras lo cual se reintegrarán a su respectiva bolsa y al contenedor. Durante este periodo, deberá sustituirse el agua semanalmente a fin de evitar contaminación por hongos.

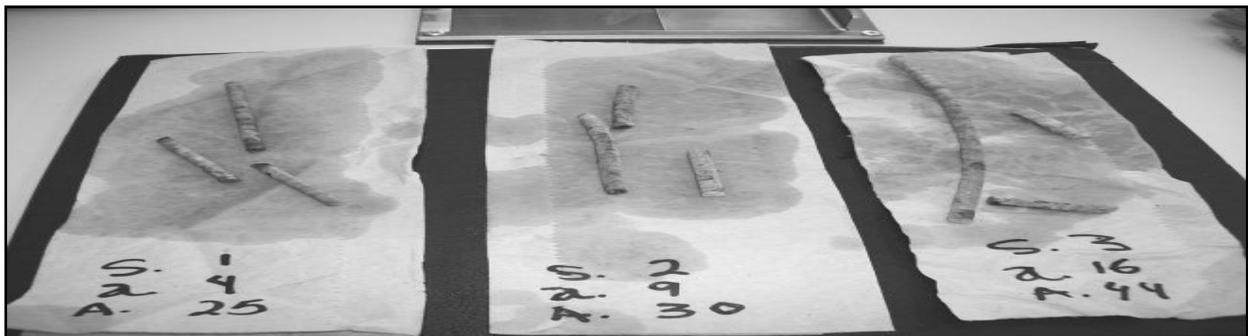


Figura 9. Secado de muestras para su pesado.

Saturadas, las muestras se pesan en una balanza analítica con aproximación a diezmilésimos de gramo (figura 10) y se registra el valor del peso saturado obtenido por muestra.



Figura 10. Obtención de peso saturado.

Obtención del peso anhidro de las muestras.

Las virutas se retiran de las bolsas, se colocan en charolas que deberán elaborarse con papel aluminio de tamaño adecuado y etiquetarse apropiadamente (figura 11), para ser introducidas en un horno de secado a temperatura de 100 ± 5 °C por 5 días (figura 12), a fin de retirar el toda el agua y la madera alcance nuevamente un peso constante, lo cual será comprobado también a través de pesadas sucesivas hasta que los valores varíen en ± 0.0010 g. Las virutas que se elijan para este fin deberán manipularse con pinzas e introducirse en un desecador con sílica en su interior (figura 13), para evitar que las muestras absorban humedad del ambiente se requiere que todo el proceso se realice lo más rápida y cuidadosamente posible.

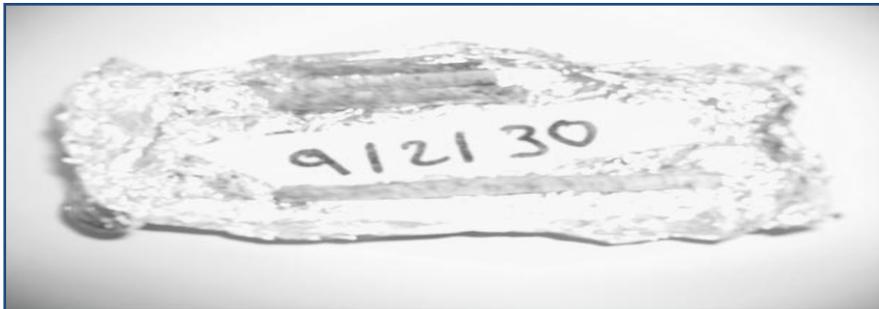


Figura 11. Muestras sometidas a deshidratación.



Figura 12. Muestras dentro del horno.



Figura 13. Muestras secas listas para ser pesadas.

Cálculo de la densidad básica de la madera.

Una vez que se cuenta con los valores de peso saturado y peso anhidro de las muestras es posible obtener el valor de densidad de cada muestra empleando la fórmula del método del máximo contenido de humedad (Smith, 1956, citado por: Valencia y López, 1999).

$$Dm = \frac{1}{\frac{Ps - Pa}{Pa} + 1.53}$$

Donde:

Dm = Densidad de la madera (g/cm³)

Ps= Peso saturado (g)

Pa = Peso anhidro (g)

1.53 = Constante de la gravedad específica de la madera

El resultado obtenido podrá emplearse directamente en la selección de individuos con los valores deseados para la implementación de un programa de mejoramiento genético. También es útil para determinar la variación de esta característica en rodales naturales o plantaciones a través de la aplicación de una ANOVA, dato que servirá para tomar decisiones de manejo productivo o de conservación de rodales.

