

Protocolo para obtener células en suspensión de *Artemia franciscana* para realizar electroforesis unicelular alcalina

Protocol to obtain suspension cells from *Artemia franciscana* for alkaline unicellular electrophoresis

María del Carmen Guzmán-Martínez,¹ Patricia Ramírez-Romero,¹
Karla Dávalos de la Cruz² y María de los Ángeles Aguilar Santamaría²

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Laboratorio de Ecotoxicología. Depto. de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

²Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Laboratorio de Genética. Depto. de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Av. San Rafael Atlixco # 186. Apdo. Postal 55-535. Col. Vicentina. Iztapalapa, D. F., México, 09340. México
e-mail: chilbilkin@gmail.com

Guzmán-Martínez M. C., P. Ramírez-Romero, K. Dávalos de la Cruz y M. A. Aguilar Santamaría .2013. Protocolo para obtener células en suspensión de *Artemia franciscana* para realizar electroforesis unicelular alcalina. *Hidrobiológica* 23 (1): 133-137.

ABSTRACT

Unicellular electrophoresis is a highly sensitive assay to detect DNA damage caused by various physical, chemical and biological agents. Despite *Artemia franciscana* is an important experimental model in different areas, there are no studies that refer to genotoxicity in *Artemia* through this assay. The aim of this study was to establish the protocol to obtain a cell suspension of *A. franciscana* appropriate in quality and quantity to assess single DNA strand breaks through the comet assay in the future studies.

Key words: *Artemia*, cell suspension, comet assay, biomarkers.

RESUMEN

La electroforesis unicelular es un ensayo muy sensible para detectar el daño en el ADN provocado por diferentes agentes físicos, químicos y biológicos. A pesar de que *Artemia franciscana* es un modelo experimental muy importante en diferentes áreas, en la literatura no se encuentran estudios en los que se lleve a cabo esa prueba de genotoxicidad con células de esta especie. El objetivo de este trabajo fue desarrollar el protocolo para obtener una suspensión celular de *A. franciscana* apropiada en calidad y cantidad para detectar posteriormente rompimientos sencillos en las cadenas de ADN mediante el ensayo cometa.

Palabras clave: *Artemia*, suspensión celular, ensayo cometa, biomarcadores.

La electroforesis unicelular o ensayo cometa ha sido usada ampliamente para evaluar el daño al ADN provocado por diferentes agentes físicos, químicos y biológicos debido a que es más sensible que otros métodos que se emplean con el mismo fin y permite detectar rompimientos de cadena sencilla, sitios sensibles al álcali, entrecruzamiento de proteínas y rompimientos sencillos asociados con sitios de reparación por escisión de bases incompleta (Tice *et al.*, 2000). Otras ventajas que presenta son su bajo costo, rapidez, simplicidad para realizarlo y que requiere un número relativamente pequeño de células (<10,000) (Singh *et al.*, 1988; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995).

El protocolo de la electroforesis unicelular se ha aplicado principalmente a modelos *in vivo* e *in vitro* de mamíferos y de algunas especies dulceacuícolas como: algas, peces, anfibios y almejas; y marinas como: peces, mejillones, ostiones, y crustáceos (Cotelle & Férard, 1999; Lee & Kim 2002; Klobucar *et al.*, 2003; Lee & Steinert, 2003; Sotil *et al.*, 2007; Dhawan *et al.*, 2009; Frenzilli & Lyons, 2009; Ternjej *et al.*, 2009; Frías-Espéricueta *et al.*, 2011; Mossesso *et al.*, 2012). Se han empleado en estudios de genotoxicidad ya que se ha reconocido que presentan daños similares a los observados en los cromosomas y ADN de especies superiores en particular mamíferos (por ejemplo, aberraciones cromosómicas, rompimientos de una sola cadena del ADN y mutaciones puntuales; Dixon *et al.*, 2002).

