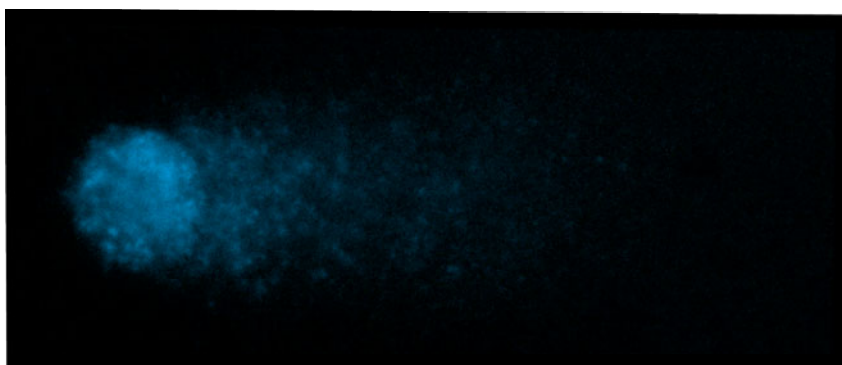




**AVALUACIÓ DE LA GENOTOXICITAT EN EL MEDI TERRESTRE :  
UTILITZACIÓ DE L'ELECTROFRESI DE CÈL·LULES INDIVIDUALS EN  
GELS D'AGAROSA (COMET TEST, O SCGE)**



**Eulàlia Delgado Sureda**

Departament de Biologia Animal (Vertebrats)  
Facultat de Biologia  
Universitat de Barcelona

Tesi Doctoral



**Tesi Doctoral**

**Facultat de Biologia**

Programa de Doctorat: Biologia Animal I: Zoologia. Bienni 1997/1999

---

**AVALUACIÓ DE LA GENOTOXICITAT EN EL MEDI TERRESTRE : UTILITZACIÓ  
DE L'ELECTROFORESI DE CÈL·LULES INDIVIDUALS EN GELS D'AGAROSA  
(COMET TEST, O SCGE)**

---

Memòria presentada per Eulàlia Delgado Sureda per optar al títol de Doctora en Biologia, al Departament de Biologia Animal (Vertebrats), Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Jacint Nadal Puigdefàbregas.

Eulàlia Delgado Sureda

Barcelona, Octubre del 2001

V i P  
El director de la tesi doctoral  
Dr. Jacint Nadal Puigdefàbregas  
Catedràtic  
Facultat de Biologia, UB

... a la meva família, amics, i companys, i molt en especial al meu germà petit, amb tot l'afecte del món

Radostná mysl je jako jaro.  
Dává rozkvést lidské povaze.

J.Paul

La ment alegre és com una primavera.  
Permet florir la naturalesa humana.

## Índex:

\*Introducció ..... 1

### \*Capítols:

#### Capítol 1 :

1. Estudi de la contaminació de tipus genotòxic en l'abocador de Garraf: ..... 11

1.A. Introducció ..... 11

1.1. En mostres de limfòcits de ratolí de bosc ..... 15

1.1.a.Introducció ..... 15

1.1.b.Material i Mètodes..... 18

1.1.c. Resultats ..... 33

1.1.d. Discussió ..... 38

1.1.e. Conclusions ..... 43

Annex 1.1.1 ..... 44

1.2. En mostres de celomòcits de lumbrícid ..... 46

1.2.a.Introducció ..... 46

1.2.b.Material i Mètodes..... 50

1.2.c. Resultats ..... 61

1.2.d. Discussió ..... 63

1.2.e. Conclusions ..... 71

Annexos: ..... 72

Annex 1.2.1 ..... 72

Annex 1.2.2 ..... 75

Annex 1.2.3 ..... 77

1.B. Conclusions del capítol ..... 80

#### Capítol 2 :

2. Estudi de la possible contaminació de tipus genotòxic en mostres de terra de Doñana ... 81

2.A. Introducció ..... 81

2.B. Material i Mètodes ..... 86

2.C. Resultats ..... 91

2.D. Discussió ..... 93

2.E. Conclusions ..... 100

---

**Capítol 3 :**

<b>3. Avaluació de la tècnica</b> .....	101
<b>3.A. Introducció</b> .....	101
<b>3.1. Divisió cel·lular</b> .....	104
<b>3.1.A. Introducció</b> .....	104
<b>3.1.1. Sincronització de cèl·lules FAO</b> .....	106
3.1.1.a. Introducció.....	106
3.1.1.b. Material i Mètodes.....	106
3.1.1.c. Resultats i Discussió.....	111
3.1.1.d. Conclusions.....	119
<b>3.1.2. Intestí Prim- Intestí Gruixut</b> .....	120
3.1.2.a. Introducció.....	120
3.1.2.b. Material i Mètodes.....	120
3.1.2.c. Resultats.....	124
3.1.2.d. Discussió.....	124
3.1.2.e. Conclusions.....	127
<b>3.1.3. Fibroblasts</b> .....	128
3.1.3.a. Introducció.....	128
3.1.3.1. Primer Experiment.....	128
3.1.3.1.a. Introducció.....	128
3.1.3.1.b. Material i Mètodes.....	129
3.1.3.1.c. Resultats.....	129
3.1.3.1.d. Discussió.....	130
3.1.3.1.e. Conclusions.....	132
3.1.3.1. Segon Experiment.....	132
3.1.3.2.a. Introducció.....	132
3.1.3.2.b. Material i Mètodes.....	132
3.1.3.2.c. Resultats.....	133
3.1.3.2.d. Discussió.....	134
3.1.3.2.e. Conclusions.....	136
3.1.3.b. Discussió dels dos experiments.....	136
3.1.3.c. Conclusions.....	137
<b>3.1.4. Lumbrícid</b> .....	137
3.1.4.a. Introducció.....	137
3.1.4.1. Primer Experiment.....	138
3.1.4.1.a. Introducció.....	138
3.1.4.1.b. Material i Mètodes.....	139
3.1.4.1.c. Resultats.....	139
3.1.4.1.d. Discussió.....	140
3.1.4.1.e. Conclusions.....	141
3.1.4.2. Segon Experiment.....	141
3.1.4.2.a. Introducció.....	141

---

3.1.4.2.b. Material i Mètodes .....	141
3.1.4.2.c. Resultats i Discussió.....	142
3.1.4.2.d. Discussió general i Comentaris.....	144
3.1.4.2.e. Conclusions .....	149
3.1.4.2.b. Conclusions generals per als dos experiments.....	149
<b>3.1.B. Conclusions generals de tot l'apartat de divisió cel·lular.....</b>	<b>150</b>
<b>3.2. Apoptosi- Necrosi-Comet test.....</b>	<b>151</b>
3.2.A. Introducció .....	151
3.2.B. Material i Mètodes .....	157
3.2.C. Resultats i Discussió .....	162
3.2.D. Conclusions.....	194
<b>3.3. Fragments de DNA-loops.....</b>	<b>195</b>
3.3.A. Introducció .....	195
3.3.B. Discussió .....	196
<b>3.B. Conclusions generals del capítol.....</b>	<b>197</b>
<b>Capítol 4 :</b>	
<b>4. Altres aplicacions de la tècnica .....</b>	<b>198</b>
<b>4.A. Introducció</b>	
<b>4.1 Mesura de la correlació dosi-resposta positiva amb el comet test .....</b>	<b>200</b>
4.1.a. Introducció.....	200
4.1.b. Material i Mètodes.....	201
4.1.c. Resultats i Discussió .....	202
4.1.d. Conclusions .....	204
<b>4.2. Estudis <i>in vitro</i> de reparació del dany al DNA. Exposició a SO .....</b>	<b>205</b>
4.2.a. Introducció .....	205
4.2.b. Material i Mètodes.....	206
4.2.c. Resultats i Discussió .....	207
4.2.d. Conclusions .....	209
<b>4.3. Tractament amb òxid d'estirè (SO) en ratolins NMRI.....</b>	<b>210</b>
4.3.a. Introducció .....	210
4.3.b. Material i Mètodes.....	210
4.3.c. Resultats i Discussió .....	212
4.3.d. Conclusions .....	218
<b>4.4. Algunes consideracions de la tècnica .....</b>	<b>218</b>

---

*Índex*

---

<b>*Conclusions</b> .....	225
<b>*Bibliografia</b> .....	227
<b>*Agraïments</b> .....	243

---

**AVALUACIÓ DE LA GENOTOXICITAT EN EL MEDI TERRESTRE : UTILITZACIÓ DE L'ELECTROFORESI DE CÈL·LULES INDIVIDUALS EN GELS D'AGAROSA (COMET TEST, O SCGE)**

---

**\* Introducció :**

L'estudi de la contaminació en el medi ambient és, sobretot des dels últims anys, i cada cop més, una necessitat. Cal conèixer l'estat del nostre entorn, i així poder prendre mesures per intentar eliminar i prevenir la contaminació que pot posar-lo en perill; la seva preservació és imprescindible per a la vida de tots els éssers que l'integren. La destrucció d'aquest, pot afectar la salut del individu i la supervivència de les espècies que hi habiten i per tant, l'equilibri de tot l'ecosistema.

L'avaluació de la contaminació del medi ambient es pot realitzar a molts nivells, i de moltes diverses maneres. És un estudi molt ampli que requereix una visió global i individual al mateix temps. La valoració a través d'espècies animals, en aquest cas de varis grups de vertebrats i alguns invertebrats, és l'objectiu d'estudi de molts dels treballs del nostre grup de recerca (Llacuna et al. 1993-95-96; Górriz et al.1994-96; Salgado et al. 1996-97; Brotons et al. 1998; Borràs et al. 1998a,b). Poder veure com afecta un determinat tipus de contaminació al medi, a unes determinades espècies animals, ens pot servir també, mitjançant l'extrapolació dels resultats, per donar una idea de com pot arribar a afectar-nos a l'espècie humana. Però, aquest tipus d'estudi pot ser molt complicat, degut a la complexitat que comporta, no sols fer un anàlisi *in situ* amb la gran quantitat de paràmetres que influeixen a la vegada (ambient, climatologia, tipus d'espècie, relacions inter-específiques, intra-específiques, hàbitat, comportament alimentari, etc...), sinó també la complexitat de la contaminació (distribució, disponibilitat, extensió, efectes a diversos nivells, etc...), i per la seva interpretació, en que cal la consideració del "tot" a la vegada. Encara que ens referim a un tipus concret de contaminació, (per exemple la possible contaminació a les zones del voltant d'un abocador com serà un dels treballs aquí presentats), la contaminació pot donar-se a molts diferents nivells, i pot afectar de moltes maneres a les diverses espècies, i en la cadena tròfica pot arribar a una fase d'acumulació i afectació variable en els diversos esglaons. És per això que aquest estudi tan complex no es pot realitzar considerant tots els paràmetres i tots els factors a la vegada, i s'ha d'anar desglossant en estudis més petits i concrets, però al mateix temps s'ha de tenir en compte sempre el nombre màxim de factors possibles i la interpretació global, és a dir com un conjunt.

---



Així l'Ecotoxicologia, és una temàtica de primer ordre actualment, i de molta rellevància en els àmbits mèdic, econòmic i social; degut a la presència creixent de xenobiòtics en el medi ambient. L'expressió "potencial tòxic", caldria entendre-la en sentit ampli, comprenent tant els efectes immediats letals o sub-letals com aquells a més llarg termini que es poden derivar de l'acció teratògena, carcinògena o mutàgena, i també les alteracions de comportament. L'estudi de la genotoxicitat en seria una part molt important, no sols pel fet de referir-se a les mutacions de les cèl·lules germinals, amb conseqüències evidents sobre el futur de les poblacions, sinó també per referir-se a les mutacions en cèl·lules somàtiques, precursors de l'aparició de tumors.

La genotoxicitat, ha estat objecte d'una atenció extraordinària, especialment durant la dècada dels vuitanta (no sent menys important avui dia), degut a l'interès prioritari de la indústria farmacèutica per trobar un substitut a les proves de carcinogènesi tant costoses en termes econòmics i temporals. Aquest interès va ser la causa de que es desenvolupessin més d'un centenar de tècniques per a l'avaluació de l'efecte mutagènic (hi ha una correlació molt elevada - que es creia que era del 90%, ara s'ha vist que es una mica menor - entre la capacitat mutàgena d'una substància i la possibilitat d'acabar produint un tumor. Totes les substàncies mutàgenes són carcinògenes, però no totes les substàncies cancerígenes són mutagèniques, així, alguns càncers no són produïts via genotòxica, Sasaki et al.,1997b), que permetia avaluar els efectes d'aquests tipus d'agents d'una manera més ràpida, i actuar en preventivament. Una de les coses que va quedar clarament establerta durant el període comentat, va ser la impossibilitat d'abastar tots els eventuals mecanismes d'acció amb una sola tècnica d'anàlisi, i per tant, l'obligatorietat de l'ús de bateries de tests.