LITERATURA

- Calero, B. W. A. 2008. Producción e incrementos de madera y carbono de laurel (*Cordia alliodora*) y cedro amargo (*Cedrela odorata* L.) de regeneración natural en cacaotales y bananales indígenas de Talamanca, Costa Rica. Consultado el 14 de noviembre de 2011, de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2386e/A2386e.pdf>
- Dávalos, R., Rodríguez, M. I., Martínez, E. 2008. Almacenamiento de carbono. En: Manson, R., Hernández, O., Gallina, S. y Mehtltreter, K. (Eds). Agroecosistemas cafetaleros de Veracruz. INESEMARNAT México. Pp. 223-233.
- Fuentes, S. M. 1995. Tecnología de la madera II: Propiedades físico-mecánicas. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 120 p.
- García, L., Guindeo, A., Peraza, C., De Palacios, P. 2003. La madera y su anatomía. Editorial Mundiprensa. Madrid, España. 327 p.
- Jovanovski, A., Jaramillo, M., Loguerdocio, G., Antequera, S. 2002. Densidad de la madera de *Pinus ponderosa* (Dougl. Ex Laws) en tres localidades de Argentina. Bosque 23(2): 99-104.
- Kozlowski, T. T. y Pallardy, S. G. 1996. Physiology of woody plants. 2a edición. Academic Press. 411p.
- Landrach, E. 1986. Control de las propiedades de la madera en plantaciones con especies exóticas. Informe de investigación No. 106. Cartón de Colombia, S. A. Cali, Colombia. 12 p.
- Larcher, W. 1995. Physiological plant ecology. Ecophysiological and stress physiology of functional groups. 3a edición. Springer. 506 p.
- Panshin, A. y De Zeeuw. 1980. Textbook of wood technology. 4th edition. Mc Graw-Hill. New York. U.S.A
- Přemyslovská, E., Šlezingerová J., Rybníček, M., Gryc, V., Vavrčík, H., Praus, L. 2007. Basic density of wood in different forest type. In: Přemyslovská, K., Škvrenina, J. & Blaženec, M. (eds.): Bioclimatology and natural hazards. International Scientific Conference, Pol'ana nad Detvou, Slovakia. September 17-20, 2007.
- Valencia, S., y López, F. 1999. Variación de la densidad de la madera dentro y entre árboles de *Pinus rudis* Endl., en Sierra Las Alazanas, Arteaga, Coah. Foresta-AN. Nota Técnica No. 1. UAAAN. Saltillo, Coah. 17 p.
- Zobel, B. y Talbert J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Editorial Limusa. México D.F. 545 p.

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA Y TOMATE

Elizabeth García Gallegos

Laboratorio de Fertilidad de Suelos

INTRODUCCIÓN

El creciente desarrollo industrial y urbano ha originado la aparición de una cantidad importante de problemas originados por la contaminación ambiental, lo cual afecta a los integrantes del ecosistema. Existe un número importante de sustancias químicas utilizadas en las distintas fases de la producción manufacturera industrial. El principal problema que se tiene en el diseño de las estrategias para prevenir la contaminación, es la falta de información sobre la toxicidad de los productos químicos que se liberan al ambiente. Un instrumento alternativo para determinar su toxicidad es el empleo de bioensayos (Navarro *et al.*, 2006).

La prueba de toxicidad aguda con semillas es un bioensayo que evalúa el efecto de compuestos puros (nitrato de plomo, cloruro de cadmio, entre otros) y mezclas complejas presentes en matrices ambientales (agua residual, suelo, entre otras) mediante la evaluación de la germinación y el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Además permite determinar la inhibición de la germinación, así como el alargamiento de la radícula y el crecimiento del hipocótilo de las plántulas (figura 1). Estos dos últimos efectos constituyen indicadores subletales muy sensibles y aportan información complementaria al efecto de la germinación (Sobrero y Ronco, 2004). Este bioensayo se puede realizar con cualquier especie vegetal que esté fácilmente disponible, que germine y crezca rápidamente.

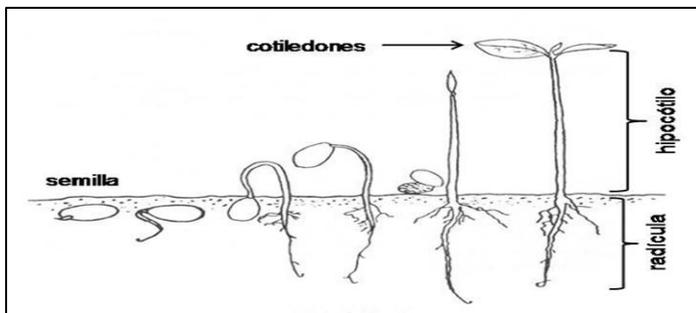


Figura 1. Proceso de germinación de una semilla dicotilédnea
<http://www.sian.inia.gob.ve>.

La más empleada es la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*) por ser particularmente sensible, aunque también existen reportes sobre el empleo de especies como garbanzo (*Cicer arietinum*); frijol (*Phaseolus vulgaris*); trigo (*Triticum aestivum*); tomate (*Lycopersicon esculentum*); lenteja (*Lens culinaris*); haba (*Vicia faba*); escarola silvestre (*Cichorium endivia*); achicoria común (*Cichorium intybus*); frijol chino o chícharo silvestre (*Vigna unguiculata*); chícharo (*Pisum sativum*); sorgo (*Sorghum vulgare*) y leguminosa de la India o frijol month (*Vigna aconitifolia*) (Kaushik *et al.*, 2005; Garg y Kaushik, 2006; Navarro *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2006; Segundo *et al.*, 2009 y Panaskar y Pawar, 2011).

La prueba de toxicidad aguda con semillas ha sido recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA), porque permite comparar cuantitativamente el crecimiento de la radícula con la germinación de las semillas la cual presenta un alto coeficiente de variación (Prieto *et al.*, 2009). Se ha empleado para evaluar la toxicidad del metilmercurio (Álvarez *et al.*, 2006); de efluentes de la industria citrícola y de la destilería de alcohol de melaza de caña de azúcar (Navarro *et al.*, 2006); de biosólidos (Celis *et al.*, 2007); de efluentes del preteñido de tenería (Tayyar y Nail, 2009), y de aguas residuales de la industria textil (Panaskar y Pawar, 2011). Kaushik *et al.* (2005) mencionan que puede ser utilizado para establecer criterios de calidad ambiental, controlar descargas de aguas residuales, regular el uso y la producción de sustancias químicas y para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental. Hoy en día dichas actividades se regulan empleando únicamente análisis fisicoquímicos, sin tomar en cuenta los efectos biológicos. Es importante complementar dichos análisis con bioensayos de toxicidad aguda para determinar los efectos sobre el ecosistema (Torres *et al.*, 2006).

OBJETIVO

Determinar la toxicidad aguda del agua residual de la industria textil a través de la inhibición de la germinación, alargamiento de la radícula y del crecimiento del hipocótilo en semillas de lechuga y tomate.