Entre los organismos acuáticos que se han utilizado para evaluar *in vivo* el efecto genotóxico de diferentes agentes, se encuentran los mejillones *Mytilus edulis* (Linee, 1758) y *M. arenaria* (Linee, 1767), expuestos a peróxido de hidrógeno y N-nitrosodimetilamina (Mitchellmore *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1998; Hamoutene *et al.*, 2002; Pruski & Dixon, 2002), y anémonas de la especie *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835) expuestas también a peróxido de hidrógeno, etilmetanosulfonato y benzo(a)pireno (Mitchellmore & Hyatt, 2004). Asimismo se ha trabajado con embriones del cangrejo azul *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) expuestos a 2-metil-1,4-naftoquinona 4-nitroquinonina-N-óxido y con el camarón de pastos *Palaemonetes pugio* (Holthuis, 1949) expuesto a 2-metil-1,4-naftoquinona, cromo y mercurio (Lee *et al.*, 2000; Lee & Kim 2002; Hook & Lee, 2004). Estos estudios demuestran que el ensayo cometa es un buen biomarcador para determinar el efecto genotóxico ocasionado por diferentes agentes.

En virtud de que muchas de las especies de moluscos bivalvos, crustáceos, y poliquetos forman parte de la cadena alimenticia humana, resulta importante contar con procedimientos que permitan determinar el efecto de los agentes mutagénicos y carcinogénicos del ambiente sobre estos organismos. Esto debido a que la mayor parte de ellos tienen la capacidad para transformar esos agentes a metabolitos biológicamente activos y de acumular las toxinas en sus células y tejidos en concentraciones superiores a las encontradas en el medio (Dixon *et al.*, 2002).

Las especies del género *Artemia* son parte fundamental de la cadena alimenticia y contribuyen de manera relevante a la alimentación de especies importantes para el consumo humano (Léger & Sorgeloos, 1984; Amat, 1985; Domingues *et al.*, 2001; Anh *et al.*, 2010). Algunas de ellas han sido empleadas como modelos de estudio en diversas áreas como la ecología, fisiología, ecotoxicología, acuicultura y genética (Nunes *et al.*, 2006) debido principalmente a que estos organismos tienen una amplia distribución geográfica, presentan gran adaptabilidad a condiciones extremas de ambientes hipersalinos como lagos salados, lagunas costeras y salinas producidas por el hombre (Van Stappen, 1996).

Considerando la importancia de *Artemia* como modelo experimental y de la sensibilidad de la electroforesis unicelular alcalina para detectar daño en el ADN, el objetivo de este trabajo fue establecer el protocolo para obtener la suspensión celular de *A. franciscana* (Kellog, 1906) para posteriormente detectar rompimientos sencillos en las cadenas de ADN mediante el ensayo cometa.

Los metanauplios de *A. franciscana* se obtuvieron de quistes comerciales (Salt Creek, Salt Lake City, USA) que fueron hidratados con agua dulce por 30 minutos. Posteriormente se mantuvieron en una solución de cloro líquido comercial (Clorarex) al 25%, por 4 minutos agitando suavemente; después fueron enjuagados con agua corriente a través de un tamiz con luz de malla de 50 µm hasta que el olor a cloro desapareciera. En seguida los quistes se transfirieron a un embudo con 500 mL de agua marina artificial (Coral Life, Carson Calif.) con una salinidad de 35 ± 1 g/L, aplican-

do aireación continua y luz blanca emitida por una lámpara de 40 watts. La eclosión máxima de los metanauplios se obtuvo a las 24 horas. Para obtener la suspensión celular se usaron alrededor de 500 metanauplios de 48 horas de vida, y se maceraron suavemente en 4 mL de agua marina en un mortero de cerámica. El macerado se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos y se retiró el sobrenadante. La técnica del ensayo cometa fue realizada de acuerdo con el protocolo establecido por Singh *et al.* (1988). Para la preparación de los geles se colocaron 110 µL de agarosa de punto de fusión normal 0.75 % (Sigma), a 37 °C, sobre portaobjetos de superficie totalmente esmerilada (Fisher), limpios y desengrasados con el detergente Bactium alcalino (Bioclín Cosmética, México). Se cubrieron con cubreobjetos de 24 X 50 mm para extender las muestras de manera uniforme. Una vez que se solidificó la capa de agarosa se mezclaron 50 µL de suspensión celular con 150 µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 0.70 % y se distribuyó en dos de los portaobjetos previamente preparados. Se colocó un cubreobjetos y se dejó solidificar sobre bloques de hielo.