Així, el dany al DNA s'ha acceptat generalment que demostra una forta correlació amb esdeveniments mutagènics i carcinogènics, (Fairbairn et al.,1995). L'estudi del risc genètic en poblacions humanes exposades a mutàgens/carcinògens potencials és un primer sistema d'alerta a malalties genètiques o càncer, i permet la identificació de factors de risc a temps quan encara es poden dur a terme mesures de control, (Kassie et al.2000). D'aquí el nostre interès també, en aquest tipus d'estudis, centrat però, sobre el medi ambient.

L'impacte ambiental que pot causar un abocador, sobretot un de tan gran com és l'abocador de Garraf, (que serà justament l'àrea d'estudi en un dels treballs presentats en aquesta tesi), seria no només visual, sinó també, tot i les mesures preses per evitar-ho, una font de contaminació important. Entre d'altres, la quantitat d'olors i gasos que es desprenen, la possibilitat de vessaments de les basses de lixiviats quan hi ha una pluja abundant, i d'una filtració d'aquests a la capa freàtica deguda a una insuficient impermeabilització del sòl, etc.... Tot això implicaria un risc de contaminació a totes les àrees del voltant i per tant a totes les espècies animals i vegetals que hi viuen, com també comportaria una contaminació potencial (malgrat el control de tot l'emplaçament), un cop es clausurés. (Alguns exemples d'estudis variats de la contaminació dels abocadors o els seus efectes i recuperació són les publicacions de Navarro et al.1991; Villanueva et al.1991; Judd & Mason,1995; Johnson et al.1996; Cabrera & Rodríguez, 1999).

---

Si ens centrem en la l'efecte que pot causar l'abocador en les espècies que viuen al seu voltant, degut a una contaminació per la presència de xenobiòtics en el medi ambient, veuríem un cop més que els pot afectar de diverses maneres, i resulta un estudi realment complex. El nostre estudi es basaria en un cas molt concret de contaminació. En un abocador pot haver molts tipus de contaminants, que poden ser tòxics, i fins i tot genotòxics. El nostre treball s'implicaria en la detecció de la possible contaminació genotòxica, que indicaria uns efectes sobre el material genètic, sobre els àcids nucleics provocat per aquelles substàncies que tenen afinitat pel DNA i li causarien algun tipus d'alteració. Com podrien ser, d'entre els molts tipus que hi ha, les que afecten a nivell dels cromosomes o a nivell de nucleòtids. Hi ha mutacions de tipus *frameshift* (causades per delecions, addicions, o substitucions de bases), que poden provocar que la lectura variï donant proteïnes diferents i/o no funcionals; pot haver formació d'enllaços covalents amb segons quines substàncies formant *adducts* amb el DNA; com també es poden donar trencaments de la cadena de DNA produïts directament pel tòxic, etc... Llavors ens trobem un cop més que l'estudi d'aquest tipus de contaminació pot ser divers i complicat, així doncs, es va centrar l'atenció en un determinat cas, en la detecció de mutacions de tipus clastogen (que avalua els trencaments en el DNA) amb la utilització d'una tècnica innovadora i recent en la seva aplicació a aquest tipus d'estudi mediambiental, el *Comet Assay*, (o "Comet Test" o assaig d'electroforesi de cèl·lules individuals en gels d'agarosa; "Single cell gel electrophoresis assay", SCGE), i on s'ha volgut veure la seva possible utilitat per a la realització d'aquesta mena de treballs. Hi ha, però, mutacions que es donen de manera natural, espontània en els éssers vius; la replicació del DNA i la reparació no són processos perfectes, així es parteix d'un dany basal degut a factors endògens; malgrat això, com ja he comentat, hi ha en el medi ambient tot de possibles substàncies químiques (anomenades xenobiòtics quan són alienes als éssers vius) o factors físics, que poden produir aquests tipus de dany al DNA, i és aquest, el que volem avaluar.

Aquesta tècnica, que recentment ha començat a perfilar-se com a una alternativa plena de possibilitats en aquest tipus d'estudis de genotoxicitat, consisteix en sotmetre una suspensió cel·lular de puresa i concentració adequades, procedents d'animals exposats al tòxic, englobada en un gel d'agarosa aplicat sobre un portaobjectes, a una lisi alcalina, un tractament per desenrotllar l'ADN i a una migració electroforètica de curta durada. El material genètic no danyat migrarà agrupat en forma esfèrica; en canvi en el cas d'haver-se produït fragmentació del mateix, els possibles fragments més petits, o els *loops* que es formarien a partir dels trencaments del DNA, migraran una distància superior, produint una imatge similar a la cua d'un cometa, d'aquí al nom per similitud, de *Comet Test*, el test del cometa. La classificació d'aquestes figures segons un escala semi-quantitativa prèviament establerta és una forma senzilla de quantificació que es correlaciona amb el grau de genotoxicitat del compost. Es poden utilitzar també, sistemes de quantificació més sofisticats, que requereixen l'anàlisi mitjançant un programa informàtic adequat de les imatges digitalitzades. Els avantatges d'aquesta tècnica són evidents: per una banda, la necessitat d'un nombre de cèl·lules molt petit per mostra (amb un nombre d'entre 1000 a 500.000 cèl·lules per portaobjectes és suficient, Singh et al.1988; Rojas et al.1999; o inclús menys si mirem els estudis realitzats en cèl·lules embrionàries on utilitzen de 5000 a 15000 cèl·lules tan sols, Tebbs et al. 1999), la sensibilitat per a detectar nivells molt baixos de dany al DNA, la possibilitat de dur a terme estudis amb unes quantitats petites de substància, la flexibilitat, baixos costos, simple i ràpida aplicació de la tècnica (en poques hores o dies es tenen els resultats; Tice et al.2000), la possibilitat d'utilització en qualsevol tipus cel·lular, permetent d'aquesta manera expandir el camp de l'experimentació (si ho comparem amb altres tècniques

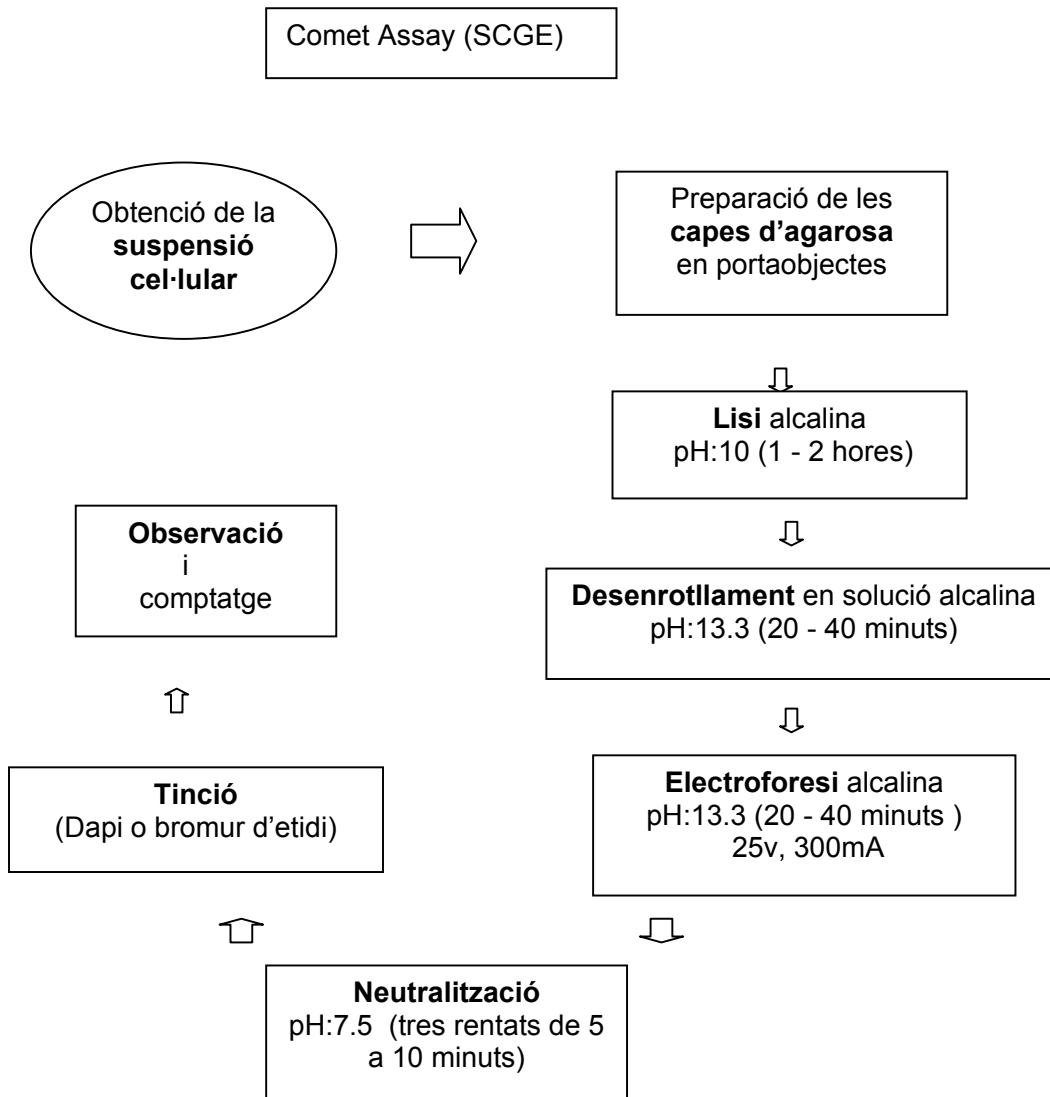
més acotades pel tipus cel·lular) i, si s'escau, afinar en gran manera en la identificació de les cèl·lules diana del tòxic estudiat; permet una diversitat cada cop més àmplia d'aplicacions; d'altra banda, s'obvien en gran mesura alguns dels inconvenients de varis test usats en aquests tipus d'estudis de genotoxicitat, al mateix temps que es guanya en sensibilitat

El comet test, des de que Östling & Johanson al 1984 van desenvolupar-ne els inicis de la metodologia que mesura danys al DNA utilitzant una electroforesis en gels d'agarosa per a cèl·lules individuals, i Singh i col·laboradors (1988) va establir-ne les condicions alcalines, incrementant la seva sensibilitat per a detectar trencaments de cadena simple (SSB; potser no són les lesions més interessants, ja que es poden reparar de manera molt ràpida i no es considera com a una significativa mutació letal o mutàgena; Collins et al.1997a), de cadena doble (DSB), i llocs alcalino-làbils (molts agents genotòxics no causen trencaments de cadena de manera directe, sinó que poden causar altres tipus d'alteracions, com danys a les bases del DNA: pot haver saturacions als anells que poden causar la desestabilització dels ponts i de l'estructura de la hèlix, formació de residus de desoxiriboses sense bases, danys causats pels radicals OH, etc...; totes aquestes lesions constitueixen els llocs alcalino-làbils, degut a que es poden convertir en trencaments sota condicions alcalines; Friedberg et al.1995); des de llavors fins ara, ha sigut utilitzat cada cop més, com a un mètode per a detectar o valorar substàncies genotòxiques (Rojas et al. 1999; Tice et al.2000), i la tècnica ha anat variant per a augmentar els àmbits de l'ús i les seves aplicacions en aquests últims anys. Sent ara un assaig molt utilitzat per tots els avantatges abans comentats. Essent aplicat en estudis tant *in vivo* com *in vitro*, sobre mostres de molts tipus de teixits de diversos animals i plantes, i molts diferents tipus de cultius cel·lulars. Permet avaluar la genotoxicitat de moltes substàncies químiques (ex: Ribas et al. 1995; Sasaki et al. 1997a,b-1999-2000; Tsuda et al.2000; Frenzilli et al.2000), i de metalls (Van Goethem et al.1997). És utilitzat en estudis clínics, *human biomonitoring*, (Olive et al.1999; Kassie et al.2000, entre molts altres); en *environmental monitoring* (review de Mitchelmore et al.1998); en estudis de reparació del DNA (Visvardis et al. 1997; Wojewódzka et al.1997;Bock et a.1998; Myllyperkiö et al.2000,entre d'altres). S'aconsegueix detectar amb les diverses variacions de la tècnica, a més dels trencaments de cadena doble i senzilla, i els llocs d'escissió en la reparació, DNA-crosslinks (Pfuhrer & Wolf,1996; amb una petita modificació del comet Merk & Speit,1999; Merk et al.,2000, Tice et al.2000;etc...), i llocs alcalino-làbils, en els que s'ha aconseguit detectar mutacions específiques amb la utilització d'enzims com l'Endonucleasa III, Endo III, que detecta pirimidines oxidades i llocs apurínics i apirimidínics (AP); la formamidopirina glicosilasa, FPG, que detecta 8-OH guanines i altres purines danyades (Collins, 2000); i altres enzims que detecten mutacions voluminoses com UVDE (*UV DNA damage endonuclease*, detecta: 6-4 fotoproductes, dímers de pirimidina) i UDG (*uracil glycosylase*; detecta incorporacions errònies d'uracil) ([1]). Així doncs pot detectar amb la utilització d'aquests enzims, oxidacions concretes de bases, *adducts* i llocs apurínics que són alcalino-làbils, i es convertirien probablement en trencaments en condicions alcalines durant l'electroforesi; d'aquesta manera fa augmentar la sensibilitat de la tècnica. La utilització del comet test pot derivar també cap a estudis de reparació cel·lular del DNA (ja començats per Singh et al.1988), però que no és fins ara recentment que reprèn un interès més elevat, ja que aquesta tècnica detectaria no sols els trencaments de cadena causats directament per la substància tòxica sinó també els trencaments causats en els processos de reparació de les lesions provocades per aquestes substàncies. També hi ha estudis en relació a apoptosi i necrosi amb l'ús d'aquesta tècnica. (Les seves aplicacions es recullen en varis reviews, el més recent seria Tice et al.2000).