EQUIPO

Refrigerador
 Balanza analítica

MATERIAL

Agrolita	Piseta
Arena	Probetas de 1 L
Cuaderno de notas	Recipientes de plástico 1 y 3 kg.
Germinador	Regla graduada en centímetros
Invernadero	Toallas de papel
Lápiz	Vasos de precipitado 1 y 1.5 L
Pala de plástico	Semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)
Pinzas de disección	Semillas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)

REACTIVOS

Agua destilada
 Agua residual de la industria textil

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Para la preparación de las diluciones, utilizar guantes de látex. Una vez preparadas las diluciones vaciarlas en botellas de plástico y mantenerlas en refrigeración a 4 °C por el tiempo que dure el bioensayo.

Agua residual al 100 %

A partir del agua residual se realizan las diluciones al 50, 25, 12.5 y 6.25 %, considerando un factor de dilución de 0.5 (Garg y Kaushik, 2006). Con una probeta medir 500, 250, 125 y 62.5 ml de agua residual y aforar a 1 L con agua destilada. Mezclar ambos en un vaso de precipitado de 1.5 L. El testigo negativo es de agua destilada.

METODOLOGÍA

Antes de establecer el bioensayo de toxicidad aguda, es necesario verificar que los lotes de semilla tanto de lechuga como de tomate sean de buena calidad, para ello se recomienda comprobar mediante una prueba de viabilidad de semillas, en donde el porcentaje de germinación debe ser superior al 85 %.

Preparación del sustrato de soporte

Se elabora una mezcla de agrolita:arena en proporción (1:1 v/v). Se mide en recipientes de plástico por separado 1 L de agrolita y 1 L de arena, luego se mezclan en otro recipiente (figura 2). La mezcla se utiliza para llenar cada cavidad de los germinadores.

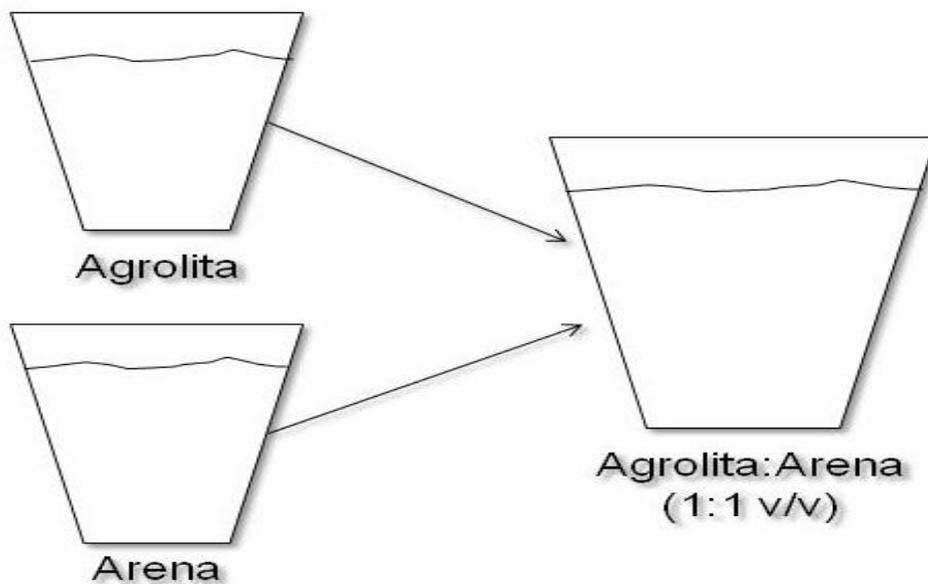


Figura 2. Preparación del sustrato para establecer la prueba.

Siembra de semillas

El bioensayo se establece de preferencia en invernadero, los germinadores se etiquetan de acuerdo a la dilución, número de repetición y testigo, el tipo de semilla, además de la fecha. Se rellenan los germinadores con 10 g de sustrato y se les aplica un riego de 10 ml de cada dilución y el testigo se riega con 10 ml de agua destilada. Las semillas

(5 para cada dilución y 5 para el testigo; por cada una de las especies vegetales empleadas) se colocan con la ayuda de una aguja de disección, procurando que queden a 5 mm de profundidad (figura 3). El riego se realiza diario con 10 ml de la dilución correspondiente.

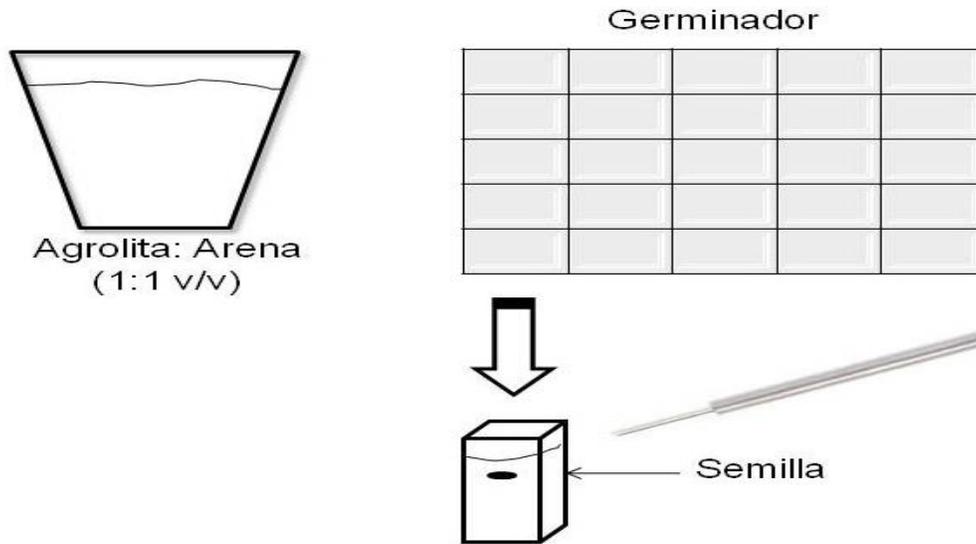


Figura 3. Siembra de semillas.