Posteriormente se retiró el cubreobjetos y a cada preparación se le añadió una tercera capa de 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión que se cubrió con un cubreobjetos que se retiró cuando el gel solidificó. Después, los geles se incubaron en oscuridad durante al menos una hora a 4 °C, en una solución de lisis preparada con 0.5 mL de tritón-X100 (J.T. Baker), 5 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) (J.T. Baker) y 44.5 mL de solución madre de lisis, la cual se preparó previamente de la siguiente manera: NaCl 2.5 M (J.T. Baker), ácido etilendiaminotetracético (Na₂-EDTA, J.T. Baker) 100 µM, tris 10 µM (Hycl de México), tritón-X100 1 % y DMSO 10 % ajustando el pH a 10.

Luego las muestras se colocaron en una cámara de electroforesis horizontal (BioRad) y se cubrieron con amortiguador que contenía NaOH 10 N (J.T. Baker) y Na₂-EDTA 200 mM (J.T. Baker), pH 10; se dejaron reposar por 20 minutos para permitir el desenrollamiento de la cadena de ADN y en seguida se aplicó una corriente de 25 V, 300 mA durante 20 minutos. La cámara de electroforesis se mantuvo en un baño de hielo para conservar la temperatura entre 15 y 17 °C. Las preparaciones se sacaron de la cámara de electroforesis y se lavaron tres veces con amortiguador de neutralización Tris 0.4 M, pH 7.5, en intervalos de cinco minutos para neutralizar el álcali. Cada una de las muestras se tiñó con 50 µL de bromuro de etidio 20 µg/mL (Sigma), se cubrió con un cubreobjetos y todas se almacenaron en una cámara húmeda a 4 °C en oscuridad al menos por 24 horas. Las preparaciones se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus) equipado con un filtro de excitación de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se revisaron en promedio 200 células en cada una de las tres repeticiones que se realizaron; la longitud de la migración del ADN dañado (cauda del cometa) se midió empleando el software VIDS y los datos se analizaron mediante la prueba de Rangos Múltiples de Tukey. Los datos de longitud de la migración del ADN se agruparon en intervalos de 20 µm cada uno.

Tabla 1. Datos de migración del ADN de células en suspensión de metanauplios de *A. franciscana* obtenidos en tres réplicas y distribución en intervalos de daño.

Repetición	Migración promedio $\pm$ EE	Proporción de células encontradas en los diferentes intervalos de migración del ADN (μ m)				
		1-20	21-40	41-60	61-80	81-100
1	37.16 $\pm$ 1.85	26.8	25.77	39.18	8.25	0
2	33.50 $\pm$ 1.12	29.27	38.21	27.24	4.07	1.63
3	37.27 $\pm$ 1.34	35.47	52.08	32.08	10.57	4.15
PROMEDIO	35.98 $\pm$ 1.44	30.51	38.69	32.83	7.63	1.93

EE: Error Estándar

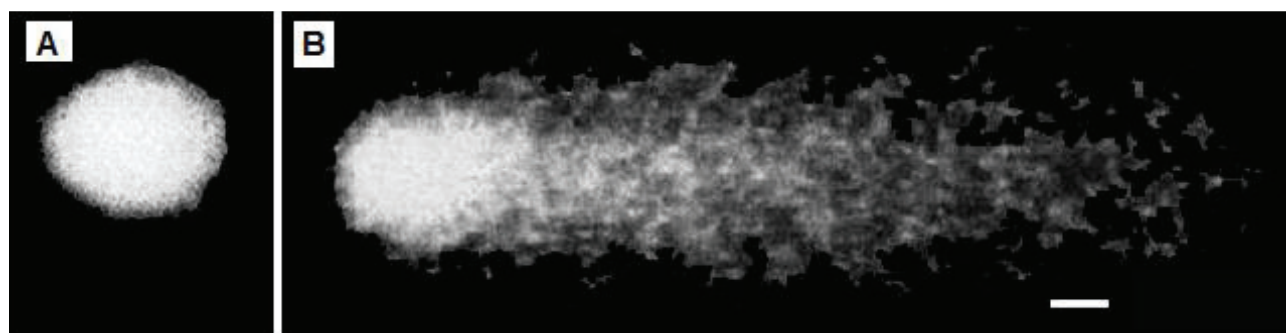


Figura 1. Apariencia de las células de metanauplios de *Artemia franciscana* en el ensayo cometa. A) Célula sin daño. B) Célula con daño. Escala 10 μ m.