Aquesta major versabilitat del mètode, respecte a altres tests de genotoxicitat, permet aplicacions de gran interès en ecotoxicologia, com ara la proposada per Hooghe et al.(1995); Verschaeve & Gilles (1995) i més tard Šalagovič et al.(1996). Aquests autors van posar de manifest la possibilitat de la utilització de lumbrícidis com a prospectors extraordinàriament eficaços del medi edàfic, mantenint-los per un període de 48 hores en mostres del sòl a estudiar i aplicant a continuació el Comet Test a una suspensió de celomòcits, obtinguda per un mètode que permet la recuperació de l'animal (Eyambe et al.1991), aplicació que també ens ocupa en una part d'aquesta tesi. Com també hi ha altres estudis de contaminació en medi terrestre en varis tipus de mamífers, sobretot rosegadors, tot i que aquests estudis són més de toxicologia de laboratori en ratolins, rates i hámsters xinesos, que no d'ecotoxicologia, dels que encara n'hi ha pocs. Un exemple en animals salvatges, són els estudis de DaSilva et al.(2000a,b,c) en *Ctenomys torquatus*. També hi ha ja treballs en plantes (com *Vicia fava*, *Allium cepa*, *Nicotiana tabacum*, etc...), i en contaminació d'aigües, utilitzant mostres de peixos (truites, carpes, etc..), poliquets (*Nereis virens*), mol·luscs (*Mytillus edulis*, *Patunopecten yessoensis*, *Crassostrea virginica*, etc...) algues marines unicel·lulars (*Chlamydomonas reinhardtii*, etc..), cap grossos (de *Bufo americanus*, *Rana clamitans*, *Rana pipiens*, etc..), i estudis també del risc genètic dels contaminants en cetacis (Taddel et al.2001). Un recull de varis tipus de contaminació, i resultats en diverses espècies es resumeix al review de Rojas et al.(1999), i Cotelle & Ferard (1999).

---

El comet test però, té l'inconvenient de que al ser una tècnica bastant nova, no ha estat estandarditzada encara, i hi ha variació del protocol en diferents laboratoris. Un resum del protocol que he utilitzat, (pot haver variacions amb altres autors en quant als temps, composició dels reactius, colorants, nombre de comets comptats, etc..., però els passos generals són els mateixos) és:



Durant els diferents experiments de la tesi, ens trobarem variacions en el protocol, per diverses raons. Com ja havia comentat anteriorment, aquesta tècnica és relativament nova, la seva utilització no ha estat encara estandarditzada igualment com el protocol, l'avanç i innovacions en aquest test és molt ràpid ja que el seu ús s'està incrementant enormement en els últims anys. He hagut d'anar afegint canvis en el protocol durant la realització dels meus estudis; no sols perquè

s'ha d'anar modificant per a millorar la tècnica, sinó també perquè cada cop es pot utilitzar en més diferents tipus de teixits i cèl·lules, i per cada una cal alguna variació o adaptació de la tècnica tant en la preparació i obtenció de les mostres, com en el procés. Va variant doncs també per la quantitat de nous usos que es poden donar a la tècnica, que es van descobrint a mesura que s'utilitza més i més. En cada laboratori es fa servir la tècnica adaptada a les seves mostres i necessitats, això fa que trobem petites variacions en el protocol dels diversos laboratoris d'arreu del món. Degut també a que aquesta tècnica és sensible a varis factors, no es pot dur a terme de la mateixa manera en els diferents llocs. Com que una part del meu estudi s'ha realitzat en un altre laboratori, hi ha hagut variacions també en el protocol del test. Variacions que ja aniré comentant en els següents capítols.

Tot i que el primer pas, molt important, i que comporta una gran dedicació de temps, va ser la posada a punt de la tècnica i la preparació de tot el material i equip necessari per dur-la a terme, l'estudi principal es centraria, doncs, en l'avaluació de la possible contaminació de tipus genotòxic causada per l'abocador de Garraf, en el ratolí de bosc (*Apodemus sylvaticus*), i en cucs de terra (*Allolobophora caliginosa*), ambdues espècies autòctones, abundants i d'àmplia distribució. I la comparació d'aquests resultats, pel cas dels ratolins, amb els obtinguts per una tècnica ben establerta en aquest tipus d'estudis com és el Test dels Micronuclis (MNT), ja que el Comet Test, malgrat la seva creixent popularitat i dels avantatges que presenta, no compta encara amb un recolzament experimental tan ampli com el MNT, ni es troba per ara contemplat en les normatives oficials. Com havia comentat anteriorment, pels estudis de contaminació cal aplicar una bateria de test no sols perquè cada tècnica pot mesurar uns tipus concrets de mutacions, sinó també, perquè una tècnica pot ser més sensible que una altra, (depenent també del cas, la substància, etc.). Aquesta és una altra raó per preferir utilitzar dues tècniques de genotoxicitat en el cas dels ratolins.

Durant la realització dels experiments han sortit algunes qüestions metodològiques o a nivell molecular o funcional que podien emmascarar els resultats obtinguts per aquest assaig, com podia ser la interferència de la divisió cel·lular, o el possible fals positiu causat per la observació de les imatges apoptòtiques (temes actualment encara en discussió per diferents investigadors), i que han fet derivar l'estudi cap a la investigació d'alguns d'aquests fets tan importants per l'assentament i acotament de la tècnica. Així mateix s'ha fet altres estudis per a la validació de la tècnica amb la comparació amb altres tècniques ben establertes (com el Test dels Micronuclis) i amb la utilització de substàncies genotòxiques conegudes per a la comprovació de la metodologia i per l'avaluació de la genotoxicitat d'aquestes substàncies amb aquest test. S'han realitzat experiments sobre contaminants com el Benzo(a)pirè, fibres d'asbesto, aflatoxines (estudis no presentats en aquesta tesi) i l'òxid d'estirè a nivell de laboratori, per veure i comparar els resultats de la tècnica a diferents concentracions d'una substància conegudament genotòxica, i la cinètica de reparació, com a una altra aplicació de la utilització del *Comet test*. Tot i que per a la credibilitat de l'ús d'aquesta tècnica en estudis de genotoxicitat n'hi hauria prou ara amb la cerca de la bibliografia actual, ja que des que vam començar aquest estudi fins ara ha augmentat d'una manera espectacular el seu ús, i es pot dir que actualment és molt utilitzada ja en molts laboratoris d'arreu del món, com a una bona tècnica per a la mesura de la genotoxicitat (malgrat algunes discrepàncies en algun cas), a nivell de laboratori, en estudis de contaminació ambiental, estudis de reparació del DNA, etc...Com ja he comentat, encara caldria una revisió de la tècnica i sobretot una estandardització i reconeixement oficial d'aquesta.

D'aquesta manera, el treball presentat en aquesta tesi, s'ha basat - seguint en la línia dels estudis d'ecotoxicologia que duu a terme el nostre grup de recerca, en el que es pretén en part, avaluar la contaminació ambiental a determinades zones en un tipus concret d'exposició contaminant - en la utilització i la valoració de l'ús de la tècnica del *Comet Test* per a la mesura o avaluació en el medi ambient, de la possible contaminació per xenobiòtics, en aquest cas amb efectes genotòxics en els espècimens estudiats, com també la posada en funcionament del test prèviament, l'avaluació dels seus problemes, validació, mesura dels efectes genotòxics de determinades substàncies, i altres aplicacions com estudis de reparació de DNA , etc...

Hipòtesis:

- El *Comet Test* pot ser utilitzat per estudis de detecció de genotoxicitat en el medi ambient, en el cas concret de l'abocador de Garraf, amb la utilització de l'espècie de ratolí de bosc (*Apodemus sylvaticus*)
- El *Comet Test* pot ser utilitzat per estudis de detecció de genotoxicitat en el medi ambient, en el cas concret de l'abocador de Garraf, amb la utilització d'espècies de cucs de terra.
- *Apodemus sylvaticus* seria un bon bioindicador per aquest tipus de contaminació en el medi ambient.
- *Allolobophora caliginosa* és un bon sentinella de la contaminació genotòxica en el medi ambient.
- Hi ha diferències entre les zones d'influència de l'abocador i les zones control, detectant més dany al DNA en les zones més contaminades. Considerant que hi hagi un gradient de contaminació descendent des de les zones més properes, a les més allunyades de l'abocador, trobaríem també la mateixa relació en dany al DNA detectat pel *Comet Assay*.

Aquestes van ser les hipòtesis inicials del treball a respondre. Però a mesura que he anat fent l'estudi, com ja he comentat anteriorment, han sorgit noves branques d'estudi, de les quals van plantejar una sèrie d'hipòtesis que ja aniré anomenant en el corresponent capítol. Algunes de les quals són:

- El comet test, pot ser utilitzat per a mesurar contaminació genotòxica causada per metalls pesants en cucs de terra exposats a terres contaminades pel vessament de la mina d'Aznalcóllar?.
  - La divisió cel·lular, interfereix d'alguna manera en els resultats del comet test, augmentant el nombre de cometes quan hi hagi un nivell de divisió major?.
  - El comet test pot mesurar falsos positius en la interferència causada per les imatges apoptòtiques?. Hi ha unes imatges concretes per les figures apoptòtiques?.
-

Objectius:

- Establir i validar la utilitat del *Comet test* aplicat als limfòcits dels rosegadors per a la detecció de mutàgens en el medi terrestre.
- Establir i validar la utilitat del *Comet test* aplicat als cel·lomòcits dels anèl·lids per a la detecció de mutàgens en el medi edàfic.
- Estudi de la contaminació produïda per l'abocador de Gavà mitjançant la utilització del *Comet test* (en *A.sylvaticus* i *A.caliginosa*), i del Test dels Micronuclis (en *A.sylvaticus*).
- Estudi de la contaminació produïda pel vessament de les mines d'Aznalcóllar, mitjançant l'aplicació del *Comet test* en *Allolobophora caliginosa*.
- Estudiar la possible interferència de la divisió cel·lular en la interpretació dels resultats del *Comet test*, quan es treballa amb poblacions no quiescents.
- Estudiar la possible interferència de les imatges apoptòtiques i necròtiques en la interpretació dels resultats del *Comet Test*, i intentar diferenciar el tipus d'imatge obtingut en un i altre cas .
- Comprovació de la mesura de la tècnica per a detectar diferents concentracions d'una substància genotòxica.
- Estudi d'altres noves aplicacions de la tècnica per a mesurar la genotoxicitat directa o indirectament amb la mesura de la cinètica de reparació.

