

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por
benzo[a]pireno en *Dunaliella tertiolecta*.**

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

CYNTHIA LOPEZ MONTOYA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MEXICO. OCTUBRE DE 2011

Resumen

Se realizó un estudio de toxicidad del benzo[a]pireno (B[a]P) utilizando la microalga marina *Dunaliella tertiolecta* como organismo de prueba y como herramienta de análisis el ensayo cometa, una técnica utilizada para evaluar daño al ADN que hasta la fecha no ha sido aplicada en células vegetales de origen marino, por lo que es necesario realizar adaptaciones para este fin. El objetivo de este trabajo fue el de evaluar la sensibilidad del ensayo cometa en la determinación de daño genómico por benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta* en función del tiempo y concentración del genotóxico. Con una densidad celular inicial de 10^6 cél·mL⁻¹, se realizaron pruebas en las que se expuso a la microalga a diferentes concentraciones de B[a]P (1.0, 3.2 y 3.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), haciendo varios experimentos, en cada uno de los cuales se utilizó sólo una concentración de B[a]P durante un intervalo de tiempos de incubación (0, 3, 6, 9 y 12 h). Posteriormente se realizó un experimento en el cual se aplicó un intervalo de concentraciones (4.0, 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) durante 12 h. Después de cada prueba de toxicidad se cuantificaron las células dañadas. El daño genómico fue evaluado mediante ensayo cometa, utilizando el método de Erbes *et al.* (1997), aplicando modificaciones para establecer las condiciones óptimas de evaluación del daño en el ADN de células de origen marino. Las modificaciones al ensayo cometa se realizaron cambiando condiciones en cada corrida. Se varió la concentración de los componentes del buffer de lisis, el tiempo y temperatura de incubación, la forma de preparar las laminillas y las condiciones de corrimiento de

electroforesis. Para el experimento bajo un gradiente de concentraciones de B[a]P durante 12 h de exposición, se evaluó la viabilidad celular de las microalgas expuestas mediante microscopía de epifluorescencia después de teñir con Calcofluor White Stain. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que es posible detectar daño al ADN mediante visualización de cometas en las microalgas sometidas a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P durante 9 h de exposición. También fue posible observar que en el ADN de las microalgas sometidas a las concentraciones 4.0 , 5.0 y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 12 h de exposición, se formaron conglomerados de moléculas de ADN. El análisis de viabilidad dio como resultado un valor de 40%. Se discute el efecto del B[a]P en la microalga y la utilización del ensayo cometa para la visualización de daño en el ADN de *D. tertiolecta* con lo que se concluye que el ensayo cometa, en general, muestra una mayor sensibilidad que la densidad celular para la detección de la toxicidad. Por otra parte, tomando como base la densidad y la viabilidad celular después de la exposición al hidrocarburo, se puede concluir que *D. tertiolecta* muestra capacidad para adaptarse y resistir al B[a]P, manteniendo su viabilidad aún después de estar en contacto con el hidrocarburo en un tiempo prolongado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGIA

Aplicación del ensayo cometa en la asignación del daño genómico por benzo[a]pireno en *Dunaliella tertiolecta*.

T E S I S

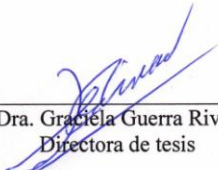
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

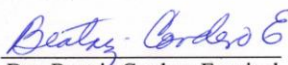
MAESTRO EN CIENCIAS


PRESENTA

CYNTHIA LÓPEZ MONTOYA

Aprobada por:


Dra. Graciela Guerra Rivas
Directora de tesis


Dra. Beatriz Cordero Esquivel
Sinodal


Dra. Carmen G. Paniagua Chávez
Sinodal

DEDICATORIA

A Silvia y José Manuel por ser mis guías en éste camino, por todo el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida, gracias a ustedes concluyo una etapa más en mi vida. Los amo.

A Seidel por ser esa persona que siempre esta a mi lado cuando mas he necesitado un consejo, gracias por todo, pero sobre todo por ser mi HERMANA.

A Yola por darme esa oportunidad de vivir contigo, por todo el apoyo que me brindaste en este tiempo, por tu cariño y por estar siempre ahí para mi, por las pláticas interminables y las que nos faltan por contar.

A mis tios Yolanda y José Francisco por la ayuda brindada en este tiempo, por hacerme sentir una parte de su familia, por todo el cariño que me han brindado muchas gracias.

A Angelito por todo el apoyo y las atenciones que recibí de ti en este tiempo muchas gracias por todo.

A mis hermanas Mónica, Carolina, Marcela, Heidy, Cristina gracias por todos los esos momentos inolvidables a su lado por sus consejos durante todo éste tiempo. Las quiero muchismos.

A todas esas personas que conocí en Ensenada especialmente a Beto, Bere, Luzma, Brenda, Daniela, Aldo, Tony, “Marmota”, por todo lo que me brindaron en éste tiempo, gracias por dejarme entrar en sus vidas.

A la Familia Montoya por su cariño, comprensión y apoyo durante toda mi vida y especialmente en este momento los quiero mucho.

A la Familia López por todo el apoyo y su cariño que me han dado en el transcurso de mi vida. Los quiero.

A Luisita por ser ese angelito que ha dado mucha luz, paz y alegría.

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios maestría.

A la Dra. Graciela Guerra Rivas por ayudarme paso a paso en la realización de este trabajo y hacerlo posible, por la paciencia y dedicación. Mil gracias por todo pero especialmente por su amistad.

A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel por tan amena y reconfortante enseñanza. Por su inquietud y aliciente a este trabajo, pero sobretodo por la calidez humana y científica.

A la Dra. Carmen Paniagua Chavez por la enseñanza y rumbo plasmado en mi formación profesional. Por su aportación a la mejora de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Marinas y al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, por la oportunidad, apoyo y educación

A mis compañeros, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos años de convivir dentro y fuera del salón de clase.

Al equipo de Farmacología y Toxicología Marina. A Isajav, Yulizet, Claudia, Mily, Homero, Roberto, Gaby por la ayuda en el desempeño en el laboratorio pero sobretodo por las platicas y momentos que hicieron de esta un segundo hogar.

A todas esas personas que conocí en Ensenada especialmente a Beto, Bere, Luzma, Brenda, Daniela, Aldo, Tony, "Marmota", por todo lo que me brindaron en éste tiempo, gracias por dejarme entrar en sus vidas

A la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California, por la oportunidad para realizar mis estudios de Maestría.

GRACIAS

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	8
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVOS	14
V.1. Objetivo general	14
V.2. Objetivos Particulares	14
VI. METODOLOGÍA	15
VI.1. Diseño experimental	15
VI.2. Obtención y mantenimiento de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	15
VI.3. Ensayo preliminar para la determinación de la velocidad y tiempo de centrifugación de la microalga	17
VI.4. Exposición de la microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i> a B[a]P	17
VI.4.1. Preparación de la concentración estándar de benzo[a]pireno	17
VI.4.2. Ensayo de exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a benzo[a]pireno	18
VI.5. Análisis de viabilidad de <i>Dunaliella tertiolecta</i>	20
VI.6. Análisis estadístico	21
VI.7. Ensayo cometa	21
VI.7.1. Preparación de laminillas.	22
VI.7.2. Lisis de membranas celulares	23
VI.7.3. Desnaturalización y electroforesis	23
VI.7.4. Neutralización	23
VI.7.5. Tinción y visualización	24
VII. RESULTADOS	26
VII.1. Ensayo preliminar de velocidad y tiempo de	26

centrifugación

CONTENIDO (continuación)

	Página
VII.2. Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	27
VII.2.1. Prueba de toxicidad	27
VII.2.2. Ensayo cometa para <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	29
VII.3. Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	29
VII.3.1. Prueba de toxicidad	29
VII.3.2. Ensayo cometa para <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	32
VII.4. Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	34
VII.4.1. Prueba de toxicidad	34
VII.4.2. Ensayo cometa para <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P	36
VII.5. Exposición de <i>Dunaliella tertiolecta</i> a un gradiente de concentración de B[a]P	37
VII.5.1. Prueba de toxicidad	37
VII.5.2. Ensayo cometa para <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a un gradiente de concentración de B[a]P	40
VII.6. Análisis de viabilidad celular de <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a un gradiente de concentración de B[a]P	42
VIII. DISCUSIÓN	44
IX. CONCLUSIONES	58
X. LITERATURA CITADA	60

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Condiciones del ensayo cometa aplicadas a <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a benzo[a]pireno $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 6, 9 y 12 h.	18
2	Condiciones del ensayo cometa aplicadas a <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a benzo[a]pireno en concentración $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 3, 6, 9 y 12 h.	20
3	Condiciones del ensayo cometa aplicadas a <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a benzo[a]pireno de concentración $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 3, 6, 9 y 12 h.	22
4	Condiciones del ensayo cometa aplicadas a <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a un gradiente de concentraciones de benzo[a]pireno durante 12 h.	25
5	Variantes realizadas en la preparación de las laminillas utilizadas para el ensayo cometa en células de <i>Dunaliella tertiolecta</i> después de la exposición al hidrocarburo policíclico aromático benzo[a]pireno.	47
6	Variantes realizadas en la lisis de células de <i>Dunaliella tertiolecta</i> después de haber sido expuestas al hidrocarburo policíclico aromático benzo[a]pireno. Se muestra la composición del buffer de lisis y las condiciones de tiempo y temperatura.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura molecular de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) a) Antraceno b) Pireno c) Benzo[a]pireno.	2
2	Efecto de benzo[a]pireno sobre <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P en condiciones controladas.	28
3	Efecto de benzo[a]pireno $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre <i>Dunaliella tertiolecta</i> en condiciones controladas.	31
4	Fotografías de <i>Dunaliella tertiolecta</i> después de 9 h de exposición a benzo[a]pireno en concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.	33
5	Efecto de benzo[a]pireno sobre <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P en condiciones controladas.	35
6	Fotografías de <i>Dunaliella tertiolecta</i> después de 9 h de exposición a benzo[a]pireno en concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.	37
7	Efecto de benzo[a]pireno sobre <i>Dunaliella tertiolecta</i> expuesta a $4.0, 5.0$ y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P durante 12 h en condiciones controladas.	39
8	Fotografías de <i>Dunaliella tertiolecta</i> después de 12 h de exposición a un gradiente de concentraciones de benzo[a]pireno.	41
9	Fotografías de <i>Dunaliella tertiolecta</i> con fluorocromo para observar viabilidad celular.	43

I. INTRODUCCIÓN

El ambiente acuático es continuamente impactado con compuestos xenobióticos generados por actividades antropogénicas. El ser humano ha tratado de comprender los mecanismos fisiológicos, celulares y moleculares que determinan la toxicidad de algunos de estos agentes químico-orgánicos, como los hidrocarburos políciclicos aromáticos (HPAs), los cuales se encuentran en altas concentraciones en sistemas acuáticos (Vega y Reynaga, 1991; Kraybill, 1997).

Los compuestos xenobióticos como los HPAs son constituyentes de los productos del petróleo y sus productos de refinación. Éstos son mezclas extremadamente complejas de compuestos orgánicos, de los cuales los hidrocarburos (parafinas, naftenos y aromáticos) son los más abundantes llegando a comprender más del 75 % del total de los componentes (Farrington *et al.*, 1972). Los HPAs también pueden ser formados durante la combustión incompleta de materia orgánica como el carbón y el tabaco; así mismo, éstos son frecuentemente encontrados como contaminantes en los mares y áreas costeras, en ríos, suelos y sedimentos (Ueng *et al.*, 1994; Oost *et al.*, 2003).

La contaminación ocasionada por HPAs es considerada como uno de los mayores problemas ambientales, principalmente por las propiedades mutagénicas y carcinogénicas de algunos de ellos, como antraceno, pireno y benzo[a]pireno (Figura 1). Los HPAs son compuestos químicos que se componen de anillos aromáticos que

se han fusionado y no contienen heteroátomos ni llevan sustituyentes (Fetzer, 2000). Constituyen un grupo de contaminantes considerado de estudio prioritario debido a sus propiedades mutagénicas, tóxicas, y cancerígenas, características que en conjunto se denominan genotoxicidad. Las sustancias genotóxicas son aquellas que pueden unirse directamente al ácido desoxirribunucleico (ADN) o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas y causando, en consecuencia, alteraciones genéticas (Menzie *et al.*, 1992). Estos compuestos son poco solubles en agua y poseen una alta lipofiliidad, con valores de coeficiente de partición octanol:agua (K_{OW}) que va desde 3 hasta 7. Los HPAs de mayor importancia son aquellos con un valor alto de K_{OW} , ya que entran en la cadena alimenticia, acumulándose en todos los niveles tróficos debido a la lentitud de su degradación (Ashton *et al.*, 2000).

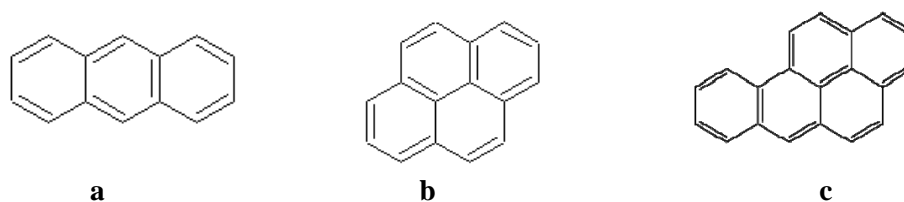


Figura 1. Estructura molecular de tres hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs): a) Antraceno, b) Pireno y c) Benzo[a]pireno.

Por su persistencia en el ambiente, así como por su genotoxicidad, se han estado llevando a cabo estudios para la biorremediación de los hidrocarburos, ya que este tipo de compuestos pueden ser removidos de los sitios contaminados

principalmente por la degradación microbiana (Guerra-Rivas *et al.*, 2010; Rojas-Leal, 2010). Sin embargo, estos compuestos sufren procesos tales como volatilización, fotooxidación, oxidaciones químicas, bioacumulación, adsorción y adhesión a la matriz del suelo (Hook *et al.*, 2003). Actualmente se sabe que algunos organismos son capaces de metabolizar hidrocarburos; como ejemplos podemos citar a moluscos, peces, cianobacterias, algas eucariontas y un cierto número de hongos inferiores y superiores (Rafin *et al.*, 2000; Venkatadri y Peters, 1993).