En la Tabla 1 se observa que los resultados de cada repetición fueron similares entre sí (Tukey, $p > 0.05$), y que el ADN de todas las células mostró desplazamiento por lo que prácticamente el 70 % de los valores se ubicaron en los dos intervalos de menor daño. Esto puede atribuirse a factores de estrés químicos y físicos como la concentración de nauplios en un volumen pequeño de agua marina para poder ser macerados ligeramente y obtener la suspensión celular. Además, la desestabilización de las enzimas lisosomales afectan al ADN como parte de una respuesta general de estrés (Dixon *et al.*, 2002).

El ambiente marino constituye un depósito de muchos compuestos químicos naturales y antropogénicos potencialmente tóxicos, por lo que resulta sumamente necesario monitorear sus efectos sobre el ambiente y las especies que en él habitan. Varias especies de bivalvos sésiles como *Mytilus edulis* (Linne, 1758) y *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) han sido empleadas en estudios de este tipo y se ha encontrado que tienen respuestas similares al humano en lo que se refiere al desarrollo de tumores cancerosos debido a la exposición a un mismo agente (Mitchelmore *et al.*, 1998; González-Benítez, 2004), por lo que se consideran especies centinelas para este efecto neoplásico (Dixon *et al.*, 2002).

No menos importantes son los invertebrados de vida libre como las especies del género *Artemia*, en particular *A. franciscana*. Esta especie se encuentra en los primeros eslabones de

la cadena alimenticia por lo que afecta a los demás eslabones de la misma (Nunes *et al.*, 2006) y además constituyen un modelo experimental en el campo de la ecotoxicología. El procedimiento presentado en este trabajo permite obtener una suspensión celular de *A. franciscana* apropiada en cantidad y calidad, por lo que amplía los parámetros de toxicidad que pueden registrarse con este modelo al contar con un biomarcador adicional tan sensible como lo es el daño al ADN evaluado a través del ensayo cometa.

El procedimiento desarrollado para obtener la suspensión celular fue apropiado pues en las preparaciones se observaron células con buena calidad y en cantidad suficiente para el análisis de genotoxicidad. Entre los factores que permitieron lograrlo se encuentra el que no se requirió disgregar el tejido con algún tratamiento enzimático que pudiera afectar la integridad del ADN y que la velocidad de centrifugación fue moderada (Figura 1). Se recomienda emplear aproximadamente 500 metanauplios de 48 horas de eclosionados para que todos los organismos se encuentren en la misma etapa de desarrollo y su sensibilidad a los agentes bajo prueba no varíe de manera significativa.

REFERENCIAS

- AMAT, F. 1985. Biología de *Artemia*. Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. España, 60 p.