Incís:

Durant l'escriptura de la tesi, igualment durant tot el temps d'experimentació , m'he trobat amb el problema de la nomenclatura, de vegades les traduccions no són del tot exactes, precises, adequades o encertades, sinó aproximades, al mateix temps poden portar a confusions, o inclús el seu ús traduït és moltes vegades difícil pel fet que costi acostumar-se al "so" de la traducció o a aquest intent d'aproximació. Per això he preferit utilitzar termes del vocabulari propi del tema en anglès, de forma barrejada amb el català, m'ha semblat més convenient, i adequat.

Voldria comentar l'especial èmfasi en l'explicació detallada de la tècnica del comet test i la seva discussió durant tota la tesi; al tractar-se d'una tècnica totalment nova al nostre laboratori, i no gaire estabilitzada, en el sentit que va variant en els diferents experiments que presento, tal com va variant en els diferents laboratoris segons les diferents aplicacions i les millores en la realització que es van presentant, com també la pròpia diversitat que hi ha entre els laboratoris en quan al protocol degut a una falta d'estandardització de la tècnica, cosa que fa molt necessari per a la comparació entre els diferents laboratoris l'explicació molt detallada de la metodologia (Speit & Hartmann 1999). Així doncs trobo que es fa necessari fer una discussió pas a pas, i per això presento la discussió metodològica pertinent allà on he considerat necessària, sobretot exposant-la en l'apartat de material i mètodes un cop comentat el protocol seguit.

---



Abreviacions més utilitzades, segons termes tècnics, substàncies i reactius utilitzats:

**SCGE:**..... *Single Cell Gel Electrophoresis Assay = Comet Assay = Comet Test*

**MNT:** ..... Test dels Micronuclis.

**SSB:** ..... *Single Strand Breaks*: trencaments de cadena senzilla.

**DSB:**..... *Double Strand Breaks*: trencaments de cadena doble.

**ALS:**..... *Alkali labil sites*. Llocs alcalino-làbils.

**IC:**..... *Comet Index*

**EA:**..... *Early apoptotic*. Cèl·lules en estadis inicials d'apoptosi.

**LA:**..... *Late apoptotic*. Cèl·lules en estadi d'apoptosi més avançada.

**N:**..... Cèl·lules en necrosi.

**Endo III:**.. Enzim Endonucleasa III. Detecta: *8 oxo-dG, 7 methyl guanine, 5-OH- cytosine, 5OH-uracil*.

**FPG:** ..... Enzim *Formamidopyrimidine-DNA Glycosilase*. Detecta: *Thymine glycol, dihydrothymine, dihydroxydihydrothymine, uracil glycol*.

**UVDE:**..... Enzim *UV DNA damage endonuclease*. Detecta: 6-4 fotoproductess, dímers de pirimidina.

**UDG:**..... Uracil glicosilasa. Detecta: uracil incorporat incorrectament.

**SO:**..... *Styrene oxide*, òxid estirè.

**DMSO:** .... Dimetil sulfòxid.

**PBS:** ..... *Phosphate buffered saline*, tampó pH:7.3

**GGE:**..... *Guaiacol Glyceril Ether*

**DAPI:**..... *4',6-diamidine-2-phenylindol dihydrochloride*.

**BS:**..... sèrum boví

---

## Capítol 1

---

### 1. AVALUACIÓ DE LA POSSIBLE CONTAMINACIÓ DE TIPUS GENOTÒXIC CAUSADA PER L'ABOCADOR GARRAF.

---

#### 1.A. Introducció:

L'Abocador de Garraf, situat en aquest massís, en el Municipi de Gavà, recull la major part dels residus urbans de tota la ciutat de Barcelona i de les seves rodalies (uns tres milions d'habitants), corresponent a una mitjana de volum diari de residus d'1,3 Kg per habitant (segons els censos de residus municipals de l'any 1999, Junta de Residus, [3]), dels quals, a prop d'un milió de tones d'escombraries anuals es dipositen a l'abocador de Garraf (segons les estadístiques dels anys 94-98,[2]).

Inaugurat el 1974 ha estat envoltat de polèmiques sobre la seva possible contaminació i el seu tancament, i actualment arribant ja al seu límit de capacitat, haurà de ser incorporat a l'estructura paisatgística del parc del Garraf després de la seva clausura.

El fet que estigui situat al Massís del Garraf, un massís càrstic amb una geologia única a Catalunya i amb una fauna i flora característiques i valuoses, actualment protegides per la constitució del Parc Natural del Garraf, i el fet que és un abocador de grans dimensions i molt important degut a la quantitat de deixalles que rep, fa que requereixi una especial atenció, en quan als seus efectes sobre el medi ambient.

L'abocador està situat a la Vall de Joan, aprofitant la forma de la vall com a receptacle per a l'emplaçament d'aquest, adquirint així l'estructura típica d'un abocador convencional. En la disposició d'un abocador, calen estudis previs de la geologia per veure que sigui una zona bastant impermeable junt amb altres característiques geològiques i hidrològiques de la zona i rodalies, i calen també estudis d'impacte ambiental. Tot i així, normalment, les zones on han d'ubicar un dipòsit controlat de residus, reben un tractament d'impermeabilització usualment amb argiles compactades i/o gunita; en el cas de l'abocador de Garraf, aquest té una impermeabilització amb gunita i una emulsió bituminosa (1), i també una part amb argiles. Les escombraries es van posant en capes cobertes per terra, es fan unes capes de no més de dos metres i són recobertes per varis centímetres de terra, formant una estructura com de cel·les, ja que es fa tot un sistema de drenatge per a recollir els lixiviatos que es formen degut a les humitats pròpies de les deixalles, al seu procés de descomposició i a l'aigua de pluja que percola per les escombraries. Els lixiviatos són canalitzats cap una piscina, on seran tractats per processos biològics o seran transportats a una planta de tractament d'aigües residuals, com és aquest últim, el cas de l'abocador de Garraf. A tot el voltant de l'abocador es fan uns canals, unes cunetes

---

perimetrals externes per recollir l'aigua de pluja dels voltants de l'abocador i impedir així, que entrin a l'abocador i causin més volum de lixiviats, i uns altres canals perimetrals interns, que recullen les aigües caigudes a la plataforma i talussos de l'abocador i que es canalitzen també cap a una bassa de lixiviats, com a aigües semi-netes, per desviar tant com es pugui les aigües caigudes sobre l'abocador, i evitar així la formació de més volum de lixiviats altament contaminats. Els abocadors també disposen d'una xarxa de tubs porosos els quals recullen els gasos que es provoquen durant la descomposició anaeròbica, que causen un altre tipus de contaminació.

Malgrat les mesures adoptades per a evitar tot el possible les contaminacions que puguin causar els dipòsits controlats de deixalles al seu entorn, aquestes no són suficients moltes vegades, i la contaminació és evident. Es pot tenir en compte que quan es posa en funcionament qualsevol tipus de sistema per solucionar un nou problema, (com serien els residus en aquest cas), tot i les mesures preses per reduir les complicacions que es puguin produir, les previsions de l'impacte ambiental que hi pugui haver, i la comparació amb altres llocs que hagin dut a terme ja aquest sistema anteriorment, moltes vegades es van detectar els problemes durant el funcionament d'aquests sistemes i no prèviament. Un abocador comporta una contaminació, no sols pel fet que suposa una acumulació de tones de residus en una vall, la presència de gasos i l'augment de temperatura degut als processos de descomposició, les olors, l'impacte visual, etc..., sinó també per possibles escapaments de contaminants, degut a l'arrossegament superficial per l'aigua o l'escolament i infiltració a través dels residus de les aigües contaminants cap als aqüífers subterranis degut a algun problema en la impermeabilització, o afectant els cursos superficials degut a un vessament dels lixiviats, sobretot en èpoques de pluges en que encara que el volum de lixiviats que es produeix sol ser considerable, augmenta molt en aquests períodes. Tot això pot alterar d'alguna manera l'entorn de l'abocador. Actualment, l'abocador de Garraf té dues basses de lixiviats; quan es van començar les captures dels ratolins, la segona estava en construcció.

El tipus de deixalles urbanes (RSU, residus sòlids urbans) més corrents són la matèria orgànica, papers, cartró, plàstics, fustes, metalls, cendres, runes, residus tèxtils, metalls, vidres, i altres varis, procedents de activitats de tipus domèstic, comercial, de serveis, sanitàries, de neteja, i de l'abandonament de mobles, estris, electrodomèstics, vehicles, restes orgàniques de poders de jardins, etc.. ((1) i (2)). Aquestes serien les principals deixalles que es dipositen a l'abocador; tot i haver una reducció de diversos d'aquests tipus de residus en aquests últims temps pels plans de reciclatge de vidres, plàstics, papers i cartrons, de la recollida selectiva de piles i altres substàncies contaminants, la posada en marxa de deixalleries, plantes de compostatge (que redueixen considerablement una part de la quantitat de matèria orgànica que anava als abocadors), i incineradores, etc... però encara el volum que arriba als abocadors continua essent considerable.

L'abocador de Garraf tenia previst el seu tancament en 25 anys (1), però sembla ser que s'ha allargat una mica el seu temps de vida degut a la seva importància i necessitat. Amb l'arribada d'uns 600 camions diaris a la planta de Viladecans (és un punt de transferència intermitja, on seleccionen, compacten, i es tracten primerament els residus). És una planta de

triatge d'on en surten continuament catorze camions durant tot el dia cap a l'abocador, això indica la seva important activitat diària.

En el nostre estudi ens interessa el tipus de contaminació degut als lixiviats. Tal com descriu J.Feliu Badaló ( en (1) ), els lixiviats són des del punt de vista químic, unes aigües residuals amb concentracions de contaminants superiors en diversos ordres de magnitud a les "habituals". Els lixiviats es poden escapar per diverses vies de l'abocador. El tipus més corrent de contaminació en els lixiviats procedents d'un abocador d'aquestes característiques, serien: Hidrocarburs aromàtics, PCBs, diversos metalls pesants (CrVI,Cu,Pb,As,Hg,Fe,Ni,Co), cianurs, sulfurs, nitrats clorurs, amoníacs, sulfats, nitrats, etc.... És conegut que una alta concentració d'aquestes substàncies contaminants pot provocar problemes en la salut dels éssers vius, que poden derivar a variacions en el comportament, en la reproducció, o causar una mortalitat prematura, entre d'altres efectes; alguns d'aquests contaminants poden arribar a causar mutacions. És important doncs, conèixer el nivell d'exposició i l'impacte de substàncies genotòxiques en el medi ambient. Ja que aquestes substàncies estan molt estretament relacionades amb fenòmens d'alteracions que poden conduir a efectes carcinògens, o també, degut a la gran reactivitat d'algunes d'elles, poden contribuir a respostes tòxiques, que inclouen els defectes hereditaris a través de mutacions en línies germinals i efectes teratogènics. Tots aquests fets, sobretot els que afecten a la reproducció poden tenir un impacte important a nivell poblacional, (Mitchelmore & Chipman, 1998). Cal però, tenir en compte que la quantitat d'aquestes substàncies que pot haver en el medi ambient, pot quedar diluïda, distribuïda de diferent manera. La seva interacció i disponibilitat, pot ser molt variable i complexa, per tant, és molt difícil avaluar el nivell de contaminació assolit, i les seves repercussions sobre els éssers vius en aquest tipus d'estudi.

En aquest treball doncs, es pretén, fer una primera valoració o avaluació de la possible contaminació de tipus genotòxic degut a la presència de l'abocador, (tenint en compte que s'han utilitzat dues tècniques - Test dels Micronuclis i SCGE – i mostres de dues espècies, *Apodemus sylvaticus* i *Allolobophora caliginosa*, es podria considerar un abordatge parcial a l'estudi sobre aquest tipus de contaminació a la zona, però al mateix temps és important pel fet que pot contribuir al coneixement de la situació i obrir el camí a posteriors treballs, i en el que, a més, veurem que ens servirà pel que preteníem, fer una primera avaluació de la situació). Les informacions relatives a l'exposició d'animals domèstics o salvatges a determinades contaminacions, permeten per una part, conèixer millor el risc que presenten per aquestes poblacions animals, i per altra, posar en relleu i controlar el risc que corre la salut dels humans, i el seu entorn, considerant en aquest cas, als animals com a sentinelles, (Keck, 1991).