Con la utilización de organismos degradadores de hidrocarburos se puede llevar a cabo la eliminación de contaminantes en el ambiente por medio de una forma natural, siempre y cuando se tengan las vías metabólicas apropiadas. Por esta razón, para mejorar estas posibilidades se están desarrollando tecnologías basadas en la aplicación de los microorganismos con amplias capacidades biodegradadoras para su uso en la prevención y remediación de la contaminación (Russo *et al.*, 2009). Dentro de los microorganismos utilizados para el estudio de los efectos de la exposición a contaminantes se encuentra el fitoplancton, un conjunto de organismos acuáticos autótrofos, que ofrecen ventajas debido a su tamaño microscópico y su alta tasa de crecimiento. Así mismo, ofrece la posibilidad de tomar muestras tanto a nivel de población como a nivel de comunidad. Además, el fitoplancton permite estudiar los efectos de exposición contra agentes xenobióticos, con el fin de obtener una mejor comprensión de las consecuencias a largo plazo, entre las que se encuentran aquellas ocasionadas por la genotoxicidad de sustancias a nivel de

población.

En los últimos años, como respuesta a la creciente contaminación, tanto de suelo como del agua generada por derrames de hidrocarburos del petróleo, se han utilizado diversos sistemas biológicos ambientales encaminados a la limpieza y recuperación de áreas afectadas. La utilización de estos sistemas produce rupturas o cambios moleculares en el contaminante y/o sustancias de importancia ambiental en suelos, agua y aire (Torres *et al.*, 2008). En este proceso de remoción de contaminantes, se aplican metodologías que permiten evaluar tanto los niveles de agentes xenobióticos, como el daño que ocasionan en los organismos, a través de estudios de monitoreo. En el caso de los estudios de monitoreo genotóxico, es importante contar con biomarcadores de gran sensibilidad y bajo costo que permitan aplicarse en diferentes tipos de muestras o poblaciones. Según McCarthy y Shugart (1990), los biomarcadores son “medidas en los niveles molecular, bioquímico o celular, tanto en poblaciones naturales provenientes de hábitats contaminados, como en organismos expuestos experimentalmente a contaminantes y que indican que el organismo ha estado expuesto a sustancias tóxicas y la magnitud de la respuesta del organismo al contaminante. Los biomarcadores son de una gran utilidad en el estudio de la eficiencia de la biorremediación, ya que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos, lo que permite obtener información sobre el rendimiento de los distintos métodos de degradación de los residuos del petróleo.

Entre de los organismos de interés para el estudio de los efectos de agentes

xenobióticos mediante el uso de biomarcadores se encuentra *Dunaliella tertiolecta*, una especie de microalga marina. El género *Dunaliella* pertenece a la clase *Chlorophyceae*, es del orden *Volvocales* y de la familia *Polyblepharidaceae*. Estas microalgas son utilizadas como bioindicadoras y además, para medir la contaminación de compuestos xenobióticos. Por ser unicelulares y carecer de pared celular rígida, fácilmente permiten la entrada del contaminante; pueden ser usadas en estudios de contaminación en diferentes ambientes marinos. *Dunaliella* es una microalga unicelular de 8-25 micras de longitud y de 5-15 micras de ancho; se desplaza en el agua por medio de dos flagelos situados en la parte anterior de la célula, contiene cloroplasto, piranoide, núcleo, mitocondria, pequeñas vacuolas y aparato de Golgi pero a diferencia de otras microalgas, *Dunaliella* carece de pared celular y está cubierta por una fina membrana elástica; la carencia de pared le permite cambiar su volumen según cambia la presión osmótica. Gracias al cambio de concentraciones de glicerol puede adaptarse a rangos amplios de salinidad (Tafreshi y Shariati., 2006). La resistencia de esta microalga en ambientes salinos bajos en nutrientes o con temperaturas de 15 a 50 °C, pH extremos y hábitats con una gran irradiancia solar, hace que esta microalga presente una ventaja para su aprovechamiento (Avron y Ben-Amotz, 1992). Para fines de este trabajo, las características que presenta esta especie son las de un organismo óptimo debido a su gran resistencia a medios ambientes difíciles, potencialmente apto para sobrevivir en sistemas contaminados.

Los daños que se producen por genotóxicos en el ADN pueden

potencialmente causar alteraciones a nivel de bases o nucleótidos del ADN produciéndole un daño exógeno al organismo expuesto al genotóxico (Tice *et al.*, 1999). El ADN es una macromolécula compuesta por bases nitrogenadas y forma parte de todas las células. Esta molécula de alto peso molecular contiene la información genética utilizada en el desarrollo así como en el funcionamiento de los organismos vivos. Al estar en contacto con un compuesto genotóxico, el ADN recibe lesiones que causan daños estructurales a la molécula, lo que puede alterar en la célula de forma drástica, la forma de leer la información codificada en sus genes (Tice *et al.*, 2000).

Para evaluar la genotoxicidad existe una variedad de ensayos, uno de ellos es la electroforesis alcalina de células aisladas en gel de agarosa, conocido también como ensayo cometa, el cual es un método microscópico fluorescente rápido y muy sensible que permite examinar de forma individual el daño en el ADN. Durante la última década, el ensayo cometa se ha convertido en un método estándar para evaluar el daño del ADN, con aplicaciones en pruebas de genotoxicidad, biomonitorio humano y ecotoxicología, así como en la investigación fundamental del daño en el ADN. El ensayo atrae adeptos por su sencillez, sensibilidad y versatilidad, velocidad y economía (Fairbairn *et al.*, 1995). Este método puede ser realizado bajo condiciones neutras, detectando rupturas de doble cadena del ADN, o bajo condiciones alcalinas, detectando rupturas de simple cadena del ADN y sitios lábiles. Las ventajas de esta técnica incluyen: 1) La posibilidad de coleccionar los datos a nivel de células individuales, 2) La capacidad de

proporcionar información de la distribución intercelular del daño y de la reparación 3) El requerimiento mínimo de una muestra pequeña (se requieren sólo unas cuantas células para el análisis) y 4) En principio, el ensayo cometa puede ser aplicado en cualquier tipo de células eucariotas. Sin embargo, a pesar de que esta técnica presenta ventajas como método de detección para medir el daño en el ADN al estar expuesto a un compuesto xenobiótico, faltan estudios para tener un mejor conocimiento de esta técnica. Por otra parte, el método ha sido poco aplicado en estudios con especies vegetales de origen marino como es *Dunaliella tertiolecta*, por lo que es necesario ampliar su uso para encontrar las bondades de su utilización en este tipo de organismos.

II. ANTECEDENTES

Los estudios más efectivos de biomonitoreo de HPAs que se han reportado son los que utilizan especies acuáticas como los moluscos, balanos y microalgas debido a que éstos pueden acumular residuos de estos contaminantes en concentraciones que exceden aquéllas que se encuentran en el ambiente (Philips, 1980).

El fitoplancton ha sido reconocido como una buena herramienta de trabajo debido a la sensibilidad que presenta a los cambios ambientales, por lo que este grupo de organismos ha sido ampliamente utilizado por décadas en estudios de monitoreo ambiental en países industrializados (Streble y Krauter, 1987), principalmente para detectar metales pesados e hidrocarburos aromáticos. En especial, en ambientes marinos se ha incrementado el uso de las microalgas como bioindicadores de xenobióticos y forman parte de baterías de pruebas de toxicidad de instituciones oficiales que se dedican a la vigilancia de la salud ambiental (Torres *et al.*, 2008). Las microalgas, organismos unicelulares, en su mayoría holoplantónicos y nanoplantónicos (Dawes, 1986), responden rápidamente a cambios ambientales y debido a que son la base de la cadena alimenticia acuática, por lo que un ligero cambio en ellas puede afectar niveles tróficos superiores (De Lorenzo *et al.*, 2002).

A pesar de la importancia de las microalgas en el estudio y la evaluación de diferentes contaminantes (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), es escasa la información

sobre aspectos relacionados con los cambios internos de los organismos fitoplanctónicos cuando se exponen a xenobióticos y el biomarcador más ampliamente utilizado es el crecimiento, sin embargo, se conoce poco sobre su capacidad para degradar y biotransformar xenobióticos, lo que sería de utilidad para establecer los límites de aplicación de estos organismos en estudios de efectos subletales.

Existen reportes aislados que señalan la supervivencia de algunas especies fitoplanctónicas en ambientes contaminados, lo que sugiere algún tipo de capacidad para enfrentar la presencia de xenobióticos. De particular importancia son los estudios realizados por Guerra-Rivas (2003), quien estudió la capacidad degradativa de *D. tertiolecta*, mencionando que esta especie es capaz de bioconcentrar más del 95 % de antraceno circundante en un tiempo aproximado de dos horas cuando este HPA se encuentra en el medio en concentración aproximada de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por su parte, Reunova *et al.* (2007) indican que *Dunaliella salina* posee la habilidad de sobrevivir después de estar expuesta a un agente xenobiótico, lo que hace suponer que esta microalga genera cierta adaptación. Más recientemente, Rojas-Leal (2010), quien evaluó la actividad de la enzima NADPH citocromo P450 reductasa en la microalga *D. tertiolecta* tras ser expuesta al benzo[a]pireno (B[a]P), encontró que esta enzima puede ser inducida ante la presencia del mismo; el incremento observado en la actividad enzimática sugiere que esta enzima forma parte inicial de una posible ruta metabólica para el B[a]P, por lo que se podría esperar la capacidad de esta

especie para biotransformar este tipo de compuestos.

Una de las limitantes en los estudios de monitoreo en el ambiente marino es la escasez de metodologías que sean útiles en el análisis de biomarcadores de contaminación. Por esta razón, la validación de herramientas que permitan establecer relaciones causa-efecto entre un xenobiótico y un organismo, es un área prioritaria de desarrollo en este campo. En particular, es necesario desarrollar métodos que pongan de manifiesto el daño genómico, las que pondrán también de manifiesto el impacto potencial de las sustancias que son capaces de interferir con la reproducción y prevalencia de las especies.

Entre los ensayos utilizados para detectar daño en el ADN, la microelectroforesis en gel (MGE por sus siglas en inglés) ha sido mencionada como una técnica importante para el monitoreo de genotoxicidad (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Esta técnica fue utilizada por primera vez por Rydberg y Johanson en 1978 para visualizar daño en ADN en una sola célula embebida en agarosa. Singh *et al.* (1988) modificaron esta técnica utilizando un pH elevado durante la electroforesis, llamándole "ensayo cometa", nombre con el que se le conoce actualmente. Durante el ensayo cometa en condiciones alcalinas, el ADN es desdoblado quedando las dos cadenas paralelamente colocadas. Posteriormente, una de las cadenas se rompe directamente al dañarse el ADN con sustancias o debido al tratamiento alcalino (sitios lábiles), lo cual causa la formación del cometa. Después de la tinción del ADN con un colorante fluorescente, el daño de la célula aparece como un cometa compuesto de una

cabeza y una cauda, la cual contiene fragmentos de ADN. La extensión del daño del ADN dependerá de la naturaleza y concentración del genotóxico aplicado durante el tratamiento.

La aplicación del ensayo cometa en fitoplancton es escasa. Entre los estudios que hablan al respecto se encuentra el de Somshekhar *et al.* (2006), quienes evaluaron el daño por cadmio en la diatomea marina *Chaetoceros tenuissimus*. Aoyama *et al.* (2003) estudiaron el efecto de B[a]P, mitomicina C (citotóxico) y actinomicina D en el ADN de *Euglena gracilis*. Erbes *et al.* (1997) reportaron el efecto del peróxido de hidrógeno, el óxido de 4-nitroquinolina y N-nitrosodimetilamina en *Chlamydomonas reinhardtii*; mientras que en *Chlamydomonas moewusii*, Prado *et al.* (2009) estudiaron el daño ocasionado por el herbicida Paraquat (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo).

Las características del género *Dunaliella* como un buen indicador hacen de esta especie de microalga una de las mejores opciones en pruebas de toxicidad ambiental (Tafreshi y Shariati, 2009). La capacidad de *D. tertiolecta* de remover hidrocarburos del medio ha sido ya demostrada (Guerra-Rivas *et al.*, 2010). Sin embargo, hace falta establecer relaciones causa-efecto entre agentes xenobióticos y el daño ocasionado en su material genético utilizando métodos sencillos, rápidos y económicos como es el ensayo cometa.

Teniendo en cuenta todos los aspectos anteriormente señalados, en este trabajo se realizó un estudio para evaluar la sensibilidad de la microalga

Dunaliella tertiolecta frente al hidrocarburo benzo[a]pireno a nivel genómico mediante el ensayo cometa al estar expuesta a benzo[a]pireno a diferentes tiempos de exposición. Adicionalmente se realizó un análisis de viabilidad celular por medio de microscopía de epifluorescencia.

III. JUSTIFICACIÓN

El ensayo cometa ha demostrado ser una herramienta eficaz utilizada como una técnica para el diagnóstico de daño genómico en células animales, por lo que, debido a que no se cuenta con métodos adecuados para la detección de efectos genómicos de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en organismos marinos, se pretende evaluar ésta técnica para analizar los posibles efectos en la microalga *Dunaliella tertiolecta*. Por su capacidad de presentar cambios ante la presencia de xenobióticos, tanto en el crecimiento como en la viabilidad celular y actividad metabólica, *D. tertiolecta* es un organismo óptimo para el estudio de genotoxicidad.

IV. HIPÓTESIS

El ensayo cometa es una herramienta adecuada para establecer relaciones causa-efecto entre el agente genotóxico benzo[a]pireno y el daño ocasionado por éste al ADN de *Dunaliella tertiolecta*.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Evaluar la sensibilidad del ensayo cometa en la detección del efecto tóxico por benzo[a]pireno (B[a]P) sobre *Dunaliella tertiolecta* en función del tiempo de exposición y concentración del hidrocarburo.

V.2. Objetivos Particulares

- Determinar el daño genómico en *Dunaliella tertiolecta* sometida a B[a]P en una serie de tiempos de exposición, usando el ensayo cometa para la evaluación de alteraciones en el ADN.

- Determinar el daño genómico en *Dunaliella tertiolecta* expuesta a un gradiente de concentración de B[a]P usando el ensayo cometa para la evaluación de alteraciones en el ADN.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Diseño experimental

Se realizaron experimentos de exposición de la microalga *Dunaliella tertiolecta* a diferentes concentraciones del hidrocarburo benzo[a]pireno (B[a]P) durante tiempos definidos. Una vez concluido el tiempo de exposición, mediante centrifugación y decantación, el sobrenadante fue eliminado y las células fueron contadas con ayuda de una cámara de Neubauer. Posterior a la exposición, se exploraron las células con el fin de detectar daño al ADN utilizando el ensayo cometa en condiciones alcalinas. Adicionalmente, se evaluó la integridad celular mediante el uso de microscopía de epifluorescencia, después de exponer a *D. tertiolecta* a las concentraciones más altas de B[a]P. Previo a los experimentos de exposición, se realizó la experimentación necesaria para optimizar el ensayo cometa adaptado a la exploración de daño genómico en microalgas.

VI.2. Obtención y mantenimiento de *Dunaliella tertiolecta*

La cepa de *D. tertiolecta* fue obtenida del cepario de microalgas del Departamento de Acuicultura del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). El cultivo se desarrolló en el laboratorio de Farmacología Marina, ubicado en la Facultad de Ciencias Marinas

de la Universidad Autónoma de Baja California.