Porcentaje de germinación

A las 120 h (5 días) se cuenta el número de semillas germinadas de lechuga y tomate (tabla 1), para luego calcular el porcentaje de germinación como se indica a continuación:

$$\% G = \frac{SG}{ST} \times 100$$

Donde:

G = germinación

SG = semillas germinadas

ST = semillas totales

Tabla 1. Número de semillas germinadas (a manera de ejemplo)

SEMILLAS DE LECHUGA				SEMILLAS DE TOMATE			
Días	Agua residual (%)	Repetición	Germi-nación	Días	Agua residual (%)	Repetición	Germi-nación
1	100	1		1	100	1	
1	100	2		1	100	2	
1	100	3		1	100	3	
1	100	4		1	100	4	
1	100	5		1	100	5	
1	50	1		1	50	1	
Continúa.....				Continúa.....			

Medición de radícula e hipocótilo

Transcurridos 10 días (240 h) después de la siembra, se extrae con cuidado cada una de las plántulas de lechuga y tomate, posteriormente se colocan sobre una base plana para extenderlas y se mide la radícula y el hipocótilo con el apoyo de una regla graduada en mm (figura 4), se anotan los datos como se indica en la tabla 2.

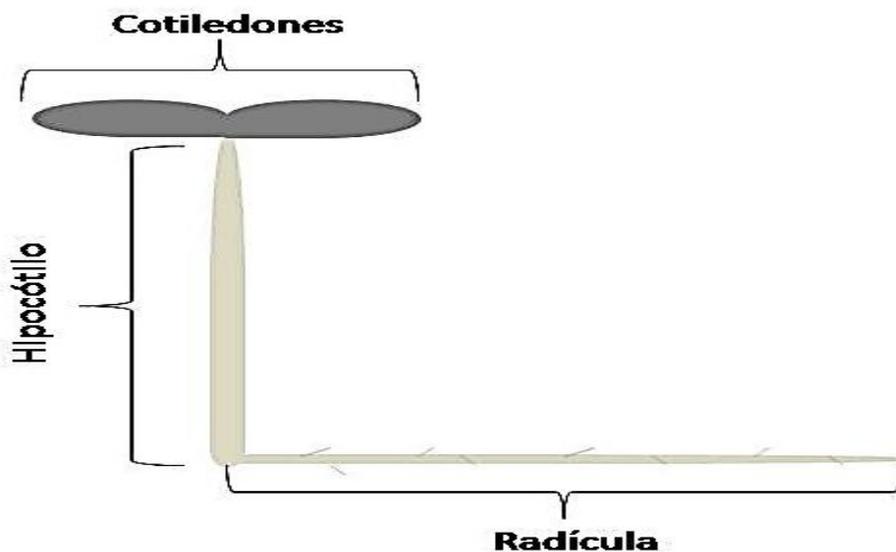


Figura 4. Esquema de la radícula y el hipocótilo de dicotiledóneas.

Tabla 2. Longitud de la radícula y el hipocótilo de plántulas de lechuga y tomate

LECHUGA				TOMATE			
Agua residual (%)	Repetición	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Agua residual (%)	Repetición	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
100	1			100	1		
100	2			100	2		
100	3			100	3		
100	4			100	4		
100	5			100	5		
50	1			50	1		
Continúa.....				Continúa.....			

Con los datos de la tabla 2 se calcula el porcentaje de inhibición del alargamiento de la radícula y del crecimiento del hipocótilo de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$IAR = \frac{D-T}{T} \times 100 \qquad ICH = \frac{D-T}{T} \times 100$$

Donde:

IAR = inhibición del alargamiento de la radícula

ICH = inhibición del crecimiento del hipocótilo

D = dilución

T = testigo

Una vez obtenidos los porcentajes anotarlos en la tabla 3. Posteriormente comparar los resultados con los siguientes enunciados descritos por Torres *et al.* (2006) para determinar si existe toxicidad.

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la radícula y crecimiento del hipocótilo de plántulas

LECHUGA				TOMATE			
Agua residual (%)	Repetición	Radícula (%)	Hipocótilo (%)	Agua residual (%)	Repetición	Radícula (%)	Hipocótilo (%)
100	1			100	1		
100	2			100	2		
100	3			100	3		
100	4			100	4		
100	5			100	5		
50	1			50	1		
Continúa.....				Continúa.....			

Si el resultado de la inhibición del alargamiento de la radícula o del crecimiento del hipocótilo, expresado en porcentaje presenta **signo negativo**, significa que:

El agua residual es tóxica, inhibe completamente el alargamiento de la radícula y el crecimiento de hipocótilo.

Si el resultado de la inhibición del alargamiento de la elongación de la radícula o del crecimiento del hipocótilo expresado en porcentaje presenta **signo positivo**, significa que:

El agua residual estimula el alargamiento de la radícula y el crecimiento del hipocótilo.

Si el resultado de la inhibición del alargamiento de la radícula o del crecimiento del hipocótilo expresado en porcentaje presenta un **valor de 0**, significa que:

El agua residual no es tóxica para el alargamiento de la radícula ni para el crecimiento del hipocótilo.

El procesamiento estadístico de la información se puede realizar con cualquier programa de análisis estadístico, que efectúe estadística descriptiva, análisis de varianza y prueba de medias (Tukey, Dunnet, etc.) al 95 % de confiabilidad.