En alguns estudis en animals de laboratori amb la versió alcalina de la tècnica del *Comet test*, utilitzada per a detectar carcinògens, es va veure que la seva sensibilitat era del 82%, i l'especificitat del test per detectar substàncies no-carcinògenes era del 83%. Mentre que, avaluant substàncies considerades positives com a carcinogèniques per el test d'Ames, la sensibilitat del *Comet test* augmentava a un 94% (Tice et al.2000). Això ens faria pensar en que és molt vàlid per a mesurar la possible contaminació genotòxica, i així ho podríem aplicar al nostre estudi. Cal però tenir en compte que treballem en espècies salvatges, per una part, rosegadors i per l'altre invertebrats, els quals poden reaccionar de diferent manera (ex: diferent

---

estatus d'antioxidants de l'organisme, sistemes de reparació, etc...), poden estar exposats de manera diferent, i com ja he comentat, en el medi ambient pot haver molts altres factors que influeixin en la concentració, disponibilitat, etc... dels tòxics. A més, també cal tenir amb compte que la genotoxicitat no està limitada als contaminants exògens, hi ha una part de dany oxidatiu endògen que pot donar un valor basal de dany i pot estar relacionat amb la inducció de tumors en alguns casos (Mitchelmore & Chipman 1998; i Collins et al.1997b).

Cada vegada més, s'està buscant i recomanant fer servir metodologies alternatives a l'ús d'animals d'experimentació, però no sempre és possible fer estudis del medi ambient sense la utilització de mostres animals, es vol intentar fer un ús tan petit com sigui possible d'aquestes, mirant de reduir sempre tot el que es pugui, el nombre d'animals utilitzats, buscar tècniques alternatives que no comportin el sacrifici de l'animal, i en cas que calgui el sacrifici d'aquest, intentar aprofitar al màxim totes les mostres possibles de l'individu, i dur a terme totes les proves que es puguin per a l'avaluació de la contaminació. En aquest estudi doncs, s'ha recollit el mínim nombre d'animals possible, s'han utilitzat unes tècniques per l'avaluació de la contaminació genotòxica, mesurant el dany al DNA, tècniques que impliquen una petita quantitat de mostra, en el cas dels ratolins s'ha extret una mica de sang amb cura de perjudicar el menys possible l'individu, i s'ha alliberat un altre cop al medi.

Un dels altres mètodes alternatius a la utilització de vertebrats en l'experimentació, és la utilització de cultius cel·lulars, invertebrats o plantes. En els treballs presentats en aquesta tesi s'han utilitzat les dues primeres opcions. Així doncs, en l'estudi dels possibles efectes contaminants de l'abocador sobre els éssers vius, s'ha utilitzat un lumbrícid, en aquest cas: *Allolobophora caliginosa*, ja que és una espècie autòctona, àmpliament distribuïda i molt abundant. I perquè degut a que són uns prospectors del sòl, poden donar una idea de com pot afectar aquest tipus de contaminació en un altre nivell de l'escala tròfica, i si realment servís com un bon bioindicador de contaminació, seria una bona alternativa a la utilització de vertebrats en aquest tipus d'anàlisi, i de la mateixa manera donaria una opció més senzilla i ràpida, i no tan invasiva, en aquest tipus d'estudis de contaminació. Així en aquest capítol hi ha l'oportunitat de comparar els resultats obtinguts per aquesta espècie i pel ratolí de bosc, i poder veure com afecta la possible contaminació de l'abocador a dos nivells diferents de la cadena alimentària.

---

## **1.1. ABOCADOR GARRAF - *APODEMUS SYLVATICUS***

### **Avaluació de la possible contaminació de tipus genotòxic causada per l'abocador de Garraf, en mostres de sang de ratolí de bosc (*Apodemus sylvaticus*)**

#### **1.1.a. Introducció:**

El ratolí de bosc (*Apodemus sylvaticus*; O.Rodentia, Fam. Muridae) es distribueix per tota Europa. Habita al nord oest d'Àfrica i penetra a Àsia Central fins el Nepal. Es pot trobar arreu de la Península Ibèrica ja que viu des de la vora del mar fins a l'alta muntanya pirinenca, amb oscil·lacions de densitat poblacional segons l'hàbitat, (HNPC). Si bé és una espècie ubiqüista i té poques limitacions ambientals, a Catalunya es presenta com una espècie fonamentalment boscana, els seus hàbitats preferits són les zones marginals dels boscos caducifolis, pinedes i alzinars. També les bardisses, brolles, i marges de pedra afavoreixen la seva presència. En les terres baixes, habita enmig de la vegetació ruderal i a les zones alpines, als boscos de pi negre, però en menys densitat. (Gosàlbez, 1987).

La seva alimentació és molt variada, de règim pràcticament omnívor, encara que la porció vegetal és molt important, basada en tot tipus de llavors i fruits; menja aglans, pinyons, baies i tota mena de gra. A la primavera i estiu complementa la seva alimentació amb la captura de petits invertebrats (fonamentalment cucs, cargols, insectes tant en forma larval com adulta i aràcnids. (HNPC; Gosàlbez, 1987).

El seu cicle reproductor presenta variacions dependents de les condicions ambientals (Gosàlbez, 1987), com serien les condicions climàtiques i la disponibilitat de determinats recursos al medi. En estudis dins de Catalunya s'ha vist diferències en les poblacions dels Pirineus i les zones mediterrànies, essent un cicle més curt i més estacional en el primer cas, i amb dos màxims d'activitat en el segon cas (un màxim a la primavera i l'altre a la tardor). La mitjana d'embrions per gestació està en 4.6 (2-11), (HNPC).

La mitjana del temps de vida d'aquesta espècie es calcula que no ultrapassa als 18 mesos, rarament sobreviuen el segon hivern (Gosàlbez, 1987). Els animals capturats han estat majoritàriament adults.

Hem escollit, entre les nostres espècies d'estudi, l'*Apodemus sylvaticus*, el ratolí de bosc, perquè està molt àmpliament distribuït (com he comentat anteriorment), és molt abundant, i pot servir com a un bon indicador en l'avaluació de contaminació ambiental. (Górriz et al. 1994, 1996).

Com a una petita part de la investigació de l'impacte de l'abocador sobre el medi ambient, hem centrat el nostre treball en l'ús de dos assaigs de genotoxicitat: El "Comet Test" (o també anomenat "Comet Assay", SCGE, "Single Cell Gel Electrophoresis Assay", assaig d'electroforesi de cèl·lules individuals en gels d'agarosa) i el Test dels Micronuclis (MNT).

---

Essent aquest, un tema d'actualitat, novedós en l'ús del SCGE per aquest tipus d'avaluació medioambiental en animals salvatges, i essent un estudi de molta importància avui dia, ja han aparegut els primers treballs similars als nostres combinant la utilització d'aquestes dues tècniques en rosegadors salvatges per l'estudi de la contaminació de tipus genotòxic en el medi ambient, com són els treballs de DaSilva et al.(2000a,b,c), i se n'estan duent a terme d'altres.

Així com el test dels Micronuclis és utilitzat des de fa molts anys en estudis de toxicologia genètica, és un test molt ben establert, i el seu ús en ecotoxicologia és més usual (uns exemples serien Ieradi et al.1998; Degrassi et al.1999; i més quan ha estat modificat recentment per a dur-lo a terme en altres tipus cel·lulars, solventant així la limitació de l'ús concret d'un sol tipus cel·lular, alguns exemples en estudis d'ecotoxicologia en altres tipus cel·lulars: Steinkellner et al.1999, Lucero et al. 2000, com en estudis de genotoxicitat en laboratori: Garaj-Vrhovac & Kopjar,1998; Kašuba et al,1999; Matsuoka et al. 1999; Pitarque et al.1999a, entre molts d'altres), pel que fa al *Comet Assay* és innovadora la seva utilització en aquest àmbit, en estudis de contaminació de tipus genotòxic en el medi ambient en animals salvatges. Però està augmentant ràpidament la seva aplicació per aquest tipus d'estudi en diferents espècies animals i en diferents casos de contaminació ambiental. Un recull d'exemples es dona en els reviews de Rojas et al.(1999) i Cotelle & Ferard (1999). Per tot això es pot pensar en que aquesta tècnica serà cada cop més utilitzada en aquests tipus d'estudi pels resultats tan prometedors que es presenten, i per les avantatges de simplicitat, rapidesa i economia del SCGE.

Els resultats obtinguts en aquest capítol es podran sumar i comparar més endavant als aconseguits per altres treballs del nostre grup, que han utilitzat unes tècniques diferents (com serien tècniques histològiques, de microscòpia electrònica i de mesura de metalls pesats) per a valorar possibles patologies que es poguessin associar amb la contaminació causada per l'abocador de Garraf, (dades no publicades encara).

Hipòtesi:

- El ratolí de bosc es pot considerar una bona espècie sentinella en aquest tipus d'estudi medioambiental.
  - El Comet Test realitzat en sang circulant d' *A.sylvaticus* ens servirà com a indicador dels possibles efectes a nivell de genotoxicitat en els individus d'aquesta espècie que habiten als voltants de l'abocador, respecte els que viuen en una àrea control.
  - Les zones considerades contaminades (les zones afectades per l'abocador, A,B,C) mostraran diferències amb les zones considerades control (D), en les quals, el dany al DNA mesurat amb el Comet Test, serà menor.
  - Les zones B,A,C, per ordre de la que considero de més a menys contaminada, tindran també aquest ordre de relació de més a menys dany al DNA mesurat amb el Comet Test.
  - S'espera els mateixos resultats en la realització del Test dels Micronuclis que els obtinguts pel Comet Test: trobar diferències entre les zones control i les contaminades, on hi hauria una quantitat major de micronuclis en les últimes anomenades, i més, quan més properes a la font de contaminació.
-

Objectius:

- Posar a punt la tècnica del *Comet test* en sang circulant de ratolí de bosc.
- Capturar ratolins a diferents zones d'exposició de l'abocador de Garraf, i en una zona considerada control.
- Comparar els resultats de les zones afectades per l'abocador i la zona control, per tal de detectar les eventuais diferències entre el control i les zones possiblement contaminades, i entre les diferents àrees de l'abocador.
- Avaluar la possible contaminació de tipus genotòxic provocada per la influència de l'abocador, i si respon a un gradient de distribució descendent a mesura que la zona d'estudi s'allunya de l'abocador.
- Comparar els resultats obtinguts pel *Comet test* en les mostres de ratolí de bosc amb els resultats del Test dels Micronuclis sobre les mateixes mostres d'individu.
- Avaluació de la tècnica del Comet Test pel seu ús en aquest tipus d'estudis medioambiental.

Pla de treball:

- Realització de totes les proves necessàries per posar a punt la tècnica del *Comet test* en sang circulant de ratolí de bosc.
  - Captura d'un nombre mínim i adequat d'*Apodemus s.* en tres diferents zones d'influència per l'abocador :
    - zona A: a dalt de tot de l'abocador.
    - zona B: sota la bassa de lixiviats.
    - zona C: uns dos Km.riera avall sota la bassa de lixiviats.
  - I captures en una zona considerada control, una zona neta, lliure de contaminació, dins el Parc Natural del Garraf:
    - zona D.
  - Realització del *Comet test* en les mostres de sang circulant dels ratolins de bosc.
  - Realització del Test dels Micronuclis en mostres de sang circulant dels mateixos.
  - Comparació dels resultats.
-



**1.1.b. Material i Mètodes:**

## Captures:

- Per a la captura del ratolí de bosc es van utilitzar les trampes tipus *Sherman*, (veure Fig.1.1.6).
  - Després de la prova de diversos tipus d'esquer, per intentar trobar el que millor anés per a la captura d'un major nombre d'animals i fos al mateix temps el més còmode possible d'utilitzar, passant des de la utilització de pa amb tonyina i oli, pa amb oli, torrades amb oli, pipes i cacauets, es van fer servir trossos de pa fregit amb oli. Va resultar ràpid, més net i eficient, tot i que el que més influïa en les captures era l'època de l'any junt amb la situació de pluviositat o sequera.
  - Es van col·locar entre 60 i 80 trampes per zona. Es posaven cap a última hora de la tarda i es recollien a primera hora del matí. Ja que és una espècie principalment nocturna, i evitant així que l'animal estés masses hores en la trampa, cosa que els podria provocar un estrès enorme, i degut al seu ràpid metabolisme, podrien morir per falta d'aliment o pel fred, etc...
  - Es distribuïen pels marges seguint el curs de la riera de la vall de Joan, en les zones B i C, ja que el que es pretenia era veure el possible efecte genotòxic en els individus que s'alimenten i viuen prop de la influència de la contaminació que pot provocar l'abocador, i en aquest cas la zona que quedaria afectada pels escapaments de l'abocador serien els voltants de la bassa de lixiviats, i seguirien la riera.
  - Pel cas de la zona A, la zona de dalt de tot de l'abocador es van distribuir les trampes als marges del voltant de l'abocador. Per poder veure l'efecte d'aquest sobre els ratolins de bosc alimentats amb plantes dels voltants de l'abocador (tot i que podrien també alimentar-se en el mateix).
  - Per la zona control (D), es van triar zones considerades lliures de contaminants ubicades també al Parc Natural del Garraf. Una de les zones control va ser la vall de la riera Fondo de Can Perers, a uns tres o quatre Km de la vall de Joan en línia recta, i la zona cap a Begues a uns 6 Km de la riera de l'abocador.
  - Es va considerar un número mínim de 10 ratolins per àrea d'estudi.
  - Les captures es van dur a terme durant l'any 1998, per les proves de posada a punt la tècnica del comet test. I les definitives, van tenir lloc al 1999 i 2000 en les mateixes èpoques de l'any, entre mijants març i juliol (primavera-estiu).
-

Fig.1.1.1: Vista general de l'abocador de Garraf amb les àrees d'estudi : A,B,C.