Para mantener la cepa y producir la biomasa necesaria para experimentación, se realizaron transferencias periódicas hasta matraces Erlenmeyer de 500 mL. Las condiciones del cultivo en el laboratorio de Farmacología Marina fueron las siguientes: cuarto húmedo con iluminación continua de 12 lámparas de luz fluorescente de 40 Watts y temperatura controlada a 20 ± 1 °C. El cultivo fue monitoreado diariamente en su crecimiento mediante recuentos celulares con cámara de Neubauer previa fijación de las células con lugol. La observación para el conteo de células se llevó a cabo con ayuda de un microscopio de luz visible.

VI.3. Ensayo preliminar para la determinación de la velocidad y tiempo de centrifugación de la microalga

Se realizó experimentación preliminar con el fin de encontrar las condiciones óptimas de centrifugación, para establecer la mejor velocidad que no altera la integridad de la membrana de *Dunaliella tertiolecta*.

En tubos de ensayo se colocaron alícuotas de 8 mL de suspensión de células de *Dunaliella tertiolecta*, con una densidad de 1×10^6 cél·mL⁻¹. Se probaron 25 condiciones, en un ensayo de 5x5, combinando 5 tiempos de centrifugación (5, 8, 10, 12, y 15 minutos), con un gradiente de velocidades (1000, 1,500, 2,000, 2,500 y 3,500 rpm). Cada condición se probó por duplicado. Después de centrifugar a las velocidades indicadas durante los tiempos correspondientes, se decantó el sobrenadante y las células sedimentadas se suspendieron en 8 mL de agua de mar filtrada. Posteriormente se realizó observación microscópica y conteos celulares, como se indicó anteriormente y se revisaron si existían irregularidades en la membrana celular de las microalgas.

VI.4. Exposición de la microalga *Dunaliella tertiolecta* a B[a]P

VI.4.1. Preparación de la concentración estándar de benzo[a]pireno

Se preparó una solución estándar del hidrocarburo (B[a]P), el cual se disolvió en 10 mL de acetonitrilo para lograr una disolución completa. A partir de

esta solución estándar se tomaron los volúmenes necesarios para obtener las concentraciones 1.0, 3.2, 3.8, 4.0, 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a usarse en cada tratamiento. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener la concentración deseada:

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

En donde:

C_f = Concentración deseada en el tubo de exposición

V_f = Volumen final en el tubo de exposición. En todos los casos fue de 8 mL.

C_i = Concentración de la solución estándar de B[a]P

V_i = Volumen necesario de solución estándar de B[a]P para tener la concentración deseada en el tubo de exposición

VI.4.2. Ensayo de exposición de *Dunaliella tertiolecta* a benzo[a]pireno

En las pruebas de toxicidad se realizaron tres experimentos probando una concentración de B[a]P a la vez. En el primer experimento se utilizó una

concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, un control de microalga en agua de mar (control) y un control de microalga en agua de mar con solvente (control solvente) con tiempos de exposición de (0, 6, 9 y 12 h). En un segundo experimento se expuso a la microalga a una concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y se utilizó un control y un control solvente durante un tiempo de 0, 3, 6, 9 y 12 h. En el tercer experimento se sometió a *D. tertiolecta* a una concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando nuevamente un control y un control solvente. Los tiempos de exposición fueron de 0, 3, 6, 9 y 12 h. Con base en los resultados obtenidos en los tres primeros experimentos se realizó un cuarto experimento con el fin de someter a la microalga a un gradiente de concentraciones a un tiempo fijo. En esta última prueba de toxicidad, se aplicó a la microalga durante 12 h las siguientes concentraciones del hidrocarburo: 4.0, 5.0 y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se manejaron tres controles: microalga en agua de mar (control agua de mar); microalga en agua de mar con solvente (control solvente) y microalga en agua de mar con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Para cada experimento previamente descrito, se utilizaron 8 mL del cultivo de microalgas, los cuales fueron centrifugados en tubos cónicos a 1,500 rpm por 10 min (condiciones seleccionadas previamente) en una centrífuga clínica y el sobrenadante fue decantando. Las células fueron suspendidas en agua de mar filtrada y esterilizada, aforando hasta tener una densidad de 10^6 células·mL⁻¹. Todos los ensayos de exposición se llevaron a cabo de acuerdo al método de Guerra-Rivas (2003), haciendo los ajustes necesarios en el volumen de la

suspensión de microalgas y los componentes adicionales, para los requerimientos de concentración de cada componente.

Los tubos de ensaye con las concentraciones correspondientes de hidrocarburo, se colocaron en una gradilla de metal. A cada tubo se le insertó una pipeta Pasteur para el suministro de aire con un suave burbujeo, de tal manera que las células permanecieran en suspensión y en contacto continuo con el hidrocarburo.

Una vez concluido el tiempo de exposición de cada experimento, se realizó observación microscópica y conteos celulares, como está previamente descrito. Así mismo se revisaron las microalgas para ver si existían irregularidades en la membrana celular.

VI.5. Análisis de viabilidad de *Dunaliella tertiolecta*

Una vez expuestas las microalgas al benzo[a]pireno, se tomaron muestras de cada tratamiento para analizar su viabilidad, para lo cual se siguió el protocolo de Markelova *et al.* (2000) de la manera siguiente. Se preparó una solución de Calcofluor White Stain al 0.04%, de la cual se agregó 1 ml a cada tubo con la muestra de microalgas, éstos se cubrieron completamente con papel aluminio, dejándolos en incubación por 30 minutos en un cuarto oscuro. Pasado este tiempo, se centrifugaron los tubos a 3, 300 rpm para eliminar los residuos del fluorocromo. Posteriormente se observaron bajo el microscopio de

epifluorescencia usando el filtro de luz UV. Para estimar la viabilidad celular se calculó el porcentaje de células que presentaban daño con respecto a las no dañadas. Se consideraron células con daño aquellas que presentaban inmovilidad.

VI.6. Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos obtenidos en los conteos celulares después de la exposición y se analizó la homogeneidad de varianza de las observaciones por medio de la prueba de Bartlett. Para evaluar si existían diferencias entre los tiempos de exposición de cada concentración de benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta*, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Posteriormente se realizó una comparación de las medias mediante la prueba de Tukey. En los casos en los que no se cumplió el supuesto de normalidad, los datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas. En todas las pruebas se utilizó el paquete estadístico Sigma Plot.

VI.7. Ensayo cometa

En su versión estándar el ensayo cometa se lleva a cabo en condiciones alcalinas, de acuerdo con el método inicialmente descrito por Singh *et al.* (1988), con ligeras modificaciones. Con el fin de lograr condiciones óptimas, se

realizaron las modificaciones descritas enseguida.

VI.7.1. Preparación de laminillas

Los portaobjetos fueron desengrasados con metanol, lavados exhaustivamente con agua y secados en la estufa. Posteriormente, se aplicó una primera capa de agarosa de punto de fusión normal (PFN, Laboratorios CONDA). A continuación se colocó una segunda capa aplicando una mezcla de suspensión algal y agarosa de bajo punto de fusión (BPF, Laboratorios CONDA). Cada alícuota de 30 μ L de suspensión algal contenía aproximadamente 300,000 células, las cuales fueron mezcladas con la solución de agarosa en agua destilada, mantenida a 37 ° C. Esta mezcla celular se depositó sobre los portaobjetos previamente cubiertos con la agarosa BPF y debidamente rotulados. Inmediatamente se cubrieron con un cubreobjetos de 24 mm x 60 mm y se dejaron solidificar a 4 ° C por 30 min. Transcurrido este tiempo, se retiraron los cubreobjetos procurando no dañar las capas. Posteriormente, se depositó una tercera capa cubriendo nuevamente con un cubreobjetos de la misma medida y se dejó solidificar también por 15 min a 4 ° C. A continuación, se retiraron los cubreobjetos y las laminillas fueron sumergidas en el tampón de lisis. Se realizaron cuatro experimentos modificando la concentración de agarosa en la solución utilizada para cada capa de la laminilla. En los tres primeros experimentos se colocaron 3 capas de agarosa (Anexos Tabla V).

VI.7.2. Lisis de membranas celulares

La lisis se llevó a cabo por inmersión de las laminillas en una solución buffer. Las laminillas fueron sumergidas durante 30 minutos a 15 ° C. Se realizaron experimentos variando la composición del buffer, el tiempo de incubación y la temperatura, modificando una variable por experimento (Anexos Tabla VI).

VI.7.3. Desnaturalización y electroforesis

Después de la lisis, las laminillas se colocaron en una celda de electroforesis. Ésta fue llenada con buffer de electroforesis de manera que las laminillas quedaron completamente sumergidas en él y se incubaron por 30 minutos a 4 ° C. Transcurrido este tiempo, se inició la electroforesis a un voltaje de 25V y 300 mA. En esta etapa se variaron los tiempos de incubación (desnaturalización de ADN) y el tiempo de la electroforesis modificando una variable por experimento.

VI.7.4. Neutralización

Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se retiraron con cuidado de la celda y se colocaron en cajas de plástico para realizar lavados con tampón de neutralización (3 veces durante 5 minutos). Este tampón se preparó con solución buffer de Tris 0.4 M a pH 7.5 para neutralizar la alcalinidad del buffer de electroforesis y eliminar posibles restos de detergentes que pudieran interferir en el proceso de tinción y en la visualización (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Después de la neutralización, las laminillas fueron deshidratadas colocando en la superficie de cada una 1 mL de metanol durante 3 min. Las laminillas fueron guardadas en cajas oscuras para evitar la luz directa y a temperatura ambiente.

VI.7.5. Tinción y visualización

Las laminillas se tiñeron justo antes del análisis microscópico. Para esto, se depositaron 70 μL de colorante a una concentración de $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sobre cada una de las laminillas y se cubrieron con cubreobjetos de 24 x 60 mm. La visualización se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia Olympus BX50, equipado con un filtro de excitación de 540-550 nm, una lámpara de

mercurio de 100 W y un filtro de barreras de 590 nm, conectado a una cámara Nikon Ltd. La imagen de cada célula se capturó empleando el programa Imagen Pro Plus 5.0 y la visualización se realizó utilizando un objetivo 100x. Se contaron tanto células viables como no viables para tener un estimado del porcentaje de daño, aproximadamente 100 células por campo fueron contadas en cada laminilla. Durante todo el procedimiento se evitó la luz directa, sobre todo desde la lisis de las células hasta su visualización. Se trabajó con luz roja tenue para evitar daño adicional en el ADN. Se utilizó bromuro de etidio en una primera etapa, el cual posteriormente fue sustituido por DAPI (diclorhidrato de 4'6-diamidino-2fenilindol).

VII. RESULTADOS

VII.1. Ensayo preliminar de velocidad y tiempo de centrifugación

Después de 5 minutos de centrifugación a una velocidad de 1,000 a 1,500 rpm, la mayoría de las células presentaban movimiento y la membrana no mostraba daño. Sin embargo, no se había formado bien el pellet y cuando se decantó el sobrenadante, hubo pérdida de células. Para los tiempos de 8 y 10 minutos de centrifugación se observó ruptura en la membrana al utilizarse las velocidades más altas, 2,500 y 3,500 rpm. En cambio, para las velocidades menores como 1,500 y 2,000 rpm no se visualizaron alteraciones en las membranas y el pellet formado durante la centrifugación contenía gran parte de la densidad celular inicial. Para 12 y 15 minutos de centrifugación se presentaron rupturas en la mayoría de las células en las diferentes velocidades. Las células fueron observadas bajo microscopio para observar los cambios en la integridad de la membrana. Por lo tanto, se concluyó que las condiciones óptimas de centrifugación a las cuales no se ve afectada la integridad de la membrana celular son: un tiempo de 10 minutos con una velocidad de 1,500 rpm; condiciones a las que se obtiene un pellet con la mayoría de la densidad celular inicial.

VII.2. Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

VII.2.1. Prueba de toxicidad

Los resultados del primer experimento realizado, en donde se expuso a la microalga a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P en una serie de tiempos de 0, 6, 9 y 12 h, se presentan en la Figura 2. El máximo efecto del B[a]P sobre la microalga se observó al tiempo 0 h, mientras que el efecto de daño para el control agua de mar y control solvente se observó a las 6 h. Después de las 6 h de exposición al B[a]P, se observó una disminución en el efecto sobre la microalga, tendencia que se mantuvo hasta el tiempo de 12 h. Con respecto a las relaciones entre los efectos de los tres tratamientos, se observó que a las 6 h los controles de agua de mar y solvente ejercieron un mayor daño que el hidrocarburo, pero a las 9 y 12 h no se encontraron diferencias significativas en el efecto de los tratamientos ($P < 0.050$).

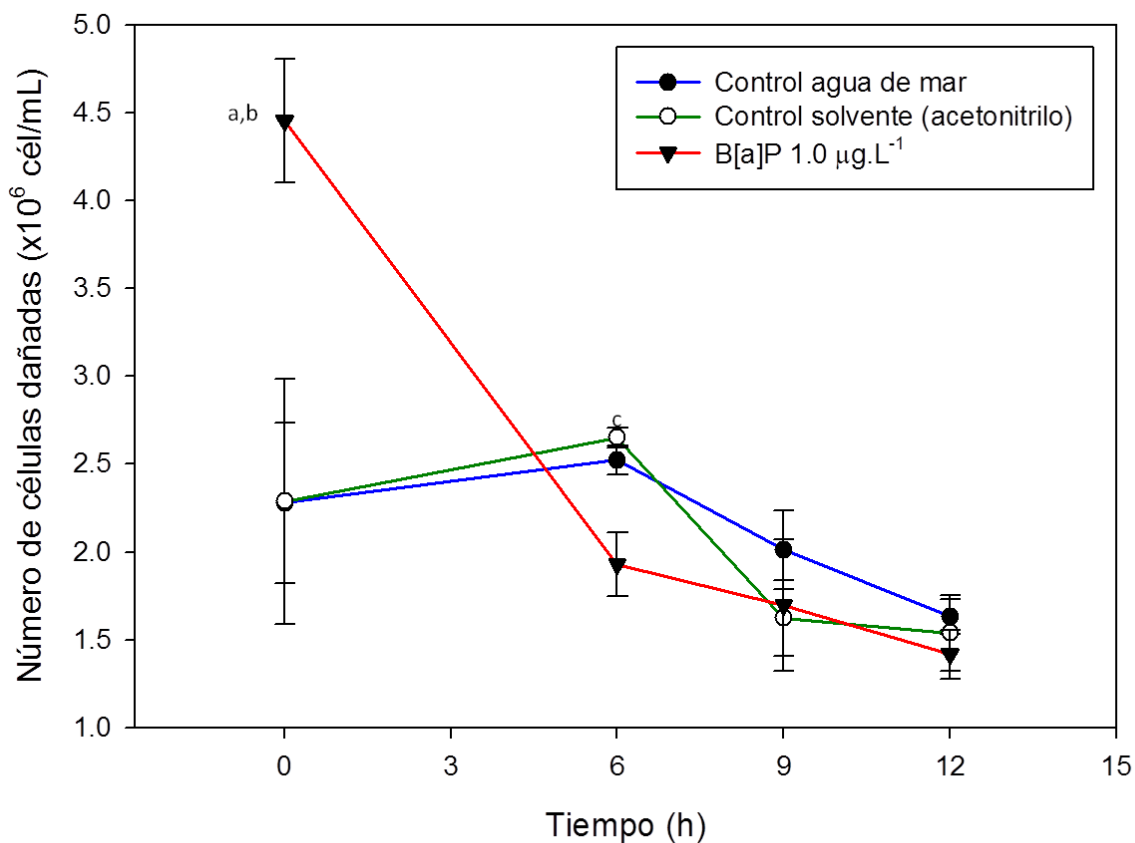


Figura 2. Efecto del benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en condiciones controladas. El ensayo se realizó con aireación, luz continua y temperatura $15 \text{ }^\circ\text{C}$. Se tomó como criterio de efecto el número de células de *D. tertiolecta* que aparecieron inmóviles después de la exposición. Las barras representan el error estándar de $n = 3$. Control agua de mar = Microalgas en agua de mar; Control solvente (acetone) = Microalgas con acetone (En concentración $\leq 1 \%$). a = Significativamente diferente al control agua de mar, b = Significativamente diferente al control solvente, c = Significativamente diferente al hidrocarburo.