LITERATURA

- Álvarez, M. M. D.; Mateos M. J.; Peinado de Diego M. V.; Capó M. M. A. 2006. *Vicia faba* L.: capacidad bioindicadora de contaminación de agua por metil mercurio. *Observatorio Medioambiental* 9: 111-123.
- Celis, J.; Sandoval M.; Briones. M. 2007. Bioensayos de fitotoxicidad de residuos orgánicos en lechuga y ballica anual realizadas en un suelo alfisol degradado. *Revista Ciencia del Suelo y Nutrición Vegetal* 7: 51-60.
- Garg, V. K.; Kaushik P. 2006. Influence of short-term irrigation of textile mill wastewater on the growth of chickpea cultivars. *Chemistry and Ecology* 22(3): 193-200.
- Kaushik, P.; Garg V. K.; Singh B. 2005. Effect of textile effluents on growth performance of wheat cultivars. *Bioresource Technology* 96: 1189-1193.
- Navarro, A. R.; Arrueta R. G.; Maldonado M. C. 2006. Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Revista de Toxicología* 23: 125-129.
- Panaskar, D. B. and Pawar R. S. 2011. Effect of textile mill effluent on growth of *Vigna unguiculata* and *Pisum sativum* seedlings. *Indian Journal Science Technology* 4: 266-272.
- Prieto G. F. 2009. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 10 (1): 29-44.
- Segundo, T. E.; Soto M. E. S.; Juárez S. L. F.; García N. E.; García G. E. 2009. Efecto del agua residual de la industria textil en el crecimiento radicular de *Lactuca sativa* y *Licopersicum esculentum*. Memorias de resúmenes del 8º Congreso Internacional, 14º Nacional de Ciencias Ambientales y 3er Congreso de Medio Ambiente.Tlaxcala. 1 al 5 Junio 2009. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (supl1), pp 1.
- Sobrero, M.C.; Ronco, A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En. G. Castillo (Ed). *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas*. (pp. 71-79). Ottawa, Canadá.
- Tayyar, S.; Nail A. Y. 2009. Seed germination characteristics of broad bean, lentil, and common bean irrigated with different dilution of pre-tanning effluents. *Interciencia* 34: 514-517.
- Torres R. M. T.; García M. M.; Hernández P. N. M.; Fernández, N. M. 2006. Toxicidad aguda de lixiviados acuosos mediante un ensayo con *Lactuca sativa* L. *Higiene Sanidad Ambiental* 6: 170-172.

ANÁLISIS DE LA GERMINACIÓN Y VIABILIDAD DE SEMILLAS FORESTALES

Oscar G. Vázquez Cuecuecha

Laboratorio de Ecología Forestal

INTRODUCCIÓN

Las semillas son de vital importancia en los procesos de regeneración de las poblaciones y comunidades forestales, ya que a través de ellas se renuevan los bosques tanto de forma natural como artificial (Niembro, 1995); de igual modo, son muy importantes para el mantenimiento de la diversidad genética (Villareal, 2004). Entre los factores que afectan a estas estructuras destacan los genéticos y los ecológicos.

En los ecosistemas forestales en particular en las coníferas, la principal forma de dispersión de las semillas y del polen es por medio del viento (transporte anemófilo), y aunque éste puede transportarlas a distancias considerables, la mayoría de las semillas y del polen recorren distancias menores a diez metros del árbol. De esta manera se establecen grupos de individuos emparentados y se promueve el cruzamiento entre estos (Vander Wall, 1992; Burczyk *et al.*, 2004).

El cruzamiento de árboles emparentados y la autofecundación aumentan la probabilidad de que ocurra endogamia, es decir que la descendencia contenga genes que provienen de ancestros comunes (Hart y Clark, 2007). La endogamia aumenta la frecuencia de individuos homocigóticos los cuales pueden ser menos competitivos que los heterocigóticos, particularmente en ambientes adversos, debido a la acción en estado homocigótico de los alelos deletéreos o parcialmente deletéreos, fenómeno común en coníferas (Crnokrak y Barrett, 2002; Hart y Clark, 2007). La disminución de la capacidad adaptativa de los organismos debido a la endogamia se conoce como depresión endogámica, la cual pone en riesgo la viabilidad de poblaciones pequeñas (Hart y Clark, 2007).

En las coníferas la depresión endogámica genera semillas vanas, alta mortalidad en las etapas tempranas de desarrollo, como la germinación (Mosseler *et al.*, 2000; Remington y O'Malley, 2000); albinismo (deficiencia de clorofila) y disminución del crecimiento de las plántulas (Sorensen y Cress, 1994).

Un ejemplo, es el caso de una población de *Pseudotsuga menziessi* (Mirb.) Fran-

co, del estado de Hidalgo, donde Yañez (1991) encontró un elevado porcentaje de óvulos abortados y semillas vanas; Mápula *et al.* (2007) confirmaron esta situación en nueve poblaciones mexicanas de la misma especie y Juárez-Agis *et al.* (2006) obtienen baja germinación en lotes de semilla y mortandad de plántulas en poblaciones de *Pseudotsuga*.

Entre los factores ecológicos que afectan la viabilidad y germinación de la semilla se encuentran la baja densidad poblacional de los árboles adultos y su aislamiento. En años con reducida producción de semilla es común que disminuya la viabilidad de ésta, porque el escaso número de individuos que participan en la reproducción favorece altos niveles de autopolinización (Hermann y Lavender, 1990).

El ataque por insectos a las semillas también afecta la viabilidad y calidad de éstas. Las especies pueden ser resistentes, pero el que esta cualidad se exprese depende de la forma en que la constitución genética interactúa con el ambiente (Zobel y Talber, 1988); éste proporciona a los árboles las condiciones mínimas para que su genotipo se exprese al máximo, de lo contrario los árboles crecerán débiles y susceptibles al ataque de fitopatógenos e insectos.

Para estimar el potencial de las semillas tanto en la propagación natural como en la artificial en vivero, es importante determinar la viabilidad mediante pruebas, como la tinción de embriones y la germinación. En efecto, analizar la viabilidad de las semillas por tinción permite determinar el grado de daño en estas estructuras.