(Delgado et al., 2000)

- Un cop capturats els ratolins, s'anestesiaven lleugerament amb éter (Éter dietílic anestèsic estabilitzat amb 6 ppm de BHT Panreac, ref.192770). Es pretenia causar el menor dany possible als animals.
- L'extracció de sang es portava a terme un cop ben anestesiats l'animal, amb un capil·lar heparinitzat, pel sinus orbital (Górriz et al.1996). Es treia una quantitat de sang d'uns 0,2ml per individu. Un cop extreta la sang, es pesaven i es determinava el seu sexe, llavors eren alliberats, i els ratolins podien marxar al cap d'una estona ben recuperats de l'anestèsia.
- Amb una gota de sang es feien els frotis i es fixaven amb calor per posteriorment fer la tinció pel test dels Micronuclis.
- L'altre quantitat de sang era guardada en tubs Eppendorf heparinitzats, i mantinguts a 4°C en una nevera fins a arribar al laboratori, on es duia a terme el Comet test de seguida, com a màxim dues hores després de l'extracció de sang.

### Tècnica del Comet Test

Protocol Comet Test (versió alcalina) en Sang Total:

(El protocol seguit és una modificació del donat per Singh et al.(1988)).

Preparació de la mostra:

- Amb la mostra de 0,2 ml de sang:
- Centrifugar la sang a 5000 rpm durant 6 minuts, per separar la fracció cel·lular del plasma.
- Treure el sobrenedant (el plasma en aquest cas).

- Afegir 1,4 ml de PBS (per aconseguir una dilució 1:7, per obtenir un número adequat de cèl·lules), PBS a l'1% i en fred.
- Per fer un rentat, barrejar bé, centrifugar 6 minuts a 5000 rpm i treure el sobrenedant.
- Afegir 20 µl de PBS 1%. Perquè em va caldre una altra dilució per obtenir un número adequat de cèl·lules per poder visualitzar-les bé pel microscopi i fer els comptatges, ja que convé que no estiguin massa concentrades i juntes i tampoc que n'hi hagi poques (Tice et al.2000); el número ideal estaria entre  $3 \times 10^4$  i  $2 \times 10^5$  cèl·lules per porta, (Mckelvey-Martin et al.1993).
- Barrejar bé, i d'aquí se'n treuen 10µl per barrejar-los amb 80µl d'agarosa de baix punt de fusió (LMP).

Preparació de les capes d'agarosa:

- Primera capa: En portaobjectes rugosos (són un tipus especial de portaobjectes rugosos en tota la seva superfície, no esmerilats sinó rugosos, ja que l'esmerilat és massa fi i també relliscarien les capes o no s'hi adheririen bé) es fa una primera capa de 110µl d'agarosa de punt de fusió normal (*Agarose eletrophoresis grade*, GIBCO BRL, Ref.15510-019) a l'1% amb PBS. Per tal d'aconseguir una capa plana i homogènia es posa un cobreobjectes de 24x60mm i es col·loquen els portaobjectes en fred, en una safata amb gel, (Olive et al.1991, Klaude et al.1996), o a la nevera, (Collins 2000); (en aquest cas es va utilitzar la primera opció) per permetre que polimeritzi l'agarosa. Es treu el cobreobjectes i es fa la segona capa d'agarosa.
- Segona capa: De la barreja de cèl·lules i agarosa de baix punt de fusió al 0.9% (LMP *Agarose Low Melting Point*; GIBCO BRL, Ref.15517-014) mantinguda a 37-40°C, es treuen 80µl per fer la segona capa d'agarosa. Es posa un cobreobjectes per tal que quedi la capa llisa i homogènia i es deixa solidificar entre 5 i 10 minuts sobre una placa metàl·lica situada sobre una safata amb gel, i es retira el cobreobjectes suaument.
- Es fa una tercera capa de 80µl d'agarosa de baix punt de fusió (al 0.9% amb PBS), com a protecció de la capa amb cèl·lules. Es col·loca el cobreobjectes i es deixa també solidificar la capa, retirant després el cobreobjectes.
- Posar els portaobjectes en una cubeta de tinció amb 200 ml de líquid de lisi fred (NaCl 2,5M, EDTAsòdic 100mM, Tris 10mM, NaOH 8 grams per ajustar el pH a 10; i a on just abans de posar les mostres s'hi afegeix el 10% DMSO i 1% de Triton). La lisi es dona durant 1,5 hores a la nevera i en fosc, per evitar algun dany addicional al DNA. En aquest temps es produeix una lisi de totes les membranes cel·lulars, així com varies proteïnes per deixar lliure el DNA (en forma de nucleoid, Mckelvey et al. 1993; Dušinská et al.,1996), per tant desapareixeran tots els eritròcits, així doncs no cal separar els limfòcits i tota la sèrie blanca dels hematies i podem treballar amb sang sencera.

A partir d'aquí tots els passos són a la foscor, per evitar dany addicional al DNA, (Singh et al 1988), i en fred.

- Assecar una mica els portaobjectes i posar-los en la cubeta d'electroforesi de manera que es toquin l'un amb l'altre i intentant omplir la capacitat de la cubeta (si no hi ha suficients portaobjectes amb mostra, se'n posen de normals sense res, sense mostra; encara que per a alguns autors no és tant important aquest fet, sinó més el fet que es

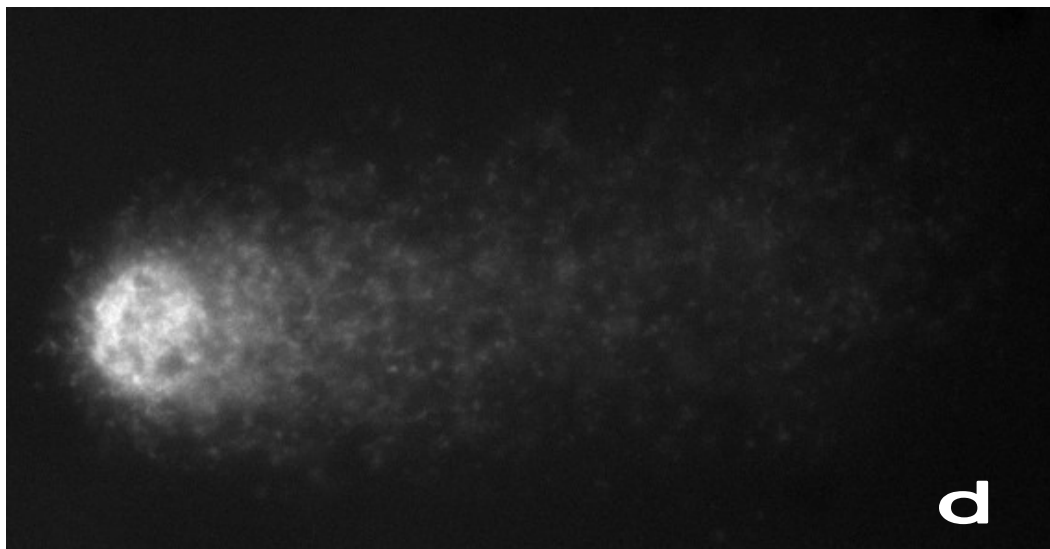
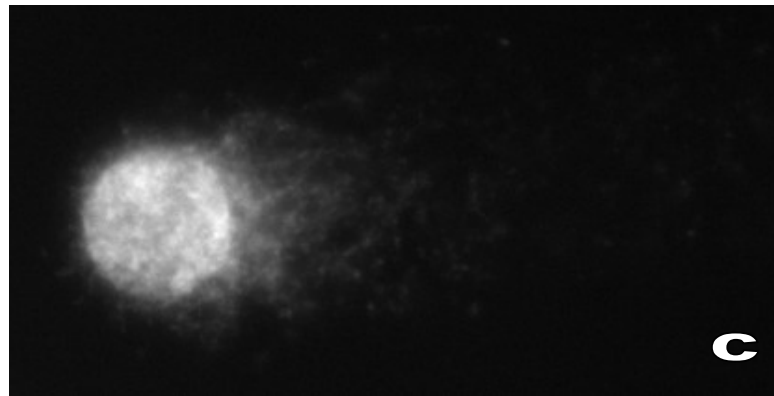
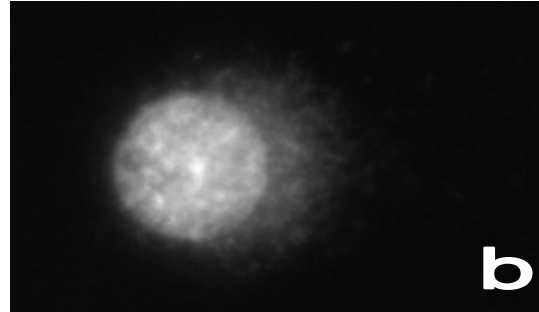
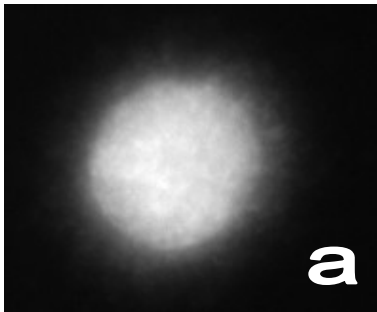
toquin tots i acabar una fila perquè passi bé la corrent) amb el tampó d'electroforesi (Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, NaOH 300mM), amb un pH de 13, preparat el mateix dia i mantingut en fred. Es mantenen els portaobjectes en la cubeta amb aquest tampó, a 4°C durant 20 minuts per provocar el "desenrotllament", relaxació, i separació de les dues cadenes de DNA.