VII.2.1.2. Ensayo cometa para *D. tertiolecta* expuesta a $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

Las condiciones utilizadas en el ensayo cometa en relación a la preparación de laminillas, realización de la lisis de membrana celular, corrimiento de la electroforesis así como tinción, se muestran en la Tabla I. En este experimento, al examinar las laminillas no se observaron cometas o ADN teñido.

Tabla I. Condiciones del ensayo cometa aplicadas a *Dunaliella tertiolecta* expuesta a benzo[a]pireno $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 6, 9 y 12 h.

Laminilla	Primera capa: 250 μL de agarosa de punto de fusión normal (0.5%). Segunda capa: 250 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0.05%) con 300,000 células de <i>D. tertiolecta</i> . Tercera capa: 180 μL de agarosa de punto bajo de fusión (0.05 %)
Lisis	NaCl 2.5 M, Na_2EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10, Triton X-100 al 1%, SDS al 1%. Durante 1h, 4 °C
	EDTA 300 mM, NaOH 1mM, pH 10, 1h, 4°C
Electroforesis	25 V y 300 mA por 1h
Tinción	70 μL de DAPI al $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

VII.3. Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

VII.3.1. Prueba de toxicidad

Al exponer a *Dunaliella tertiolecta* a la concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidrocarburo durante una serie de tiempos de exposición (0, 3, 6, 9 y 12 h) se encontraron los resultados que se muestran en la Figura 3. El máximo daño celular

ocasionado por B[a]P ocurrió a las 3 h, mientras que para el control solvente el efecto máximo por el acetonitrilo se observó en el tiempo 0 h. El mayor número de células dañadas en el control agua de mar fue encontrado hasta las 12 horas de exposición. Para el tiempo 6 h se observó una disminución en el efecto del B[a]P así como para el control solvente; mientras que en el control agua de mar se mostró un incremento en el daño celular. Después de 9 h de exposición al hidrocarburo se observó un aumento del efecto del hidrocarburo sobre la microalga, mostrando una tendencia al aumento que se mantuvo hasta las 12 h de exposición. Con respecto a las relaciones entre todos los tratamientos, tanto controles como tóxico se encontró que al tiempo 0 y 3 h el hidrocarburo presentó un mayor daño que ambos controles. En el tiempo 0, no existieron diferencias significativas entre el efecto del control solvente y el del B[a]P; mientras que en el tiempo 3 h el daño del genotóxico fue significativamente mayor que el de ambos controles. La tendencia al aumento del efecto de daño celular de los tres tratamientos se inició a las 6 h de exposición y a las 12 h no se observó diferencia significativa entre los tres tratamientos ($P < 0.050$).

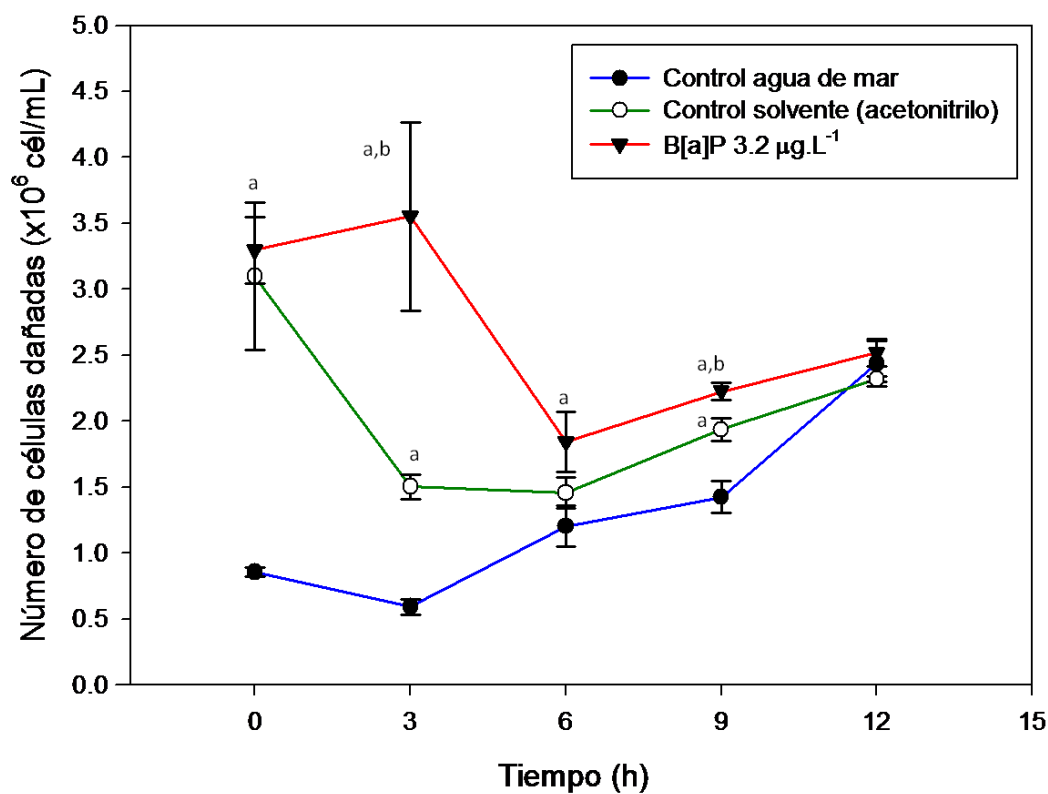


Figura 3. Efecto del benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en condiciones controladas. El ensayo se realizó con aireación, luz continua y temperatura constante de 15°C . Se tomó como criterio de efecto el número de células de *D. tertiolecta* que aparecieron inmóviles después de la exposición. Las barras representan el error estándar de $n = 3$. Control agua de mar = Microalgas en agua de mar; control solvente (acetoneitrilo) = Microalgas con acetoneitrilo (Concentración $\leq 1\%$). a = Significativamente diferente del control agua de mar, b = Significativamente diferente del control solvente.

VII.3.2. Ensayo cometa para *D. tertiolecta* expuesta a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

Las condiciones que se utilizaron para llevar a cabo el ensayo cometa fueron las que se muestran en la Tabla II. En este experimento, donde se realizó un conteo de aproximadamente 100 células de *D. tertiolecta* expuesta a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 9 horas, se observó para el control de microalgas en agua de mar, moléculas de ADN intactas (Figura 4A). Para el control solvente, que contenía microalgas con acetonitrilo en concentración $\leq 1 \%$, se observaron caudas incipientes en el extremo de la molécula de ADN (Figura 4B). Para el caso del tratamiento con el hidrocarburo a las 9 h de exposición, se visualizó la formación de cometas se estimó el porcentaje de daño donde de 100 moléculas, aproximadamente 20% presentaban daño en su membrana y de éstas en un número menor se visualizó la formación de cometas (Figuras 4C y 4D). Para las algas expuestas a 0, 3 y 6 h al B[a]P, las laminillas no mostraron ninguna formación parecida a la estructura de un cometa.

Tabla II. Condiciones del ensayo cometa aplicadas a *Dunaliella tertiolecta* expuesta a benzo[a]pireno en concentración $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 3, 6, 9 y 12 h.

Laminilla	Primera capa: 400 μL de agarosa de punto de fusión normal (0.5%). Segunda capa: 400 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0.5%) con 300,000 células de <i>D. tertiolecta</i> . Tercera capa: 220 μL de agarosa de punto bajo de fusión (0.05%)
Lisis	NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10, Triton X-100 al 1%, SDS al 1%. Durante 1h, 4 °C
	EDTA 300 mM, NaOH 1mM, pH 10, 30 min, 4°C
Electroforesis	25 V 300 mA por 1h
Tinción	70 μL de DAPI al $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

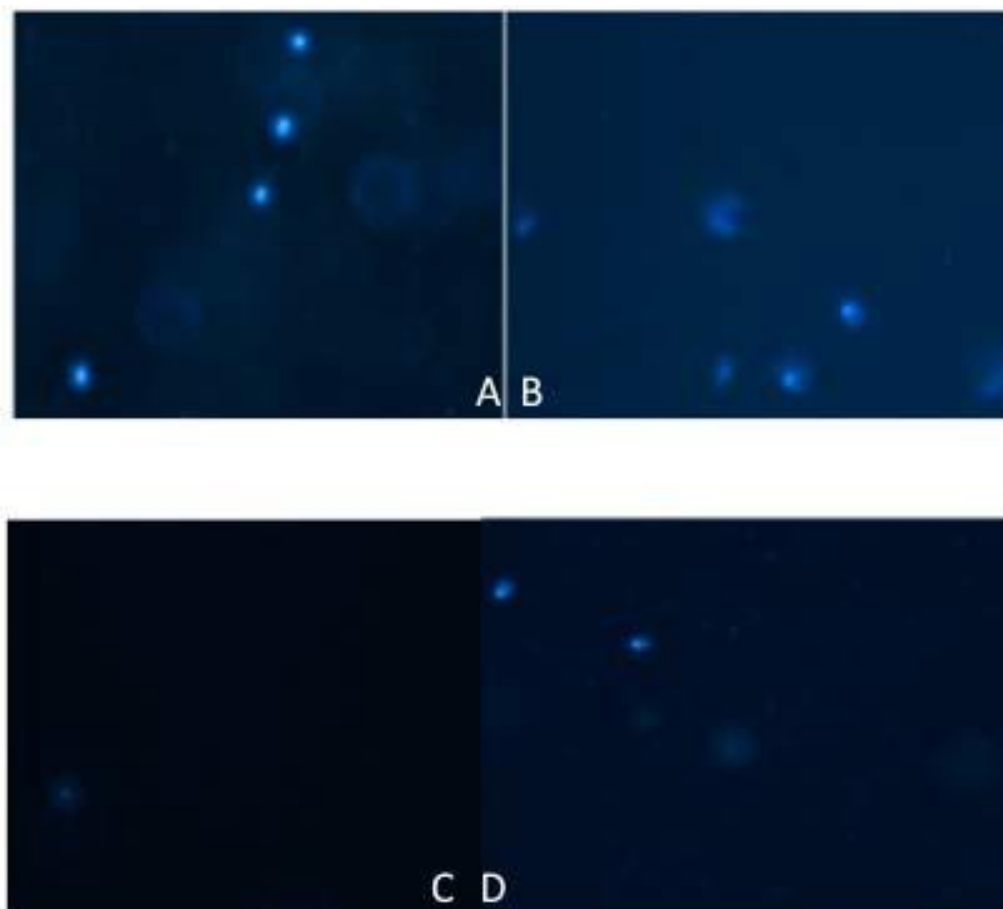


Figura 4. Fotografías de *Dunaliella tertiolecta* después de 9 h de exposición a benzo[a]pireno en concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Las fotografías fueron tomadas después de aplicar el ensayo cometa. A) Microalga en agua de mar, B) Microalga con acetonitrilo (concentración $\leq 1 \%$); C) y D) Microalga con $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P. Colorante: DAPI (diclorhidrato de 4'6- diamidino-2 fenilindol). La observación se realizó utilizando microscopio de epifluorescencia con objetivo 100x y filtro UV. Las condiciones en que se realizó el ensayo cometa se muestran en la Tabla II.

VII.4. Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

VII.4.1. Prueba de toxicidad

Por exposición de la microalga a la concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P se encontraron los resultados que se muestran en la Figura 5. El efecto máximo del B[a]P se observó al tiempo 3 h; para el control solvente se visualizó en tiempo de 0 h. El mayor efecto en la microalga ocasionado por el control agua de mar se encontró a las 12 h. Los valores de número de células dañadas por el B[a]P a la concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, fueron aparentemente más elevados que los valores observados en las microalgas expuestas a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La tendencia del efecto en ambas exposiciones fue similar: una vez iniciada la exposición, se observó un incremento en el daño a las 3 h para luego mostrar una disminución en el tiempo de 6 h y una tendencia a aumentar desde este tiempo hasta las 12 h. De la misma manera que en la exposición a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *D. tertiolecta* no mostró daños significativamente diferentes por BaP a los ocasionados por ambos controles después de un tiempo de exposición de 6 y 9 h. Un aspecto sobresaliente en los resultados de este experimento, es que la exposición al B[a]P durante 12 h fue la única en la que no se encontró diferencia significativa entre el el daño por el tóxico y ninguno de los controles. En todos los demás tiempos de exposición a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se observaron diferencias entre el efecto del B[a]P y el control agua de mar ($P < 0.05$).