La tinción con tetrazolio utiliza una solución incolora que tiñe de diferente color los tejidos, dependiendo si estos están vivos, débiles, o muertos. La extensión y la localización de los tejidos dañados permiten estimar rápidamente la capacidad de germinación de las semillas. Esta prueba se basa en la reacción del tetrazolio con los iones hidrógeno liberados por las enzimas deshidrogenasas que intervienen en la respiración de los tejidos vivos, el resultado es la formación de un pigmento rojo llamado formazán, insoluble en agua pero soluble en aceite (López *et al.*, 2005).

Características de las semillas

Una semilla se considera como un óvulo fertilizado en estado de latencia, en la figura 1 se ilustran las partes de la semilla de acuerdo con el grupo botánico al que pertenecen.

Las semillas se originan del óvulo fertilizado, al llegar a la madurez se distinguen las partes siguientes: (figura 2).

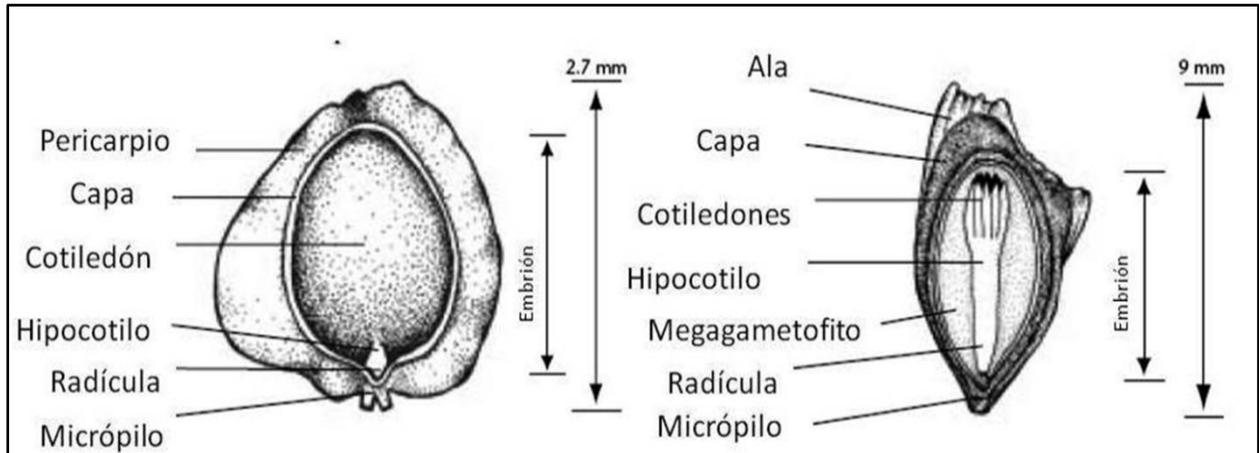


Figura 1. Anatomía de semillas forestales. Angiosperma (izquierda) y gimnosperma (derecha). Modificada de Leadem, (1942).

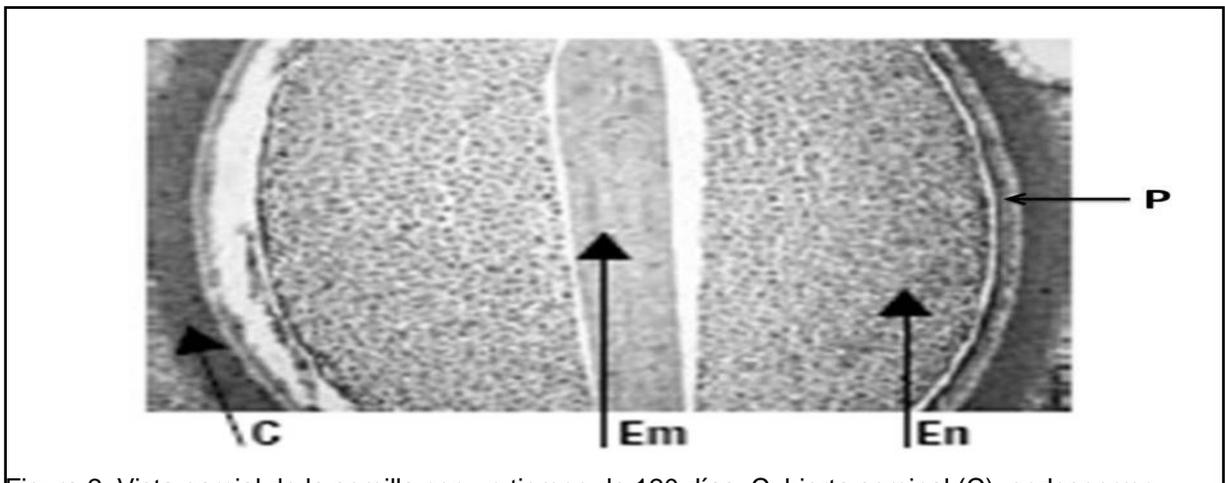


Figura 2. Vista parcial de la semilla con un tiempo de 120 días. Cubierta seminal (C), endospermo (En), Embrión (Em) y perispermo (P). Aumento 10X (Modificada de Gil y Miranda, 2008).

Cubierta seminal (C), tejido que se forma a partir de uno o de los dos tegumentos que rodean al óvulo; *perispermo* (P), tejido diploide procedente de la nucela que se presenta en diversas cantidades en las semillas de algunas especies; *endospermo* (En), tejido generalmente triploide que resulta de la fusión de uno de los núcleos espermáti-

cos con los núcleos polares, y que se presenta en diversas cantidades en las semillas de algunas especies y *embrión* (Em), el cual proviene de la fertilización de la oosfera por uno de los núcleos espermáticos y se convertirá en una planta después de la germinación de la semilla (Bewley y Black, 1978, citados por Niembro, 1988).

OBJETIVO

Determinar la calidad de semillas forestales por medio de la germinación y la tinción con tetrazolio.