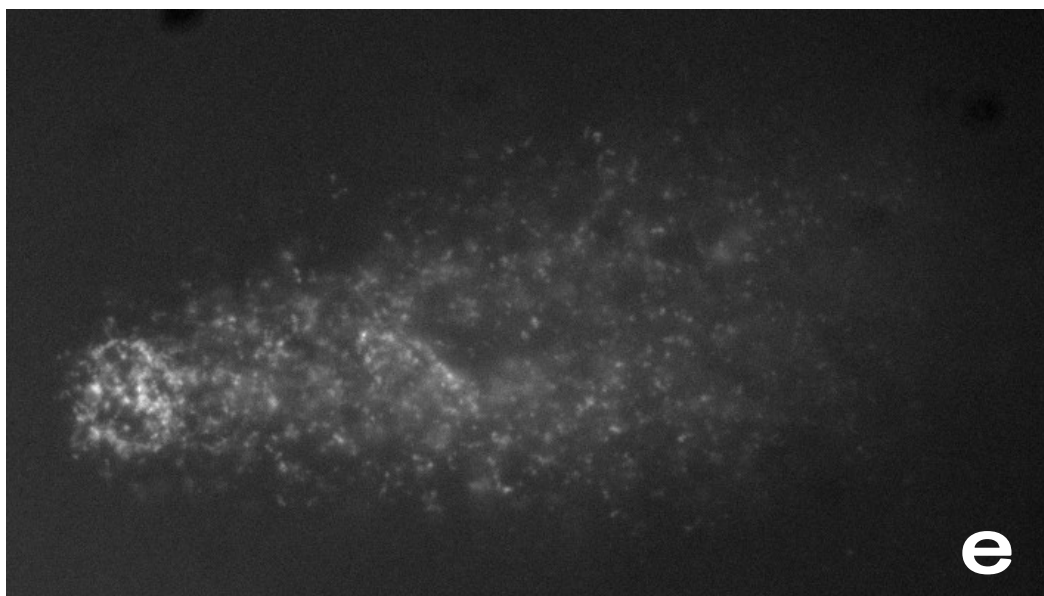
- Electroforesi a 25-30 volts i 300 mA, durant 20 minuts mantinguda en fred (es manté a 4°C posant la cubeta en una safata amb gel). Es fixen els volts i es mantenen els mA afegint o treient tampó fins aconseguir els 300mA, però un cop aconseguits no es corregeixen més, ja que tendeixen a pujar una mica durant l'electroforesi.
- Assecar els portaobjectes i posar-los en un placa horitzontalment (dins una safata amb gel), i passar a fer tres rentats (els dos primers de 5 minuts i l'últim de 10) amb tampó Tris (0.4M) a pH 7.5 (també en fred) per neutralitzar i eliminar l'àlcali i els detergents. Posant les gotes del tampó a sobre els portaobjectes cada vegada. En aquest pas sembla que les cadenes intactes de DNA que estan al cap del comet, es tornen a ajuntar, quedant com a doble cadena, mentre que les cadenes relaxades i trencades en forma de *loops* de la cua es mantindrien en cadena simple, sent improbable la reassociació, això s'ha vist amb la tinció amb taronja d'acridina, (Angelis et al.1999).
- Assecar una mica els portaobjectes i fer la tinció amb 65 µl de DAPI (4,6Diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride Hydrate a una dilució de 5 µg/ml. Pitarque et al.1999a), posar els cobreobjectes i esperar uns 6 minuts, llavors treure l'excés de colorant espolsant una mica el porta i guardar-los en una caixa per portaobjectes amb una paper humitejat amb PBS, ben tapada i a la nevera (Mckelvey-Martin et al.,1993). Es guarden bé una setmana, més temps comencen a fer-se malbé (contaminacions, pèrdua de fluorescència, etc...tot i que ara recentment s'ha trobat ja diferents maneres de conservar els portaobjectes amb les preparacions sense que es produeixi cap alteració a la mostra, Rojas et al.1999; Speit & Hartmann 1999; Collins 2000; Tice et al.2000 i Štětina comunicació personal; però en el moment en que es feia l'experiment, no es coneixia encara).
- Un cop tenyit es dona pas a les observacions amb el microscopi de fluorescència (Leica DMRB FLUO) amb el filtre: UV BP340-380; a 400x.

La lectura es va fer de forma visual, i no utilitzant el sistema d'anàlisi d'imatges del programa informàtic per al comet test. Es van establir 5 categories de formes, de l'a a l'e, per considerar des de les formes amb un major dany al DNA (e) fins a formes sense dany(a), aquestes categories coincideixen en termes generals amb les establertes per altres autors (Gutiérrez et al. 1998; Pitarque et al.1999a).

Així doncs, la **a**: seria una forma esfèrica, que representaria que no hi ha trencaments o *loops* al DNA, i llavors tot el DNA migra compacte i junt en l'electroforesi donant aquesta forma esfèrica. La **b**: tindria un principi de cua, per tant un mica de dany al DNA, i així respectivament fins a la forma **e**, que representaria que quasi no hi ha cap i només queda cua, seria la forma de major dany.(Anderson et al.1994; Holz et al.1995; Dušinská & Collins, 1996; Gutiérrez et al. 1998; Pitarque et al.1999a; Angelis et al.1996; Miyamae et al 1998; Speit & Hartmann 1999; Collins et al. 2000; Da Silva et al.2000a,b,c; etc...).

Fig.1.1.2. Fotografies de les categories de dany utilitzades:





- Es van comptar un nombre de 50 cèl·lules per portaobjectes, havent un duplicat per a cada mostra, el nombre total comptat doncs per animal va ser de 100 cèl·lules (Gutiérrez et al.1998a,b; Pitarque et al. 1999a, Collins 2000, entre molts d'altres). Tice et al.(2000) recomana en estudis *in vitro* fer un comptatge de 25 cèl·lules per portaobjectes i fer-ne dos per mostra, mentre que en mostres *in vivo*, recomana comptar 50 cèl·lules per a cada un dels dos replicats , fent un total de 100 cèl·lules. Altres autors compten fins a150-200 (Villani et al.,2000); o 500-1000 cèl·lules, (Holz et al. 1995; Miyamae et al.1998). Cal tenir en compte de fer els comptatges evitant els marges del portaobjectes, on un alt nivell de dany anòmal es pot observar sovint, Collins 2000).
- Es va establir una escala semiquantitativa de valors de dany aplicat a la sèrie de les categories establertes. Així doncs es va considerar la categoria **a** com a un dany zero, i es va multiplicar el nombre d' **a** (freqüències de la categoria **a**) pel coeficient establert de zero, per a **b** un coeficient de 0.25, per a **c** de 0.5, per a **d** de 0.75 i 1 per a **e**. Amb la suma de tots aquests valors per a cada mostra s'obté un número el qual ja es pot fer servir per a la comparació amb les altres mostres dels altres animals, i al que podríem anomenar com a "Comet Index" (IC), que seria una mena d'índex de dany al DNA. Així el valor d'IC dels gràfics i la taules que presentaré, és la mitjana dels valors del "Comet Index" per a tots els animals de cada àrea, que correspon a les freqüències de cada categoria de dany multiplicada pel seu coeficient assignat, i tot sumat per a cada individu:
 
$$\{(n^{\circ}a) \times 0 + [(n^{\circ}b) \times 0.25] + [(n^{\circ}c) \times 0.5] + [(n^{\circ}d) \times 0.75] + [(n^{\circ}e) \times 1]\}$$

És difícil poder assignar un valor de dany a les categories quan realment no se sap si és correcte o no el valor establert, ni si la quantitat de dany representada en forma d'imatge augmenta en aquesta proporció segons les categories, però és la quantitat que es posa de manera arbitrària ja que se li ha d'assignar un nombre per poder fer les comparacions i mesurar d'alguna manera el dany. Altres autors estableixen també categories (de 0 a 4 o fins a 5, essent

cinc o sis categories respectivament) i donant el valor de 0 a les menys danyades fins a 4 a les més danyades; així si el comptatge es per a 100 cèl·lules, els valors arbitraris van de 0 a 400, si hi ha cinc categories; (Collins et al.1996,1997b; Dušinská & Collins, 1996; Slameňová et al.1997; Gutiérrez et al.1998a,b; Angelis et al.1999, Pitarque et al.1999a; Collins 2000; Zhong et al.2001), de 0 a 200 si només compten 50 cèl·lules (Speit & Hartmann 1999; DaSilva et al. 2000a,b,c); o de 0 a 500 per a sis categories (Holz et al.1995), o tal com fa Anderson et al.(1994) que dóna un interval de percentatge de dany per a cada una de les cinc categories. En el comptatge visual, hi ha autors que utilitzen un ocular micromètric per mesurar la longitud de la cua (Hooghe et al.1995; Gutiérrez et al.1998b; Pitarque et al.1999a; Bock et al.1999; Speit & Hartmann 1999), però en el nostre estudi es va utilitzar tan sols les mesures per categories de dany.

Discussió de la metodologia:

Comet Test:

Una part molt important de la tesi es va basar en la posada a punt de la tècnica del Comet test. Com ja he comentat anteriorment aquesta tècnica és relativament nova, i el seu ús va incrementant molt ràpidament en diferents àmbits d'estudi. No té encara estandarditzat oficialment el seu protocol, això fa que hi hagin variacions segons els laboratoris. De la mateixa manera que hi ha també variacions en la tècnica degut a que s'ha d'anar adaptant a les noves aplicacions i usos, a les millores tècniques que van sorgint, i al tipus de mostra emprada. Així doncs el protocol seguit per al Comet test adquirirà en el curs de la tesi alguns canvis que aniré presentant i comentant en cada cas. He cregut necessari, però, fer una primera i petita discussió sobre la tècnica en aquest primer capítol com a una petita introducció a tot el que ve en els següents capítols en quan a les variacions, i que continuaré explicant en cada capítol corresponent.

Un dels punts a tenir en compte per al bon procediment de la tècnica és tenir cura de l'aigua utilitzada en la preparació de les solucions necessàries, així en aquest cas com en tots els experiments realitzats en el nostre laboratori, totes les solucions dels diferents reactius es van preparar amb aigua MilliQ, mentre que les proves realitzades en un altre laboratori (i que mostraré més endavant), es van preparar les solucions amb aigua bidestil·lada i destil·lada segons el cas. És molt important que no estigui contaminada i també són molt importants les característiques de l'aigua per al correcte funcionament de la tècnica. Alguns laboratoris inclús esterilitzen en autoclau les solucions preparades, en el nostre cas, no es va considerar necessari excepte per alguns reactius quan es treballava en cultius cel·lulars.

---

Capas d'agarosa:

Un dels grans problemes que es va tenir al principi d'aquesta tesi (així com també per a molts altres autors que utilitzaven aquesta tècnica) va ser la pèrdua de les capas d'agarosa durant el procediment del Comet test. Vàrem fer servir els porteobjectes rugosos tal com molts altres autors (Mckelvey-Martin et al., 1993; Gutiérrez et al., 1998; Pitarque et al. 1999a,b; etc...), i vam canviar els percentatges de les agaroses, fent-les més concentrades; però la solució que en el nostre cas ens va resultar més efectiva per evitar el problema, va ser canviar la marca de l'agarosa (gràcies a la suggerència de M.Pitarque i S.Gutiérrez). Vam aconseguir d'aquesta manera millorar la qualitat de les capas notablement i va disminuir també les pèrdues de capas, però va caler fer altra cop proves a diferents concentracions de l'agarosa. Així les capas de l'agarosa de baix punt de fusió (LMP) es van passar de fer de concentracions de 0,5% a 0,7%, i finalment es va optar per una concentració de 0,9%, no més, perquè sinó queda massa espessa i no es reparteixen les cèl·lules bé per tot el portaobjectes, i poden canviar també els resultats de la migració en l'electroforesi (Tice et al. 2000). La correcta preparació de les capas, és important per a no perdre les mostres i per a la seva bona visualització de les imatges amb el mínim de soroll de fons. (Tice et al. 2000).

Es va començar fent una tercera capa d'agarosa de LMP a sobre la segona capa d'agarosa i cèl·lules, per a la protecció de la segona capa amb les cèl·lules (tal com comenten Mckelvey et al. 1993; Fairbairn et al. 1995; Rojas et al. 1999), però finalment en els següents experiments es va suprimir aquesta capa perquè es va veure, a l'estar treballant en altres laboratoris, que no és tan necessària, tot i que per Fairbairn et al. (1995) i altres autors, aquesta tercera capa serviria, junt amb altres precaucions per evitar una heterogenitat en el portaobjectes (actualment la majoria d'autors ja no la posen sobretot en estudis que utilitzen enzims ja que sembla ser que penetren pitjor aquests si hi ha tres capas, Tice et al. 2000).

És important el bon refredament de les capas d'agarosa (per exemple en plaques metàl·liques sobre safates amb gel, Olive et al. 1991, Klaude et al. 1996, o a la nevera, Collins 2000), perquè quedin bé, i no es desenganxin tant (Singh et al. 1988). Si es fa bé la capa, el cobreobjectes surt sol sense trencar ni arrossegar la capa d'agarosa, el comptatge és més fàcil, la tinció queda millor i s'elimina molt soroll de fons. La temperatura no sols és un fet important a l'hora de preparar les capas i les mostres, sinó durant tot el procés de la tècnica. Cal en tot moment mantenir en fred tots els passos, per a la preservació de les cèl·lules, el manteniment de les capas i reactius, evitar alteracions a les mostres degut a elevades temperatures, per a un bon funcionament de l'electroforesi (Speit et al. 1999; Tice et al. 2000) etc..., i per a una disminució de l'heterogenitat en els resultats. També seria recomanable una temperatura ambient relativament baixa al laboratori per a ajudar a mantenir tots els passos en fred, però en molts casos no es té en compte aquesta segona mesura i no es troben variacions o problemes en el procediment, ja que el més important és poder mantenir les solucions en fred i mantenir els diferents passos en fred, en gel o a la nevera.