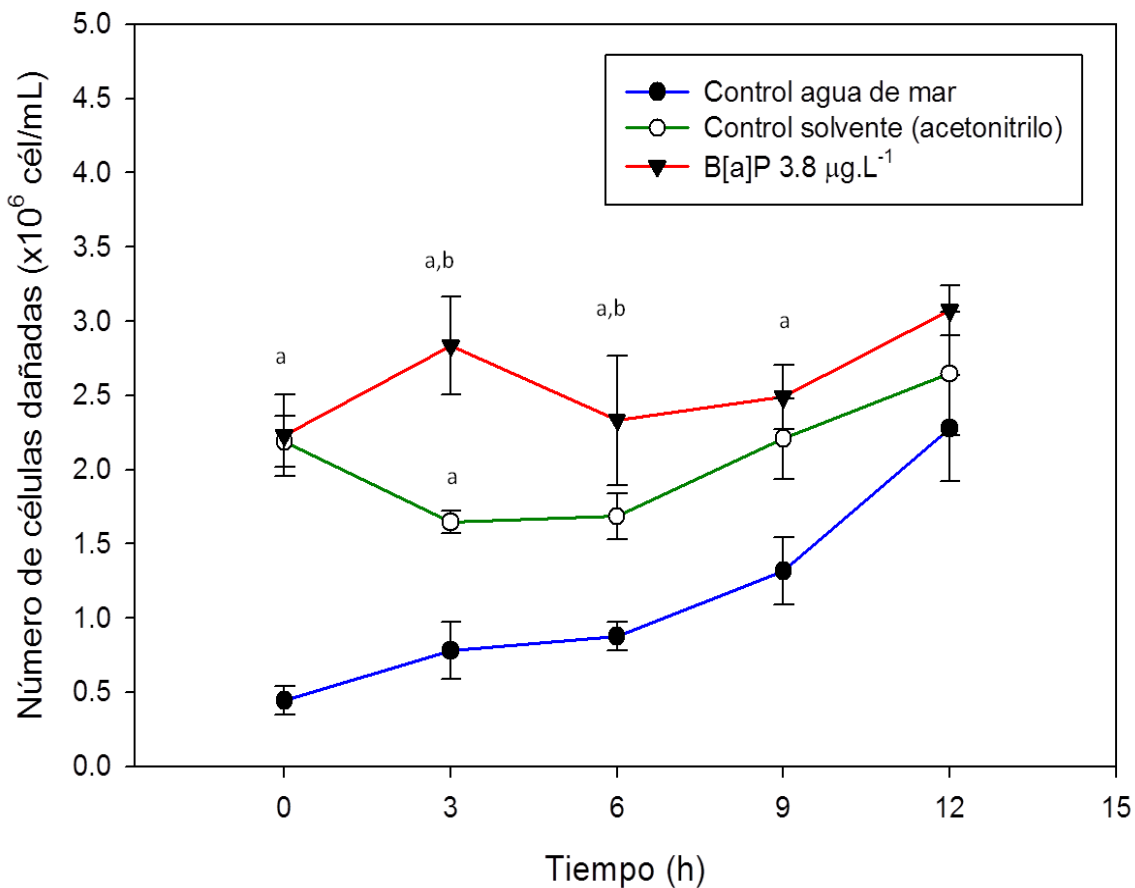


Figura 5. Efecto del benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta* expuesta a la concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en condiciones controladas. El ensayo se realizó con aireación, luz continua y temperatura $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se tomó como criterio de efecto el número de células de *D. tertiolecta* que aparecieron inmóviles después de la exposición. Las barras representan el error estándar de $n=3$. Control agua de mar = Microalgas en agua de mar; control solvente (acetone) = Microalgas con acetone en concentración $\leq 1\%$. a = Significativamente diferente del control agua de mar, b = Significativamente diferente del control solvente.

VII.4.2. Ensayo cometa para *D. tertiolecta* expuesta a $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P

Después de varios experimentos preliminares con variaciones en la elaboración de las laminillas, el buffer de lisis y el corrimiento de la electroforesis, se establecieron las condiciones más adecuadas en relación a estos parámetros. En el ensayo cometa realizado para las microalgas expuestas a esta concentración de hidrocarburo, se mejoró la visualización de moléculas de ADN incrementando el número de capas de agarosa (Tabla III). En todos los ensayos observados se limitó un campo de 100 moléculas de ADN. Para los tiempos de exposición al B[a]P de 0, 3 y 6 h se observaron formaciones similares a cometas en la mayoría de las moléculas contadas, pero con poca claridad. Para la exposición de 9 h, se observó un 39% de moléculas de ADN en forma de cometas tanto en los tratamientos con solvente como con el hidrocarburo. En éste último se visualizó la formación clara de cometas, lo cual no se observó en el caso del solvente (Figura 6).

Tabla III. Condiciones del ensayo cometa aplicadas a *Dunaliella tertiolecta* expuesta a benzo[a]pireno en concentración $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en una serie de tiempos de 0, 3, 6, 9 y 12 h.

Laminilla	Primera capa: 500 μL de agarosa de punto de fusión normal (0.65 %). Segunda capa: 500 μL de agarosa de bajo punto de fusión (0.65 %) con 300,000 células de <i>D. tertiolecta</i> . Tercera capa: 220 μL de agarosa de punto bajo de fusión (0.65 %)
Lisis	NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10, Triton X-100 al 1%, SDS al 1%. Durante 30 min, 4 °C
	EDTA 300 mM, NaOH 1mM, pH 10, 30 min, 4 °C
Electroforesis	25 V 300 mA por 30 min
Tinción	70 μL de DAPI al $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

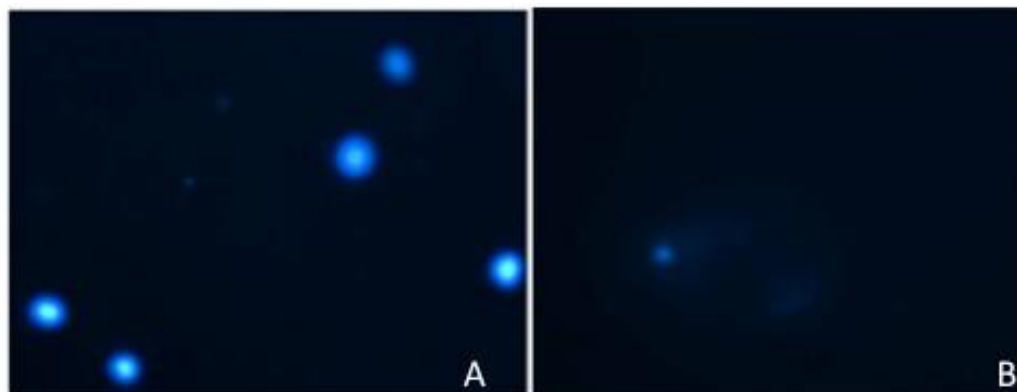


Figura 6. Fotografías de *Dunaliella tertiolecta* después de 9 h de exposición a benzo[a]pireno en concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A) Microalga en agua de mar, B) Microalga con $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P. Colorante: DAPI (diclorhidrato de 4'6-diamidino-2 fenilindol). La observación se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia con objetivo 100x y filtro UV. Las condiciones en que se realizó el ensayo cometa se muestran en la Tabla III.

VII.5. Exposición de *Dunaliella tertiolecta* a un gradiente de concentración de B[a]P

VII.5.1. Prueba de toxicidad

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos previos, se eligieron tres concentraciones de B[a]P: 4.0, 5.0 y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ así como tres controles: control (microalga con agua de mar), control positivo (peróxido de hidrógeno, H_2O_2) y control solvente (acetonitrilo), siendo en total seis tratamientos. Se tomó como

tiempo de exposición el más alto de los probados previamente, el cual fue de 12 h como se muestra en la Figura 7. El máximo efecto del B[a]P ocurrió al utilizar las concentraciones 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Mientras que para los controles utilizados el peróxido de hidrógeno tienen un mayor efecto en la microalga que el resto de los controles. Con respecto a las relaciones entre el número de células dañadas por los tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre los efectos de las tres concentraciones de B[a]P. A la concentración de 4.0, 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se observaron diferencias significativas en el daño celular de *D. tertiolecta* con respecto al ocasionado por los controles. Entre el efecto de B[a]P a 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el efecto de B[a]P a 6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no se visualizó diferencia ($P < 0.050$).

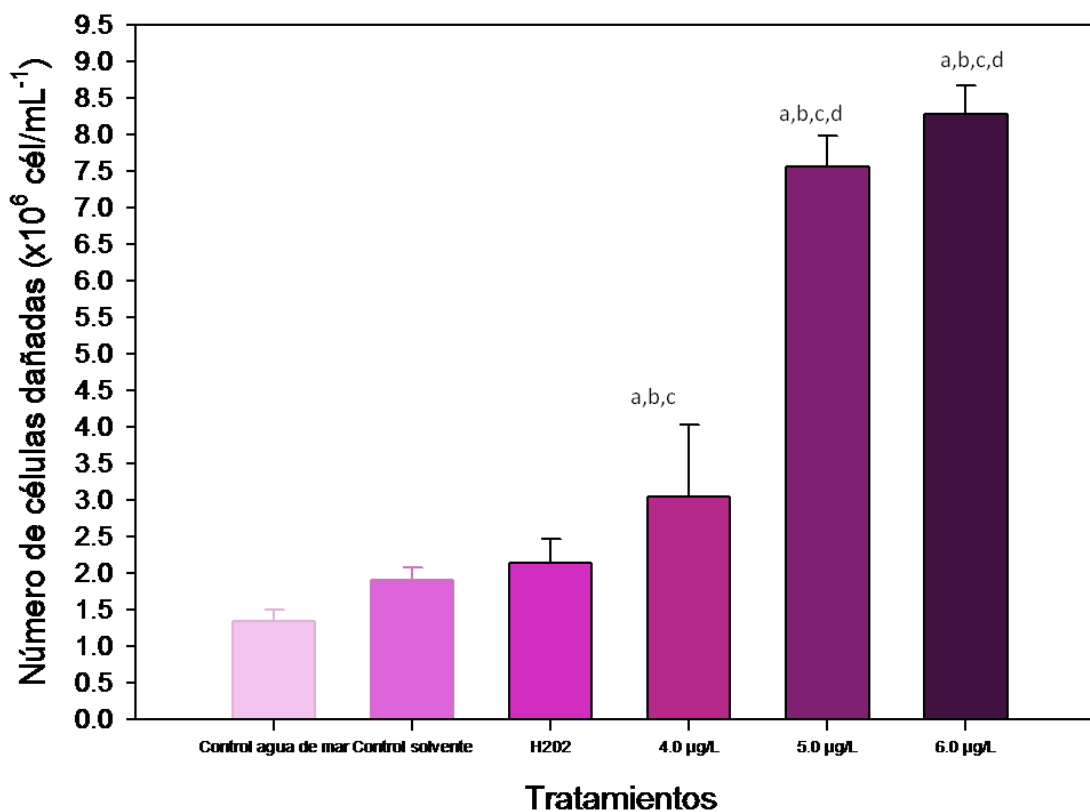


Figura 7. Efecto del benzo[a]pireno sobre *Dunaliella tertiolecta* expuesta a 4.0, 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 12 h en condiciones controladas. El ensayo se realizó con aireación, luz continua y temperatura 15 °C. Se tomó como criterio de efecto el número de células de *D. tertiolecta* que aparecieron inmóviles después de la exposición. Las barras representan la desviación estándar de $n = 3$. Control = Microalgas en agua de mar. Solvente = Microalgas en agua de mar con acetonitrilo en concentración $\leq 1\%$ H₂O₂ = Microalgas con peróxido de hidrógeno 0.50 mM. a = Significativamente diferente del control, b = Significativamente diferente del solvente, c = Significativamente diferente del H₂O₂, d = Significativamente diferente del B[a]P $4\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

VII.5.2. Ensayo cometa para *D. tertiolecta* expuesta a un gradiente de concentración de B[a]P

Con base en la información previamente obtenida en los experimentos realizados, se hicieron variantes: desde la preparación de laminillas, la lisis y el buffer hasta las condiciones de la electroforesis y finalmente se establecieron como condiciones óptimas las que aparecen en la Tabla IV.

Tabla IV. Condiciones del ensayo cometa aplicadas a *Dunaliella tertiolecta* expuesta a un gradiente de concentraciones de benzo[a]pireno durante 12 h.

Laminilla	En la laminilla se agrega una capa muy delgada de agarosa de punto de fusión normal, (0.65%). Luego se agregan las capas como se describe: Primera capa: 500 μ L de agarosa de punto de fusión normal (0.65 %). Segunda capa: 500 μ L de agarosa de bajo punto de fusión (0.65 %) con 300,000 células de <i>D. tertiolecta</i> . Tercera capa: 220 μ L de agarosa de punto bajo de fusión (0.65 %)
Lisis	NaOH 300 mM, Na ₂ EDTA 100 nM, pH 10 SDS 0.1%, 30 min, 15 °C EDTA 300 mM, NaOH1mM, pH 13, 20 min, 4 °C
Electroforesis	25 V 300 mA por 30 min
Tinción	70 μ L de DAPI al 5 μ g mL ⁻¹

Para cada tratamiento un campo de aproximadamen 100 células fueron contadas. En el control de agua de mar no se observó daño en la molécula del ADN. Como efecto del solvente (acetonitrilo) se observó la formación de un halo alrededor de las moléculas en aproximadamente 40 células sin llegar a la formación de un cometa. Para el caso del peróxido de hidrógeno, se observó en la mayoría de las células contabilizadas la formación de cometas claramente definidos. Los

efectos ocasionados en el ADN de las células sometidas a 4.0, 5.0 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P incluyeron la formación de agrupaciones de moléculas y la aparición de halos alrededor de la molécula, además de una tendencia a formar cometa, en particular en las células que estuvieron sometidas a la más alta concentración (Figura 8).

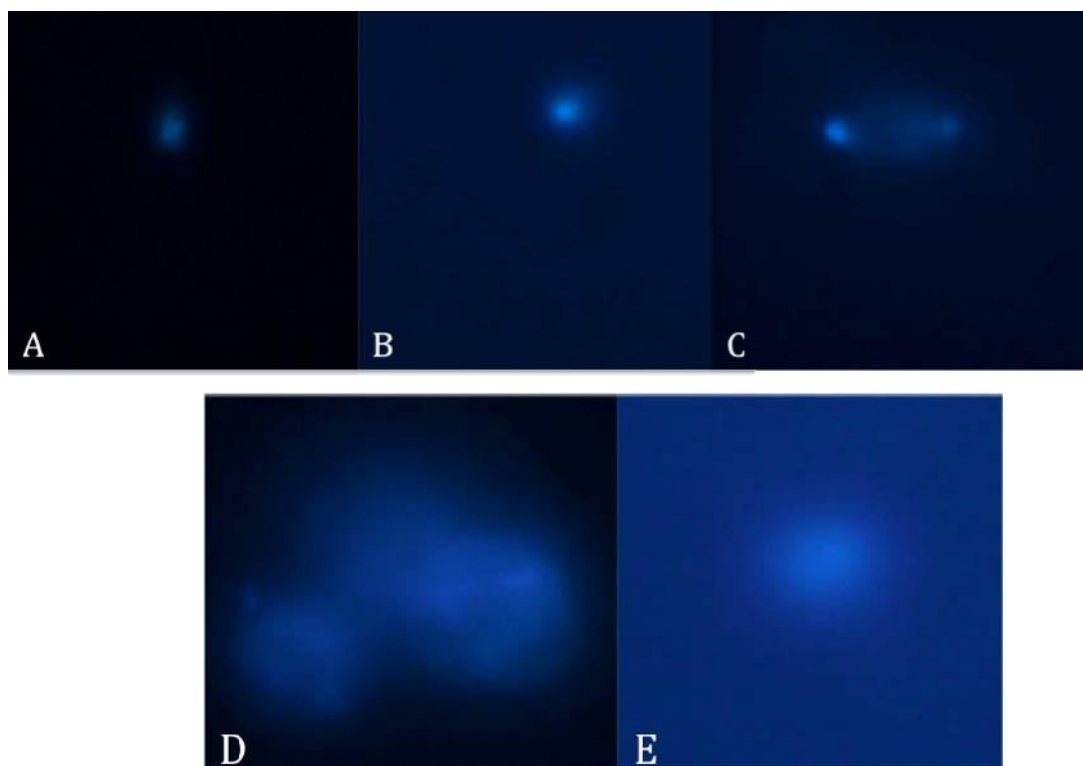


Figura 8. Fotografías de *Dunaliella tertiolecta* después de 12 h de exposición a un gradiente de concentraciones de benzo[a]pireno. A) Microalga en agua de mar, B) Microalga con solvente, C) Microalga con H_2O_2 , D) Microalga con B[a]P 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, E) Microalga con B[a]P 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, F) Microalga con B[a]P 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Colorante: DAPI (diclorhidrato de 4'6- diamidino-2 fenilindol). La observación se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia con objetivo 100x y filtro UV. Las condiciones en que se realizó el ensayo cometa se muestran en la Tabla IV.