- AHN, N. T. N., V. N. UT, M. WILLE, N. V. HOA & P. SORGELOOS. 2010. Effect of different forms of *Artemia* biomass as a food source on survival, milting and growth rate of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Aquaculture Nutrition* 17: e549-e558.
- COTELLE, S. & J. F. FÉRARD. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 246-255.
- DHAWAN, A., M. BAJPAJEE, A. K. PANDEY & D. PARMAR. Protocol for the single cell gel electrophoresis / comet assay for rapid genotoxicity assessment TRC: THE SCGE/ COMET ASSAY PROTOCOL. *Developmental Toxicology Division Industrial Toxicology Research Centre*. 10 p.
- DIXON, D. R., A. M. PRUSKI, R. J. L. DIXON & N. A. JHA. 2002. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17 (6): 495-507.
- DOMINGUES, P. M., TURK. P. E, ANDRADE. J. P. & P. G. LEE. 2001. Effects of enriched *Artemia* nauplii on production, survival and growth of the mysid shrimp *Mysidopsis almyra* Bowman 1964 (Crustacea: Mysidacea). *Aquaculture Research* 32: 599-603.
- FAIRBAIRN, D. W., P. L. OLIVE & K. L. O'NEILL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339 (1): 37-59.
- Frenzilli, G., M. Nigro & B. P. Lyons. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681 (1): 80-92.
- FRIAS-ESPERICUETA, M. G., M. AGUILAR-JUÁREZ, D. VOLTOLINA & C. PANIAGUA-CHÁVEZ. 2011. Effect of Cu on Hemocytic DNA of the White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Assessed by the Comet Assay. *Journal of the World Aquaculture Society* 42 (4): 586-590.
- GONZÁLEZ-BENÍTEZ, J. F. 2004. Genotoxicidad por exposición al cadmio (Cd^{2+}) en células del epitelio branquial del ostión *Crassostrea virginica* de la Laguna de Mandinga, Veracruz. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Tesina para obtener el grado de Licenciatura en Hidrobiología. 37p.
- HAMOUTENE, D., J. F. PAYNEA, A. RAHIMTULAB & K. LEE. 2002. Use of the Comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cells of mussels and clams exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 54 (3-5): 471-474.
- HOOKE, S. E. & R. F. LEE. 2004. Genotoxicant induced DNA damage and repair in early and late developmental stages of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* embryo as measured by the comet assay. *Aquatic Toxicology* 66 (1): 1-14.
- KLOBUČAR GÖRAN, I. V., M. PAVLICA, R. ERBEN & D. PAPEŠ. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* 64 (1): 15-23.
- LEE, R. & G. B. KIM. 2002. Comet assay to assess DNA damage and repair in grass shrimp embryos exposed to phototoxicants. *Marine Environmental Research* 54 (3-5): 465-469.
- LEE, R., G. B. KIM, K. A. MARUYA, S. A. STEINERT & Y. OSHIMA. 2000. DNA strand breaks (comet assay) and embryo development effects in grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryos after exposure to genotoxicants. *Marine Environmental Research* 50 (1-5): 553-557.
- LEE, R. F. & S. STEINERT. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/ comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research* 544 (1): 43-64.
- LÉGER, P. & O. SORGELOOS. 1984. International study on *Artemia*. XXIX. Nutritional evaluation of *Artemia* nauplii from different geographical origin for the marine crustacean *Mysidopsis bahia*. *Marine Ecology Progress Series* 15: 307-309.
- McKELVEY-MARTIN, V. J., M. H. L. GREEN, P. SCHMEZER, B. L. POOL-ZOBEL, M. P. DE MÊO & A. COLLINS. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research* 288 (1): 47-63.
- MITCHELMORE, C. L. & S. HYATT. 2004. Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Marine Environmental Research* 58 (2-5): 707-711.
- MITCHELMORE, C. L., C. BIRMEIN, D. R. LIVINGSTONE & K. CHIPMAN. 1998. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "comet" assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *Environmental Research Safety* 41 (1): 51-58.
- MOSESSO, P., D. ANGELETTI, G. PEPE, C. PRETTI, G. NASCETTI, R. BELLACIMA, R. CIMMARUTA & A. N. JHA. 2012. The use of cyprinodont fish, *Aphanius fasciatus*, as a sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in the coastal lagoon ecosystem. *Mutation Research* 742 (1-2): 31-36.
- NUNES, B. S., F. D. CARVALHO, L. M. GUILHERMINO & G. VAN STAPPEN. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144 (2): 452-462.
- PRUSKI, A. M. & D. R. DIXON. 2002. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquatic Toxicology* 57 (3): 127-137.
- SINGH, N. P., M. T. MCCOY, R. R. TICE & E. L. SCHNEIDER. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175 (1): 184-191.
- SOTIL, G., R. ALVIS, J. C. FRANCIA & B. SHIGA. 2007. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Revista Peruana Biología* 13 (3): 249-253.
- TERNEJEJ I., STANKOVIĆ I., MIHALJEVIĆ Z., FURÄC L., ŽELJEŽIĆ D., KOPJAR N. 2009. Alkaline comet assay as a potential tool in the assessment of DNA Integrity in Freshwater zooplankton affected by pollutants from water treatment facility. *Air water air soil pollution* 204: 299-314.
- TICE, R., E. AGURELL, D. ANDERSON, B. BURLISON, A. HARTMAN, 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.
- VAN STAPPEN, G. 1996. Introduction, biology and ecology of Artemia. In: Lavens, P. & P. Sorgeloos (Eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper* No. 361. Rome, FAO. 295p.
- WILSON, J. T., P. L. PASCOE, J. M. PARRY & D. R. DIXON. 1998. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutation Research* 399 (1): 87-95.
- Recibido:* 12 de enero de 2012.
- Aceptado:* 6 de noviembre de 2012.