EQUIPO

Agitador magnético
 Cámara de incubación
 Estufa de cultivo
 Microscopio estereoscópico

MATERIAL

Agua destilada	Probeta de 100 ml
Bisturí	Recipientes de plástico
Cajas de Petri de 200 mm de diámetro	Semillas de árboles (2 000)
Pinzas de disección	Toallas absorbentes
Guantes para cirujano	Vaso de precipitados de 200 ml y 1 000 ml

REACTIVOS

Nombre	Marca	No. de catálogo
2,3,5 Trifenil tetrazolio cloruro	SIGMA	T8877
Hipoclorito de sodio	SIGMA	239305

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Tetrazolio

Para preparar 100 ml de este reactivo, pesar 1 g de 2,3,5 trifenil tetrazolio cloruro y disolverlo en agua destilada en un vaso de precipitados, con ayuda de un agitador magnético, ajustar el pH a 7, cuando se utilice debe estar a temperatura ambiente. El reactivo se puede conservar por 4 meses en un frasco color ámbar a temperatura de 4 °C.

Hipoclorito de sodio 2 %.

Para un litro de solución, mezclar 20 ml de hipoclorito de sodio con 980 ml de agua destilada.

METODOLOGÍA

El análisis sigue los procedimientos estándares internacionales para la prueba de semillas (ISTA, 1991).

Análisis de germinación

El tiempo de germinación depende de la especie (3-5 semanas). La prueba se efectúa con 100 semillas y en cuatro réplicas, siguiendo este procedimiento:

Desinfectar las semillas con hipoclorito de sodio al 2 % por dos minutos y enjuagar con agua destilada.

Embeber las semillas en agua destilada por 24 h a temperatura ambiente.

Sembrar las semillas en papel absorbente humedecido con agua destilada (se puede emplear agrolita o vermiculita), en recipientes plásticos o cajas de Petri, dependiendo del tamaño de la semilla (figura 3).



Figura 3. Cajas de Petri con 100 semillas cada una. (Para el proceso de germinación es importante el control de la temperatura y la luz).

Introducir los recipientes con las semillas en una cámara de incubación a temperatura de entre 20 y 30 °C (según la especie), y alternando 8 horas de oscuridad y 16 de luz (fotoperiodo de 600 luxes) (figura 4).

La germinación se registra diariamente, cada tercer día, o en función de las semillas que se estén analizando. Una semilla se considera germinada cuando el embrión se ha convertido en una plántula (figura 5).



Figura 4. Cámara de incubación programada con 8 horas de oscuridad y 16 de luz y temperatura de 24 °C.



Figura 5. Semillas germinadas convertidas en plántulas

Los resultados obtenidos se registran en la tabla 1.

Tabla 1. Cuadro de registro de datos del ensayo de germinación.

SM	NS	G _{i.....}	G.....	G.....	G..... _j	GT	SV	PA	SNG
1	100								
2	100								
3	100								
4	100								
	Total								
	Promedio								
	Promedio acumulado								

SM = Submuestra; NS = Número de semillas; G_{i..j} = Germinación registrada cada tercer día; GT = Germinación total; SV = Semillas vanas; PA = Plántulas anormales; SNG = Semillas no germinadas

La evaluación de la germinación se hace de la siguiente manera:

$$\% \text{ de GT} = \Sigma \frac{GT}{4}$$

$$\% \text{ de SV} = \Sigma \frac{SV}{4}$$

$$\% \text{ de PA} = \Sigma \frac{PA}{4}$$

$$\% \text{ de SNG} = \Sigma \frac{SNG}{4}$$

Donde:

GT = Germinación total

SV = Semillas vanas

PA = Plántulas anormales

SNG = Semillas no germinadas

NOTAS:

Se consideran plántulas anormales las que son albinas, o las que no forman radícula (figura 6).

Se deja de registrar cuando deja de observarse germinación en dos ocasiones el intervalo de tiempo utilizado, por ejemplo: 6 días (3 + 3).



Figura 6. Plántulas anormales. Sin radícula (Izquierda) y albina (derecha).

Análisis de viabilidad

El análisis se realiza con 100 semillas y cuatro réplicas en el siguiente orden:

Para desinfectar las semillas se lavan con hipoclorito de sodio durante tres minutos, se enjuagan con agua destilada (López *et al.*, 2005).

Colocar las semillas en cajas de Petri entre papel húmedo por 24 h, para que se lleve a cabo el proceso de imbibición. Colocar las cajas dentro de una estufa de cultivo a una temperatura aproximada de 20 °C en condiciones de obscuridad. Con unas pinzas de disección y un bisturí, se elimina la capa (testa), se parte a la mitad el megagametofito de forma longitudinal, evitando dañar el embrión (figura 7).

Seleccionar aquellas mitades que no presenten fracturas, golpes, picaduras de insectos, ni cortes del embrión (verificar con el microscopio) y colocarlas nuevamente en cajas de Petri.

Agregar 5 ml de tetrazolio, procurando que todas las mitades queden cubiertas por la solución e incubar en una estufa de cultivo por 24 h a temperatura de entre 30 y 40 °C.

Eliminar el tetrazolio por decantación o con un gotero y el remanente con una toalla de papel y enjuagar las semillas con agua de la llave.



Figura 7. Corte longitudinal de la semilla de *Pinus cembroides*.

La clasificación de las semillas se hace en base a los siguientes patrones de tinción (figura 8):

Vivas = embriones y tejidos teñidos uniformemente de rojo.

Muertas = embriones blancos con radícula blanca.

Vitalidad limitada = manchas blancas y rojas distribuidas en diferentes tejidos, lo que hace muy difícil su valoración.

Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{No.de semillas teñidas}}{\text{No.de semillas analizadas}} \times 100$$

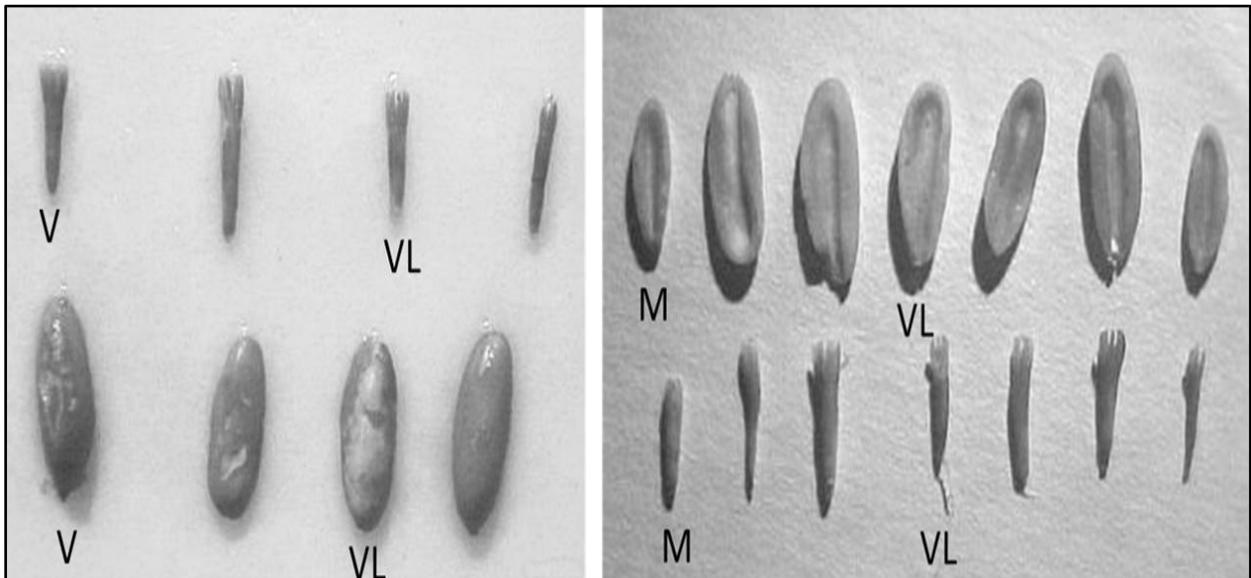


Figura 8. Viabilidad de las semillas. Viva (V), vitalidad limitada (VL), muerta (M).

LITERATURA

- Burczyk, J., Lewandowskib, A., Chalupka, W. 2004. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). For. Ecol. Manage. 197:39-48.
- Crnokrak, P. y Barrett, S. C. H. 2002. Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. Evolution 56:2347-2358.
- Hart, D. L. y Clark, A. G. 2007. Principles of Population Genetics. 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Publisher. Sunderland, Massachusetts. 652 p.

- Hermann, R. K. y Lavender, D. P. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. In: Burns, R. and B. H. Honkala (eds.) Silvics of North America, Vol. 1. Conifers. USDA, Forest Service. Washington, D. C. 527-540 pp.
- ISTA (International Seed Testing Association). 1991. Seed Science & Technology 27, Supplement. Zurich, Switzerland. 333 p.
- Juárez-Agis, A., López-Upton, J., Vargas-Hernández, J. J., Sáenz-Romero, C. 2006. Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agronomía* 40:783-792.
- López, C. M. L., Márquez, G. J., Murguía, S. G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. 2ª ed. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 p.
- Mápula-Larreta, M., López-Upton, J., Vargas-Hernández, J. J., Hernández-Livera, A. 2007. Reproductive indicators in natural populations of Douglas-fir in Mexico. *Biodiversity and Conservation*. 16:727-742.
- Mosseler, A., Major, J. E., Simpson, J. D., Daigle, B., Lange, K., Park, Y. S., Johnsen, K. H., Rajora, O. P. 2000. Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. I. Reproductive traits and fecundity. *Canadian Journal of Botany*. 78:928-940.
- Niembro, R. A. 1988. Semillas de árboles y arbustos: ontogenia y estructura. Limusa. México.
- Niembro, R. A. 1995. Producción de semillas de caoba *Swietenia macrophylla* King. bajo condiciones naturales en Campeche, México. En: Salazar, R. (editor técnico). Memorias del Simposio Avances en la producción de Semillas Forestales en América Latina. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Costa Rica. 249-263 pp.
- Remington, D. L. y O'Malley, D. M. 2000. Evaluation of major genetic loci contributing to inbreeding depression for survival and early growth in a selfed family of *Pinus taeda*. *Evolution* 54:1580:1589.
- Sorensen, F. C. y Cress, D. W. 1994. Effects of sib mating on cone and seed traits in Coastal Douglas-fir. *Silvae Genetica*. 43:338-345.
- Vander Wall, S. B. 1992. The role of animals in dispersing a "wind-dispersed" pine. *Ecology* 73:614-62.
- Villareal, C. R. 2004. Obtención y manejo de germoplasma forestal para la producción de planta. En: Arteaga, M. B. y Musálem, M. A. 2004. Plantaciones Forestales. Memorias de la IV Reunión Nacional de Plantaciones Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. México. p.p. 81-95.
- Yañez, E. L. 1991. Análisis de la producción de semilla de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en una población natural de la sierra de Pachuca, Hidalgo. Tesis Profesional. División de Ciencias Forestales, UACHapingo. Méx. 116 p.
- Zobel, B. y Talbert, J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Limusa. México. 531 p.

MANUAL DE TÉCNICAS EN GENÉTICA Y AMBIENTE

Se terminó de imprimir el 24 de Octubre de 2012
en los talleres de Conciencia Gráfica S.A de C.V.

con domicilio en Fracc. Cabañas Lt. 2

Oasis, Valsequillo, Puebla

y con número de teléfono y fax

01 222 281 7084

El tiraje consta de 1000 ejemplares