VII.6. Análisis de viabilidad celular de *Dunaliella tertiolecta* expuesta a un gradiente de concentración de B[a]P

Tanto en las microalgas sin tratamiento (control) como en las que fueron tratadas con el acetonitrilo, se observó una coloración roja sobre las células, distribuida de manera homogénea en toda la superficie celular (Figuras 9A y 9B). Para el tratamiento con el peróxido de hidrógeno, se observa una coloración azul, en especial en el lugar de inserción de los flagelos (Figura 9C). Las microalgas expuestas a B[a]P en concentración de $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mostraron una coloración completamente roja pero también se observan células con una coloración azul cubriendo parcialmente la superficie celular (Figura 9D). La mayor intensidad en la coloración se encontró en las células expuestas a 5.0 y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P (Figuras 9E y 9F), en las que se observó una coloración azul intensa distribuida total y homogéneamente en la superficie de la célula, aunque también se observaron células teñidas de rojo. El cálculo del porcentaje de viabilidad celular dio un resultado del 40%.

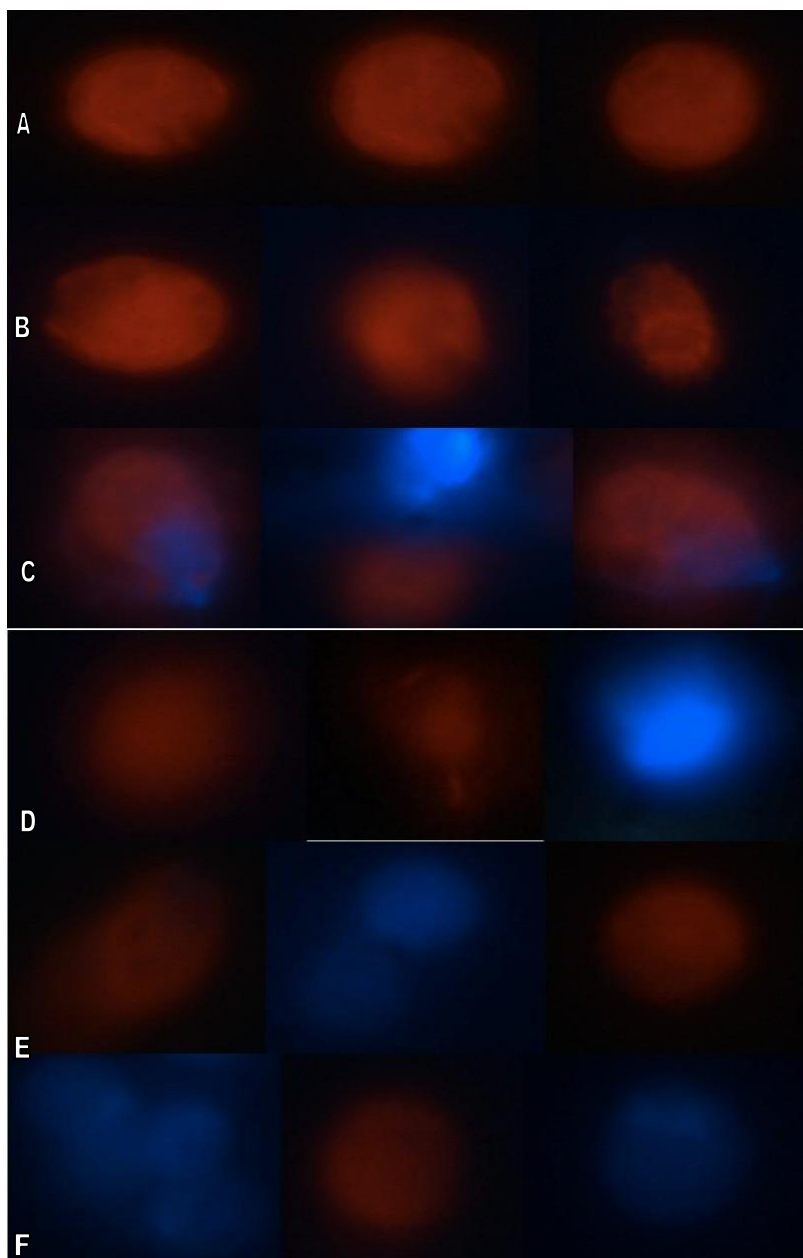


Figura 9. Fotografías de *Dunaliella tertiolecta* con fluorocromo para observar viabilidad celular . A) Microalga en agua de mar), B) Microalga con solvente, C) Microalga con H_2O_2 , D) Microalga con B[a]P $4.0 \mu g L^{-1}$, E) Microalga con B[a]P $5.0 \mu g L^{-1}$, F) Microalga con B[a]P $6.0 \mu g L^{-1}$. Colorante: Calcofluor White Stain. La observación se realizó utilizando microscopio de epifluorescencia con objetivo 100x y filtro UV. Las condiciones en que se realizaron en el ensayo cometa se muestran en la Tabla IV.

VIII. DISCUSIÓN

Una de las variables para medir toxicidad en fitoplacton es la densidad celular, utilizada para hacer comparaciones entre cultivos expuestos a contaminantes y cultivos que se encuentran sin la adición de un contaminante o sustancia tóxica, la cual ha sido utilizada ampliamente como una aproximación para conocer el estado fisiológico del fitoplancton (Cullen y Davis, 2003). Existen diferentes reportes donde se aplica la densidad celular como una medida de toxicidad, en los que la acción del tóxico es cuantificada dependiendo del cambio de la tasa de crecimiento en cultivos expuestos (Oliveira *et al.*, 2007). La utilidad de este parámetro ha sido demostrada por varios autores, ya que es una medición sencilla, rápida y fácil de realizar; por otra parte, es un parámetro sensible que puede poner de manifiesto la capacidad de los organismos para sobrevivir cuando el daño es reversible y permite la recuperación, como es el caso de algunos efectos subletales (Siron *et al.*, 1991). Otra situación que puede ser detectada es la habilidad de un organismo para inducir la producción de enzimas de biotransformación o para desarrollar mecanismos de defensa a nivel celular (Nikookarr *et al.*, 2005; Rojas-Leal, 2010). De lo anterior se desprende que el conteo celular puede ser de utilidad en la evaluación del desempeño de métodos no usados previamente en aplicaciones toxicológicas, o bien, en el seguimiento del daño que algunas sustancias ocasionan a nivel celular o bioquímico. Tal es el

caso de la evaluación de agentes genotóxicos, para los cuales hacen falta aplicaciones novedosas que permitan establecer el daño a nivel genómico. Un ejemplo de este tipo de sustancias es el benzo[a]pireno, un compuesto no polar cuyas características hidrofóbicas facilitan su entrada al organismo ya que posee una alta solubilidad en las membranas, siendo el ADN un solvente para este hidrocarburo (IARC, 1972).

Para evaluar un efecto subletal es necesario que el daño causado por el tóxico genere una respuesta intensa y observable, pero no letal; y de preferencia, que se genere un biomarcador utilizable para evaluar los posibles efectos (Guerra-Rivas *et al.*, 2010). Un efecto de este tipo es el ocasionado por el B[a]P, para el cual el conocimiento de su mecanismo de acción es crucial en la consideración de biomarcadores. Se sabe que la molécula de B[a]P es capaz de ocasionar daño al ADN enlazándose al receptor de hidrocarburo de aril, siendo transportado hacia el núcleo, activando la transcripción de segmentos particulares en la molécula del ADN y creando en ésta una serie de sitios lábiles a sustancia alcalinas que generan genotoxicidad (Denison y Naggy, 2003).

Para las microalgas, se ha encontrado que pueden desarrollar mecanismos de resistencia al estar expuestas a sustancias genotóxicas. Si bien puede observarse una completa inhibición del crecimiento, este efecto puede ser seguido de una recuperación gradual del crecimiento celular (Zbigniew y Wojciech, 2006). Cabe recalcar que en los análisis de toxicidad que se han realizado para algunos hidrocarburos, se ha reportado que éstos han demostrado ser no del todo tóxicos

para algunas microalgas (Fletcher, 1987), mientras que otros hidrocarburos pueden llegar a ser muy tóxicos (Kauss y Hutchinson, 1975; Corner *et al.*, 1976). Esto es en función tanto de la especie de microalga analizada, como del tipo del hidrocarburo a evaluar, pero también de las condiciones experimentales.

En el presente trabajo, se encontró que al primer contacto de *D. tertiolecta* con el hidrocarburo a una concentración de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ mostró un daño a las células, el cual ocasionó una notoria disminución en la densidad celular (tiempo 0 h, Figura 3), efecto que puede ser considerado como producto de la acción del B[a]P al irrumpir en la membrana celular. Por otra parte, el efecto del solvente no es significativo y el daño celular que se ocasiona no rebasa el que es generado por la manipulación propia del experimento, como lo muestra el control de microalgas en agua de mar en el mismo intervalo de tiempo. Esta primera aparición de daño celular, se revierte a medida que se permite el paso del tiempo, como se observa en la exposición durante 6 h, en donde el daño del B[a]P es menor que el que ocasiona el solvente. La falta de efecto en la fase final de la exposición, en el intervalo de 6 a 12 horas, se caracteriza por una semejanza en los valores de densidad entre las tres mediciones en cada intervalo de tiempo, alcanzando al final del experimento la observación general de que a la concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el medio, B[a]P no ejerce efecto sobre *D. tertiolecta*. Más aún, este primer experimento sugiere que a pesar de que el tiempo de exposición aumenta, la microalga puede soportar este nivel de hidrocarburo, ya que el daño es mínimo, o bien, *D. tertiolecta* es capaz de inducir un mecanismo general de resistencia al

mismo. Es decir, la respuesta de la microalga al B[a]P puede deberse a una aclimatación o adaptación del microorganismo a un cierto contaminante, determinada por la rapidez con la que el xenobiótico puede ser eliminado de su sistema. Estas adaptaciones pueden expresarse en mecanismos o procesos bioquímicos interrelacionados, como pueden ser algunos cambios genéticos para adquirir capacidades metabólicas (Spain *et al.*, 1983).

En el caso de *D. tertiolecta* expuesta a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P, se presentó una tendencia diferente a la observada en la concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Sin embargo, para esta concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, al tiempo 0 h se reportó también un efecto del solvente, como lo muestra la diferencia significativa con respecto al tiempo 0 del control con microalgas en agua de mar (Tiempo 0 h, Figura 4). En este intervalo, que incluye el efecto de la manipulación y el primer contacto con los agentes xenobióticos agregados (solvente y B[a]P), se muestra que existe una sinergia entre ambos al estar en contacto con la microalga. Sin embargo, esta sinergia desaparece a partir de un tiempo de exposición de 3 h, en donde sólo se observó un efecto significativo para el B[a]P. En comparación con el efecto del primer contacto, en donde tanto solvente como hidrocarburo ejercen efecto, durante la exposición ampliada a 3 h, el efecto de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P es exclusivo para el B[a]P, y a partir de ese intervalo se repite el patrón de efecto que ejerce el B[a]P a la concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Por otra parte, este experimento a concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sugiere la posibilidad de que durante un tiempo de exposición breve, el B[a]P a este nivel es retrasado en su efecto y es hasta periodos más extendidos de exposición

cuando se denota la reversión de efectos que mencionan Volloton *et al.* (2008), quienes afirman que la reversión de efecto es posible si se activan enzimas como el citocromo P450. Además, queda claro que la introducción de un agente xenobiótico a través de la membrana celular se facilita si la concentración es mayor, en este caso para B[a]P, si comparamos el experimento al utilizar ($1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y el presente ($3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). De acuerdo con los aspectos fundamentales de la toxicología, cualquier agente xenobiótico se verá facilitado en su difusión a través de la membrana si ésta cuenta con un buen gradiente de concentración, ya que obedece la ley de Fick, siempre y cuando su actividad química no se vea rebasada, lo cual no ocurre a bajas concentraciones. Si se suma a este hecho el alto coeficiente de partición del B[a]P, se puede explicar el rápido efecto (tiempo 0 y tiempo 3 h) y la rápida eliminación de la molécula de B[a]P del sistema celular. Es decir, tanto la primera fase como la última en el comportamiento del B[a]P sobre *D. tertiolecta* y la respuesta que ésta manifiesta hacia el hidrocarburo, pueden ser explicados mediante la aplicación de la ley de Fick y el alto coeficiente de partición del tóxico.

Con respecto a la concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a pesar de la diversidad aparente de efectos del solvente y de B[a]P sobre *D. tertiolecta*, un análisis cuidadoso de los resultados arroja concordancia con el experimento y las observaciones anteriores. Como se observa (Figura 6), el B[a]P ejerce un efecto constante y al menos hasta las 9 h de exposición, causa daño celular significativo en comparación con los demás tratamientos, alcanzando su máximo efecto a las 3

h de exposición. A la vez, el control solvente muestra alternancia en el efecto, siendo significativamente mayor al primer contacto, pierde efecto a las 3 h y 6 h de exposición; recupera su significancia a las 9 h, y vuelve a perderse a las 12 h de exposición. Con base en lo anteriormente mencionado, es explicable esta serie de fenómenos si consideramos la ley de Fick: se sigue facilitando la entrada por gradiente de concentración, y además, por su coeficiente de partición. Al mismo tiempo, aún es posible para *D. tertiolecta* eliminar al B[a]P y finalmente, logra adaptarse a la presencia del mismo a las 12 h. Más aún, si se toma en cuenta el experimento siguiente, en donde el análisis estadístico mostró que la concentración necesaria de B[a]P para causar daño celular en períodos largos de exposición es de por lo menos $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se refuerza el hecho de que, a $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y a un tiempo extendido de exposición, *D. tertiolecta* es capaz de resistir mediante algún mecanismo la acción del B[a]P. Esto concuerda con lo reportado por Guerra-Rivas *et al.* (2010) para otro HPA, quienes señalan que *D. tertiolecta* responde al fenantreno mediante la bioconcentración, que consiste en la introducción del HPA a su sistema, siendo posible que lo bioconcentre y remueva un 95 % del mismo en un tiempo aproximado de dos horas. Otros autores (Wang *et al.*, 2002), reportaron que en especies de microalgas que fueron expuestas a bajas concentraciones de antraceno (1.5 a $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) se presenta crecimiento, así como altos contenidos de proteínas, clorofila a y carotenos, los que aumentaron de acuerdo con la densidad celular.

La técnica del ensayo cometa es utilizada cada vez más en pruebas de genotoxicidad, ya que con ella se pueden descubrir los diferentes tipos de daño de ADN, ya sea roturas simples o de doble cadena del ADN, así como sitios alcalilábiles, o bien entrecruzamientos de ADN-ADN y ADN-proteína (Singh *et al.*, 1988). En este trabajo se evaluó la sensibilidad del ensayo cometa para medir genotoxicidad en células vegetales, así como la viabilidad de *D. tertiolecta* después de exponerse al benzo[a]pireno. Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en los efectos con B[a]P en comparación con el control negativo (microalga con agua de mar); también se observó que el nivel de daño se incrementó a medida que aumentaba la concentración del B[a]P o bien, el tiempo de exposición. Además, se encontró que existe un incremento en la migración de la cola del cometa para los experimentos en los que se utilizaron concentraciones arriba de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P después de 9 horas de estar en contacto con el hidrocarburo (Figuras 4, 6 y 9). Las imágenes de cometa obtenidas en el presente estudio mostraron una apariencia muy parecida a la que encontró Singh *et al.* (1988) en linfocitos humanos bajo el efecto de Rayos X. De la misma manera, Somshekar *et al.* (2006) encontraron cometas que mostraron el daño sobre ADN en la diatomea marina *Chaetoceros tenuissimus*. En ambos trabajos se demostró que la velocidad de migración es directamente proporcional al daño ocasionado en la cadena de ADN, independientemente de la naturaleza del agente genotóxico, químico o físico. Por lo anterior, era de esperarse que mientras no ocurriera la muerte celular a $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de B[a]P, sólo resultaría afectada la posición final de la

molécula de ADN pero no se modificaría la forma del cometa, ya que el daño ocasionado por estas concentraciones de B[a]P es similar al de los agentes mencionados y probablemente sea sólo una cadena la que fue afectada (Tice *et al.*, 2000). Por otra parte, pudiera existir la sospecha de que existió fragmentación nuclear por apoptosis, ya que este proceso también ocasiona la formación de cometas. Sin embargo, esta conclusión es descartable debido a que el tamaño y forma de los cometas obtenidos no corresponden a cometas que han sufrido apoptosis, ya que ésta ocasiona un cometa tipo “headgehog”, término que describe a un cometa con una cabeza muy pequeña y una cauda muy larga en forma de abanico, lo cual no es el caso de los obtenidos en el presente trabajo (Rundell *et al.*, 2003).

Con base en los resultados obtenidos a las concentraciones de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ así como en $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ se realizó un último experimento donde se probaron 3 controles y concentraciones más elevadas de B[a]P, las que fueron 4.0, 5.0 y $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En este experimento, la mayoría de las moléculas observadas presentaban un fenómeno diferente a lo observado a concentraciones más bajas: la aparición de conglomerados de moléculas en conjuntos de 2, 3 o 4 moléculas de ADN (Figura 9D). Esta unión, o fusión de moléculas de ADN unidas entre sí fueron descubiertas por Holliday desde hace más de cuarenta años (1964) y descritas en la última década con mayor precisión (Hays *et al.*, 2006; Liberi y Foiani, 2010). De acuerdo con estos autores, los entrecruzamientos se deben a procesos de reparación de ADN que un organismo realiza para preservar información genética. Aplicando estos

hallazgos, podemos hipotetizar que *D. tertiolecta*, al exponerse a altas concentraciones de B[a]P sufrió rupturas en la cadena de ADN, dejando expuestos nuevos sitios de síntesis y creando la posibilidad de entrecruzamientos entre moléculas a través de nuevas interacciones ADN-ADN. Como resultado, podrían generarse sitios de crecimiento de núcleos de ADN que en conjunto formarían racimos o conglomerados.

Como se esperaba, el peróxido de hidrógeno 0.05 mM (control positivo) indujo un aumento en la migración de ADN mientras que el solvente (acetonitrilo) sólo causó un daño leve (Figura 9 C). Como se sabe, el peróxido de hidrógeno es uno de los más potentes agentes químicos que causan daño en el ADN debido a su capacidad para generar radicales libres (Heaton *et al.*, 2002). Por esta razón, se consideró conveniente utilizarlo como control positivo y monitorear con ello el daño producido a la molécula. Por lo tanto, la aparición de cometas en el tratamiento con H₂O₂ garantiza la calidad de los resultados obtenidos. Trabajos como el de Erbes (1997) hacen uso de este tipo de monitoreo para evaluar la sensibilidad del ensayo cometa en la detección de daño al ADN para *Chlamydomonas reinhardtii*. En su estudio, Erbes (1997) sometió a esta microalga durante dos horas al peróxido de hidrógeno en la oscuridad y detectó daño en la integridad del ADN (Erbes *et al.*, 1997).

Con respecto al análisis de viabilidad de *D. tertiolecta* a altas concentraciones mediante el uso de los fluorocromos, se observó un cambio en su morfología debido a la exposición al benzo[a]pireno, presentando un aumento en

el volumen de las células, así como la inmovilización de las mismas. Este efecto ha sido reconocido como una estrategia celular para contrarrestar el estrés sufrido por la exposición, como lo afirman Bolaños y García (1992) por medio de las observaciones mediante fotografías obtenidas con el microscopio de epifluorescencia similares a las que se reportan en este trabajo. A pesar de este mecanismo de defensa, el deterioro en las células es evidente, de manera similar a lo observado por estos autores.

El colorante Calcofluor White Stain tiñe las paredes celulares de plantas superiores, así como la pared de hongos y algas, debido a su alta afinidad por las estructuras con alto contenido de polisacáridos. Estudios realizados por Fischer *et al.* (1985) demuestran que este fluorocromo solamente tiñe las paredes de células vivas, por lo cual sugieren que dicho compuesto puede ser aplicado para la diferenciación entre células vivas y muertas. Sin embargo, en el presente trabajo, se observó una diferencia de intensidad de las células teñidas, con lo que se puede decir que la coloración depende del grado de daño ocasionado por el contacto con el B[a]P. Esto concuerda con otros estudios, como los realizados por Markelova *et al.* (2000) con *Chlorella*, *Coelastrum nephrochoris* y *Haematococcus*, en los que concluyeron que la intensidad de la fluorescencia depende del tamaño de la célula y está evidentemente relacionado con los cambios en la composición química de las estructuras de los polisacáridos. Según estos autores, este fluorocromo puede ser usado no solamente para diferenciar células vivas de las muertas sino también para predecir el estado fisiológico de las algas unicelulares debido a que ambas se

tiñen por igual, y el nivel de teñido va directamente relacionado con el nivel de daño ocasionado por el tóxico.

Para *D. tertiolecta*, se observó que la tinción se llevó a cabo en el punto de inserción de los órganos de movilidad (flagelos) al cuerpo celular. Esto es de esperarse si el colorante se enlaza a sitios celulares de alto contenido de polisacáridos. Sin embargo, la tinción no se observa con alta definición en toda la célula debido a la carencia de pared celular en *D. tertiolecta*. Por otra parte, a pesar de un aparente deterioro, la célula se observa completa para los casos de controles, tanto el de agua de mar como el de acetonitrilo y el de peróxido. En cambio, se observan anomalías en la morfología de la membrana, indicando penetración del B[a]P a todas las concentraciones probadas en este experimento (4, 5 y 6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y a este tiempo de exposición de 12 h. Estas observaciones concuerdan con el resultado de la medición de densidad celular, en la prueba de toxicidad ante el gradiente de concentración, en los que se puede observar que a estas concentraciones de B[a]P existe daño significativo.

Existen reportes similares a este trabajo que en conjunto sugieren que las microalgas no sólo pueden sobrevivir en presencia de hidrocarburos, sino que aparentemente desarrollan mecanismos por los cuales pueden adaptarse a los mismos. Lei *et al.* (2002) demostraron la eficiencia para la remoción de pireno a bajas concentraciones en varias microalgas, entre ellas *Chlamydomonas* sp., *Chlorella vulgaris* y *Selenastrum capricornutum*. Para *Isochrysis galbana*, Wang *et al.* (2002) reportaron crecimiento en presencia de antraceno a concentraciones entre

1.5 y 6.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, las cuales son muy parecidas a las utilizadas en el presente trabajo. Por su parte, Guerra-Rivas *et al.* (2010) encontraron que *D. tertiolecta* al ser expuesta a concentraciones entre 1.3 - 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de antraceno fue capaz de bioconcentrar más del 95% del medio circundante del hidrocarburo. Velázquez-Pech (2010) demostró la recuperación de la eficiencia fotosintética de *D. tertiolecta* después de haber sido expuesta a concentraciones entre 6.0 y 15.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A pesar de la concentración de B[a]P usada en el presente estudio, que resulta ser baja en comparación con la utilizada por Velázquez-Pech (2010) en su trabajo sobre efectos de B[a]P en el sistema fotosintético, en ambos trabajos hay concordancia. Tanto en el sistema fotosintético como en el ADN estudiado en el presente trabajo, existe la coincidencia en afirmar la capacidad de la microalga para resistir altas concentraciones en tiempos cortos; o bien, bajas concentraciones en períodos prolongados. Por otra parte, Yan *et al.* (2002) mencionan que a la concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ bajo luz blanca, *Chlorella prothecoides* realiza degradación del antraceno en un 29 al 30%. Los resultados de ambos trabajos y los del presente estudio sugieren que *D. tertiolecta* posee mecanismos de resistencia, lo que la hace ser un buen bioindicador para sustancias genotóxicas.

Para el análisis de viabilidad celular, se realizaron conteos de células con el fin de tener una estimación del daño producido por la exposición al B[a]P. En los resultados de este estudio se estima un porcentaje del 40% de viabilidad celular, el cual está relacionado con la observación de las fotografías donde se mostraron células dañadas y sin daño. En los resultados obtenidos se verificó lo propuesto en

el trabajo de Markelova *et al.* (2000), quienes afirman que estos fluorocromos no deben ser usados solamente para diferenciar células vivas de las muertas debido a que ambas se tiñen por igual, y el nivel de teñido va directamente relacionado con el nivel de daño ocasionado por el tóxico. Con esta base, es posible hipotetizar que, si bien ocurre un efecto por causa del B[a]P, éste no necesariamente es cuantitativo, sino que puede ser gradual, o bien es reparado de tal forma que simultáneamente ocurre el daño y la reparación y la resultante es un daño parcial. Otra posibilidad que los resultados en el presente experimento sugieren es la ocurrencia de una resistencia al tóxico inducida por el B[a]P en *D. tertiolecta* relacionada con mecanismos fisiológicos o mutacionales llevados a cabo por la propia célula. En relación a esto, Carrera-Martínez *et al.* (2010) reportaron una rápida evolución en *D. tertiolecta* que ocurre como resultado de una mutación preselectiva al ser expuesta al petróleo obtenido de una derrama en el mar. Dichos autores encontraron que esta especie es capaz de generar cepas resistentes al petróleo mediante mutaciones que llevan a cabo de manera espontánea antes de entrar en contacto directo con el agente causal a una velocidad de 2.76×10^{-5} mutantes por división celular llegando a alcanzar en el equilibrio 6 células resistentes al petróleo (mutantes) por cada 1000 células de tipo salvaje. De acuerdo con los autores mencionados, con estas cifras la población microalgal asegura una adaptación a un ambiente contaminado por una catástrofe ambiental. Por otra parte, Carrera Martínez *et al.* (2010) mencionan que la diatomea *Skeletonema costatum* es capaz de recuperar en 5 h su eficiencia fotosintética perdida por efecto del

petróleo. Con base en la discusión previa, es posible afirmar que *D. tertiolecta* es capaz de resistir ambientes contaminados por petróleo, sus derivados o bien alguno de sus componentes como el B[a]P, al menos en el intervalo de concentraciones utilizadas en este trabajo.

Los datos obtenidos en el presente estudio mostraron que *D. tertiolecta* es capaz de presentar adaptaciones a agentes genotóxicos, ya que después de exponerse al hidrocarburo bajo una serie de concentraciones y tiempos de exposición, esta microalga fué capaz de adaptarse aún después de haber sido expuesta a la concentración más alta probada en este trabajo. Lo anterior demuestra que *D. tertiolecta* es capaz de resistir y mantener su viabilidad después de estar en contacto con benzo[a]pireno en un tiempo prolongado.

IX. CONCLUSIONES

- 1.- El B[a]P, a una concentración de $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ejerce un efecto significativo sobre las células de *Dunaliella tertiolecta* al contacto inmediato, efecto tóxico detectado por la medición de densidad celular, pero no mediante el ensayo cometa.

- 2.- El ensayo cometa, adaptado a la microalga marina *D. tertiolecta*, mostró que:
 - a) El efecto tóxico que ejerce el B[a]P a una concentración de $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sobre *D. tertiolecta* durante 6 horas de exposición mediante conteso celulares es detectado por el ensayo cometa a las 9 horas de exposición.

 - b) El B[a]P, a una concentración de $3.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ejerce un efecto de daño genómico sobre las células de *Dunaliella. tertiolecta* al ser expuestas durante 9 horas, detección del efecto tóxico mediante el uso de la densidad celular como criterio de toxicidad.

 - c) Las células de *D. tertiolecta* resultan con daño a nivel genómico al ser expuestas a una concentración de benzo[a]pireno de $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ durante 12 horas, lo que no fue detectado con el uso de la densidad celular como criterio de toxicidad.

- d) Las células de *Dunaliella tertiolecta* resultan con daño a nivel genómico al ser expuestas a concentraciones de benzo[a]pireno de 5.0 y 6.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ por un tiempo de 12 horas, lo que concuerda con el uso de la densidad celular como criterio de toxicidad.
- 3.- La adaptación del protocolo del ensayo cometa para su aplicación en células vegetales realizada en el presente trabajo puede ser una herramienta útil en la detección de daño genómico en *D. tertiolecta*.

X. LITERATURA CITADA

- Aoyama, K., K. Iwahori, N. Miyata. 2003. Application of *Euglena gracilis* to comet assay: evaluation of DNA damage and repair. *Mutation Research*. 538: 155-162.
- Ashton, G., Boos, K., Shucksmith, R., E. Cook. 2000. Rapid assessment of the distribution of marine non-native species in Scotland. *Aquatic Invasion*. 1(4): 200-213.
- Avron, M., A. Ben-Amotz. 1992. *Dunaliella*: Physiology, biochemistry and biotechnology. CRC Press. England, London. 255p.
- Bolaños, L., G.M. García. 1992. Differential toxicological response to cadmium in *Anabaena* strain PCC 7119 grown with NO_3 and NH_4 as nitrogen source. *Journal of Plant Physiology*. 140(3): 345-349.
- Carrera-Martínez, D., A. Mateos Sanz, V. López Rodas, E. Costas. 2010. Microalgae response to petroleum spill: and experimental model analyzing physiological and genetic response of *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyceae) to oil samples from the tanker Prestige. *Aquatic Toxicology*. 97(2): 151-160

Corner, E.D.S., R.P. Harris, C.C. Kilvington, S.C. M.O'Hara. 1976. Petroleum compounds in the marine food web. Short term experiments on the fate of naphthalene in *Calanus*. *Journal of Marine Biology*. 56(1): 121-133.

Cullen, J., R. Davis. 2003. The blank can make a big difference in oceanographic measurements. *Limnology and Oceanography Bulletin*. 12(2): 29-35.

Dawes, C. 1986. *Marine Botany* Second edition. John Wiley & Sons. Inc. New York, New York, USA. 400 p.

Denison, M. S., S. R. Naggy. 2003. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annual Review Of Pharmacology and Toxicology*. 43: 309-334.

De Lorenzo, M.E., L.A. Taylor, S.A. Lund, P.L. Pennington, E.D. Strozier, M.H. Fulton. 2002. Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*. 42: 173-191.

Erbes, M., A. We, U. Obst, A. Wild. 1997. Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 458: 448-458.

- Fairbairn, DW, P.L. Olive. 1995. The comet assay: comprehensive review. *Mutation Research* 399: 37-59.
- Farrington, J. W., G.S. Giam, G.R. Harvey, L.P. Parker, J.M. Teal. 1972. Analytical Techniques for selected organic compounds. En: Goldberg E. D. (Ed.). *Marine Pollution Monitoring: Strategies for a National Program*, a workshop in Santa Catalina Marine Biological Laboratory. 152-176 p.
- Ferrera-Cerrato, R., N. Rojas-Avelizapa, M. Poggi-Varaldo. 2006. Procesos de biorremediación de suelos y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana. Microbiología*. 48(2): 179-187.
- Fetzer, J. C. 2000. *The chemistry and analysis of the large polycyclic aromatic hydrocarbons*. A. Chemicals. Moffett Field, California. USA. 350 p.
- Fischer, J.M., Peterson, C.A., N.C Bols. 1985. A new fluorescent test for cell vitality using Calcofluor White M2R. *Stain technology*. 60(2): 69-79.
- Fletcher, W.J. 1987. Interactions among subtidal Australian sea urchins, gastropods and algae: Effects of experimental removals. *Ecological Monographs*. 57(1): 89-109.

Guerra Rivas, G. 2003. Biocatalizadores y biomarcadores moleculares de organismos marinos. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. (CICESE) 177 p.

Guerra-Rivas, G. 2010. Apuntes de Toxicología Marina. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Guerra Rivas G., C.M. Gomez-Gutiérrez, B. Cordero-Esquivel. 2010. Evaluación de la capacidad de *Dunaliella tertiolecta* para la remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Libro conmemorativo del XV Congreso Nacional de Oceanografía. Asociación de Oceanólogos de México, A.C., Universidad Autónoma de Baja California.

Hays, F.A. Schirf, V., Shing Ho, P., y B. Demeler. 2006. Solution Formation of Holliday Junctions in Inverted-Repeat DNA Sequences. *Biochemistry*. 45(8): 2467-2471.

Heaton P. R., Ransley, R., Charlton, C.R., Mann, S.J., Stevenson, J., Smith, B.H.E., Rawlings M.J., E.J. Harper. 2002. Application of Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay for Assessing Levels of DNA Damage in Canine and Feline Leukocytes. *The Journal of Nutrition*. 132: 1598S-1603S.

Hook, I.L., S. Ryan, H. Sheridan. 2003. Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpene ketones and their derivatives by five species of marine microalgae. *Phytochemistry*. 63: 31-36.

Holliday, R. 1964. The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C In *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics*. 50: 323-335.

IARC (1972). International Agency of Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Vol 1, Some Inorganic Substance, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds, and Natural Products. Lyon, France. 184 p.

Kauss, P.B., T.C. Hutchinson. 1975. Studies on the susceptibility of *Ankistrodesmu* species to crude oil components. *Verh. International Verein Limnology* 19: 2155-2164.

Kraybill, H.F. 1997. Global distribution of carcinogenic pollutants in water. *Annals Academic Science*. 298: 20-30.

Lei, A.P., Wong, Y.S., N.F. Tam. 2002. Removal of pyrene by different microalgae species. *Water Science Technology*. 46(11-12): 195-201.

Libery, G., M. Foiani. 2010. The double life of Holliday junctions. *Cell Research*. 20(6): 611-614.

Markelova, A.G., M.G.Valdimirova, E.S. Kuptsova. 2000. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. *Russian Journal of Plant Physiology*. 47: 924-934.

McCarthy, J.F., L.R. Shugart. 1990. Biomarkers of environmental contamination Lewis Publishers. Chelsea, Michigan 457 p.

McKelvey-Martin, V.J., M.H. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Méo, A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European Review. *Mutation Research*. 288: 47-63.

Menzie, C.A., B.B. Patocki, J. Santodonato. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science Technology*. 26: 1278-1284.

Nikookar, K, A. Moradshahi, L. Hosseini. 2005. Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity. *Biomolecular Engineering*. 22: 141–146.

- Oliveira, J.B, A.M.M Gonçalves, F. Gonçalves, M.J. Pereira. 2007. Growth inhibition of algae exposed to paraquat. *Fresenius Environmental Bulletin*. 16: 621-625.
- Oost Ron van der., J. Beber, P.E. Vermeulen- Nico. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13: 57-149.
- Phillips, M.C., H. Hauser, F. Paltauf. 1980. The inter- and intra-molecular mixing of hydrocarbon chains in lecithin/water systems. *Chemistry and Physics of Lipids*. 8: 127-133.
- Prado, R., R. García, C. Rioboo, C. Herrero, J. Abalde, A. Cid. 2009. Comparison of the sensitivity of different toxicity test endpoints in a microalga exposed to the herbicide paraquat. *Environment International*. 35: 240-247.
- Rafin, C., O. Potin., E. Veignie., A. Lounes Hadj-Sahraoui., M. Sancholle. 2000. Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by non white-rot-fungus *Fusarium solani*. *Polycyclic Aromatic Compounds. Environmental Pollution*. 21: 311-329.

- Reunova, Y., N. Aizdaicher, N. Khristoforova, A. Reunov. 2007. Growth and ultrastructure of the marine unicellular alga *Dunaliella salina* (Chlorophyta) after chronic selenium intoxication. *Marine Biology*. 33: 166-172.
- Rojas Leal, A. M. 2010. Evaluación de NADPH citocromo P450 reductasa en la microalga *Dunaliella tertiolecta* en presencia de benzo[a]pireno. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Marinas. Universidad Autónoma de Baja California (UABC) . 47 pag.
- Rundell, M.S., Wagner, E.D., M.J. Plewa. 2003. The Comet Assay: Genotoxic Damage or Nuclear Fragmentation?. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 42: 61-67.
- Russo, L., V. Belgiorno. 2009. Combined chemical and biological treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. 11th International Conference of Environmental Science and Technology. 1217-1223 p.
- Rydberg, B., K.J. Johanson. 1978. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. Academic Press New York, USA, 465-468 p.

- Singh, N.P., M.T. Mc Coy, R. Tice, E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 175: 184-191.
- Siron, R., Giusti, G, Berland B., Morales-Loo, R, E. Pelletier. 1991. Water-soluble petroleum compounds: chemical aspects and effects on the growth of microalgae. *The Science of the Total Environment*. 104: 211-227.
- Somshekhar, R Desai, Xivanand, N., U. Goswami. 2006. Genotoxicity of cadmium in marine diatom *Chaetoceros tenuissimus* using the alkaline comet assay. *Ecotoxicology*. 15(4): 359-363.
- Spain, J.C., P.A. von Veld. 1983. Adaptation of natural populations to degrade xenobiotics compounds. Effects of concentrations exposure time, inoculum and chemical structure. *Applied Environmental Microbiology*. 45: 428-435.
- Streble, H., D. Krauter. 1987. Atlas de microorganismos de agua dulce. La vida en una gota de agua. Omega-España, Eds. Madrid, España. 372 p.
- Tafreshi, A.H., M. Shariati. 2009. Dunaliella biotechnology: Methods and applications *Strain*. 107: 14-35.

- Tafreshi, A.H., M. Shariati. 2006. Pilot culture of three strains of *Dunaliella salina* for β -carotene production in open ponds in the central region of Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 1003-1009.
- Tice, R R., M. Vásquez. 1999. ILS : pH > 13 Alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. Prepared by: Electrophoresis. 184-191.
- Tice, RR, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35: 206-221.
- Torres, A.M., M.P. Barros, S.C.G. Campos, E. Pinto, S. Rajamani, R.T. Sayre, P. Colepicolo. 2008. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(1): 1-15.
- Ueng, Y., T. Shimada, Y.J. Chun, F. Guengerich. 1994. Oxidation of aflatoxin B1 by bacterial recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chemical Research and Toxicology*. 8: 218-225.

- Vega, G. S., O.J. Reynaga. 1990. Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales. Editorial Limusa, México, D. F. 722 p.
- Velázquez Pech, L. M. 2010. Evaluación del efecto de la exposición al hidrocarburo benzo[a]pireno sobre la eficiencia fotosintética de tres microalgas marinas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica de Estudios Superiores de Ensenada. B.C. (CICESE). 69 p.
- Venkatadri, R., R.W. Peters. 1993. Chemical oxidation technologies: ultraviolet light/hydrogen peroxide, Fenton's reagent and titanium dioxide-assisted photocatalysis. Hazard Waste Hazard Mater. 10: 107-119.
- Volloton, N., R.I. Lambertus, B.I. Escher, J. Krayenbuhl, N. Chevre. 2008. Effect of pulse herbicidal exposure on *Scenedesmus vacuolatus*: A comparison of two photosystems II inhibitors. Environmental Toxicology and Chemistry. 27(6): 1399-1407.
- Wang, Y., X. Tang, Y. Liu. 2002. Simulation effect of anthracene on marine microalgae growth. (Article in Chinese, abstract in English). Ying yong sheng tai xue bao. Marine. 13(3): 343-346.

Yan, X., Y. Yang, Y. Li, G. Yan. 2002. Accumulation and biodegradation of anthracene by *Chlorella prothecoides* under different trophic conditions. *Ying yong sheng tai xue bao Marine*. 13(2): 145-150.

Zbigniew, T., P. Wojciech. 2006. Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 65(3): 323-331.

ANEXOS

Tabla V. Variantes realizadas en la preparación de las laminillas utilizadas para el ensayo cometa en células de *Dunaliella tertiolecta* después de la exposición al hidrocarburo policíclico aromático benzo[a]pireno.

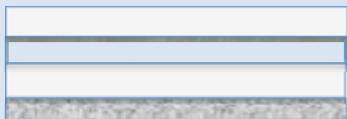
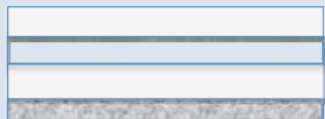
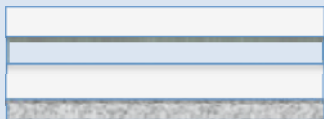
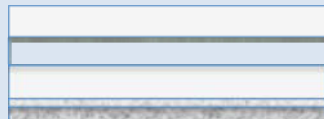
Preparación de Laminillas			
			
<p>En la laminilla esmerilada se agrega una capa de 250 μL de agarosa punto normal fusión, seguida de esta se agrega una segunda capa 250 μL la cual contiene las células de <i>D. tertiolecta</i>, al final se agrega una tercera capa 180μL de agarosa punto bajo de fusión como protección.</p>	<p>En la laminilla esmerilada se agrega una capa de 400 μL de agarosa punto normal fusión, seguida de ésta se agrega una segunda capa 400 μL punto bajo de fusión la cual contiene las células de <i>D. tertiolecta</i>, al final una tercera capa 220μL de agarosa punto bajo de fusión como protección.</p>	<p>En la laminilla esmerilada se agrega una capa de 500 μL de agarosa punto normal fusión, seguida de esta se agrega una segunda capa de agarosa punto bajo de fusión 500 μL la cual contiene las células de <i>D. tertiolecta</i>, al final una tercera capa de agarosa punto bajo de fusión 320μL como protección.</p>	<p>En la laminillas se agrega una capa muy delgada de agarosa punto normal fusión esto es para ayudar a visualizar mejor las células ya que son de un tamaño muy pequeño y se dificulta su visualización, posterior a esto se agregan las capas como anteriormente se describen solamente cambiando la cantidad de agarosa a utilizar.</p>

Tabla VI. Variantes realizadas en la lisis en células de *Dunaliella tertiolecta* después de haber sido expuestas al hidrocarburo policíclico aromático benzo[a]pireno.

Lisis					
NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10, Triton X-100 1%, SDS 1% 1h, 4 °C Volumen 1L	NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10, Triton X-100 1.1%, 1.3%, 1.5%, 1.7%, 2% SDS 1.1%, 1.3%, 1.5%, 1.7%, 2% 2h, 3h, 4h, 4 °C Volumen 1L	NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10 M, pH 10 Triton X-100 1.5%, 1.7% SDS 1.5%, 1.7% 2h, 4 °C Volumen 1L	NaCl 2.5 M, Na ₂ EDTA 100 nM, Tris 10M, pH 10 Triton X-100 1.7% SDS 1.7% 2h, 4 °C Volumen 1L	NaOH 300 mM, Na ₂ EDTA 100nM, pH 10 SDS .1% 5, 10, 15 y 20 min, 15°C Volumen 1L	NaOH 300 mM, Na ₂ EDTA 100 nM, pH 10 SDS .1% 20 min, 15°C Volumen 1L