---



Portaobjectes:

Els portaobjectes que hem utilitzat, com ja he comentat, eren rugosos en aquest experiment, tota la seva superfície és rugosa per a facilitar l'adherència de les capes d'agarosa. Es poden reciclar, però és millor no reciclar-los masses vegades. Per a reciclar: es treien les capes d'agarosa amb el mateix cobreobjectes i es deixaven en remull durant una nit o fins a un o dos dies en sabó desincrustant (Dabeer), i llavors es rentaven amb aigua i sabó de rentaplats intentant no rascar massa la superfície per no gastar la rugositat, es posaven en etanol de 70° per desengreixar-los bé i finalment es guardaven al congelador amb etanol absolut fins el dia del seu ús, en que es treien una estona abans i es deixaven assecar a l'aire. Es van reciclar varies vegades, tot i que es recomana no reutilitzar-los perquè llavors perden la rugositat i hi ha més perill de pèrdua de l'adherència de les capes d'agarosa (Collins, 2000). Però es va poder veure que un cop aconseguida la concentració d'agarosa adequada per l'adhesió i després d'un suficient temps per a un refredament i solidificació correctes, aquests portaobjectes anaven bé, encara que s'haguessin reciclat diverses vegades, i no es perdien les capes.

La utilització dels portaobjectes rugosos quedarà més endavant substituïda per portaobjectes normals en els quals es posa una capa d'agarosa normal i es deixa assecar a l'estufa, per fer una capa d'adherència a la primera capa d'agarosa de punt de fusió normal, seguida de la segona capa amb cèl·lules.(Štětina, comunicació personal, i Collins 2000; Tice et al.2000).

Altres punts del procediment seguit:

Hi ha altres parts de la tècnica que variaran en els següents capítols, però que ja les comentaré en el corresponent moment.

Un altre punt important és la quantitat de sang utilitzada en l'experiment, es recolliren mostres de 0.2ml de sang de cada animal:

Al principi havíem començat aïllant els limfòcits amb NycoPrep.1077 Animal, (Nycomed; ref.:224110), amb la necessitat d'una quantitat de sang considerable, mentre que el nostre propòsit era poder buscar un sistema d'avaluació de la possible contaminació sense el sacrifici ni gran perjudici de l'animal, així vam optar per la utilització de sang sencera, amb el qual ja no es feia necessari aquest pas i podíem utilitzar una menor quantitat de sang, passant a mesurar l'efecte sobre tota la sèrie blanca, (els limfòcits en són una part abundant i es podria considerar doncs, la seva avaluació), servint de la mateixa manera per al que volíem obtenir en l'estudi que es volia dur a terme (altres autors han utilitzat també sang sense aïllar els limfòcits en estudis similars amb ratolins, DaSilva et al.2000a,b,c; Freire-Maia et al.2001) i en altres tipus de treballs també (Singh et al.1988; Gutiérrez et al.1998a,b; Pitarque et al.1999a;etc..). S'han obtingut resultats diferents utilitzant limfòcits o sang sencera quan es vol exposar aquestes cèl·lules aïllades a un tòxic,(Andreoli et al.1999, etc..., també comentat per Rojas et al.1999), però aquest és un experiment diferent al nostre ja que nosaltres no fem incubacions amb cèl·lules aïllades, treballem amb mostres de sang d'animals que han estat exposats a un o diversos tòxics.

---

Un cop ja començades les captures i els experiments, es va poder veure que en l'ús de sang sencera per al Comet test, no és necessària tanta quantitat de sang, no cal una centrifugació per a la separació del plasma, i al no aïllar tampoc els limfòcits, la quantitat de sang requerida és més petita, tan sols és necessari extreure la quantitat que es fa servir per a realitzar les capes d'agarosa, uns 7-10µl per portaobjectes, (es poden posar uns 10µl de sang sencera + 18µl de PBS, i barrejar-los amb els 85µl d'agarosa per a fer la capa, Štětina, comunicació personal; actualment també per aïllar els limfòcits suficients per al Comet test també es pot utilitzar una petita quantitat de sang, Speit & Hartmann 1999, Collins 2000; i R.Tice comunicació personal). Al ser una petita quantitat de sang facilita molt la seva extracció i ja no caldria fer-ho pel sinus orbital, sinó que es podria fer per la vena caudal o la vena safena, suavitzant així les molèsties i estrès a l'animal, (Van Herck et al.2001, comenta els efectes, les avantatges i inconvenients de l'extracció en un i altre cas, nosaltres vam escollir el plexe orbital seguint les referències d'estudis anteriors, Górriz et al.1996; ja que per extreure aquesta quantitat de sang en viu i amb l'animal anestesiats, ens va resultar la manera més adient). De cara a un nou i posterior estudi d'aquest tipus s'aplicaria aquest mostreig en el que cal menor quantitat de sang recollida, no es va dur a terme en aquest cas degut a que no es volia variar el procediment de les mostres seguit fins llavors. De tota manera segons un treball de Swann et al. (1997), realitzat en diverses espècies de ratolins per a mesurar els efectes del mostreig de sang en la supervivència d'aquests, on els treien 0.2ml de sang, en la majoria d'espècies analitzades no hi havia diferències significatives amb els controls. Tanmateix, es va intentar sempre tenir la màxima cura en la manipulació dels animals per a causar-los el menor dany i estrès possible.

En quant a la preparació de les capes, es van fer proves agafant 10µl i més tard 20µl de la dilució de cèl·lules amb PBS per barrejar amb els 80µl d'agarosa LMP, i no es van veure diferències en la concentració de cèl·lules, ja que les dues es visualitzaven igual de bé pel microscopi, ni massa densitat ni poca. Així en els últims experiments es van utilitzar 20µl, per la més fàcil manipulació al ser una quantitat més gran, tot i que en els dos casos es vàlid, perquè l'important és un nombre adequat de cèl·lules per visualitzar-les bé al portaobjectes, que no quedin massa concentrades, perquè llavors la imatge és d'unes sobre les altres impeding la visualització de la forma del comet, i també podria afectar en el resultat de l'electroforesi, així com tampoc és bo, una concentració molt baixa de cèl·lules ja que queden massa escampades, i hi ha problemes per al comptatge. Un nombre adequat seria entre 1000 i 50.000 cèl·lules en 10µl de suspensió de medi o PBS (Rojas et al., 1999; Speit & Hartmann 1999), és a dir, aproximadament una concentració de  $1 \times 10^6$  cèl/ml (en cultius cel·lulars, Speit & Hartmann 1999; Tice et al.2000; Collins 2000).

Van caldre algunes proves també per ajustar la tècnica al ratolí de bosc. Les primeres proves sobre el funcionament de la tècnica es van fer amb *Mus musculus* i al final es va fer servir el mateix protocol per a una i altra espècie amb una petita modificació tan sols com era el temps de lisi, que va passar d'una hora en ratolí de laboratori a una hora i mitja en ratolí de bosc. Tot i que els temps de lisi varien molt entre diferents autors o laboratoris (de com a mínim una hora, Singh et al.1988; Fairbairn et al.1995; Rojas et al.1999; Speit & Hartmann 1999; Tice et al.2000, o menys en alguns casos concrets, fins a tota una nit, Mckelvey-Martin et al.1993, Yendle et al.1997, o fins a setmanes tal com DaSilva et al.2000a,b,c; però en tot cas no més de 4 setmanes com comenta Speit & Hartmann 1999), també varia una mica la seva

composició segons el laboratori o l'aplicació que es vol donar a la tècnica (com pot ser l'ús de sarcosinat o no, i de DMSO o no, etc...). Tice et al.2000 indica que hi ha un temps mínim necessari per alliberar de manera adequada el DNA, i que aquest pot variar segons el tipus cel·lular, així trobem variable el temps de lisi des de menys d'una hora fins a mesos en els diferents laboratoris, com ja havia comentat, per això va ser necessari en el nostre cas, ajustar el temps per a les diferents espècies. Per a les mostres utilitzades en aquesta tesi no s'ha cregut convenient deixar més de dues hores, o com a màxim sis hores, les mostres en lisi (màxim aconsellat per a no variar els resultats en el tipus d'estudis que es van dur a terme; Štětina, comunicació personal) ni s'ha cregut que poden estar més d'aquest període sense que es produeixi un augment del nombre de comets en el nostre cas concret. Hi ha estudis similars al nostre en aquest capítol, com els de DaSilva et al.(2000a,b,c), que els mantenen setmanes. Recentment, Banáth et al.2001, indiquen en un cas determinat que millora la detecció del dany en deixar-lo en lisi tota una nit a un pH elevat, així doncs hi pot haver variacions també segons les aplicacions, però el més habitual és que els temps de lisi siguin d'una hora com a mínim. Per evitar cap tipus de problema d'aquesta mena es va mantenir les mostres en la solució de lisi sempre el mateix temps, que variava segons el tipus de mostra que vaig fer servir entre una hora i dues, i en algun cas excepcional fins a prop de sis hores en alguns cultius cel·lulars.

És important el control del pH per aconseguir uns bons resultats en la tècnica (Ross et al.1995), com també els intervals de temps en que es dona cada pas del procediment segons el que es vulgui detectar. Aquests temps són variables entre els diferents laboratoris, (en els *reviews* de McKelvey-Martin et al.1993 i Fairbairn et al.1995, hi ha un recull d'aquestes variacions), en el nostre cas hem seguit bastant acuradament els temps donats per Singh et al.1988. La temperatura durant el desenrotllament i l'electroforesi alcalines també és important per a la sensibilitat del test (Rojas et al.1999), en el cas de l'electroforesi pot variar de 4°C fins a temperatura ambient en diferents laboratoris. S'hauria de mantenir una temperatura controlada per a l'experiment, tal com explica Speit et al.(1999), ja que un augment de temperatura augmenta la sensibilitat del test. A temperatura ambient és més sensible però hi ha més variabilitat entre experiments, seria doncs aconsellable una estandardització en la temperatura utilitzada. La temperatura ambient pot variar als laboratoris, per a mantenir la temperatura constant es pot utilitzar el tampó en fred i dur a terme l'electroforesi en fred, posant en gel el tanc, (com és el que s'ha utilitzat en aquest capítol), o es poden realitzar aquests passos a la nevera, (com he fet en altres ocasions que ja comentaré més endavant), o estar en una cambra refrigerada, però llavors s'hauria d'augmentar els temps d'electroforesi i de desenrotllament per a obtenir la mateixa sensibilitat que a una major temperatura, temperatura ambient, tot i així es considera que a 4°C el comet test és prou sensible, i en alguns casos concrets on el dany pot ser baix es podria pensar en augmentar la temperatura en aquests passos, però sempre amb unes condicions estrictes per abolir les possibles variacions o artefactes (Speit et al.1999). De tota manera hi ha casos en que s'han arribat a realitzar els passos de lisi, desenrotllament i electroforesi a 0°C (Sasaki et al.1999; Tsuda et al.2000), o tots tres passos a temperatura ambient (Godard et al.1999; Florent et al.1999). He seguit però el protocol més habitual on es duen a terme tots els passos en fred, tenint en compte que l'ús d'una temperatura més baixa en l'electroforesi proporciona un increment de la reproductibilitat del test (Tice et al.2000). Alguns autors comentaven el fet que s'havien de mantenir tots els passos en fred, per evitar alguna possible reparació del dany durant el procés de la tècnica, entre d'altres coses.

En quan a la mesura dels resultats, en aquest capítol es realitza mitjançant el comptatge visual i no un sistema d'anàlisi d'imatges específic per al comet test, (en aquest cas no es va utilitzar el sistema informàtic perquè no se'n disposava, però en alguns experiments dels capítols 3 i 4 realitzats en un altre laboratori sí s'usarà), es consideren vàlids els dos tipus de comptatge, i s'accepten. En estudis on s'han dut a terme els dos sistemes en paral·lel s'ha vist que s'obtenen resultats equiparables amb una bona correlació entre els dos tipus de comptatge (en el review de Möller et al.2000 també ho citen), i inclús comenten la manera d'interconvertir els resultats i expressar-los de manera equivalent en els dos casos (Collins et al. 1997b-2000; Angelis et al.1999).

Varis autors, presenten la problemàtica de la variació intra-individual dels resultats en treballs realitzats amb limfòcits (Mckelvey-Martin et al. 1993; Ross et al. 1995; Holz et al. 1995; Collins et al.1997a,b; Šalagovič et al.1997; Hellman et al.1997; Rojas et al.1999; Möller et al.2000, etc..) en mostres recollides en diferents moments del mateix individu. Molts paràmetres poden afectar la resposta dels limfòcits a l'assaig en termes de capacitat de detecció del dany. Un exemple podria ser una variació fisiològica, l'exercici físic (Hartmann et al 1995, Rojas et al.1999), que podria fer variar l'estat oxidatiu de l'organisme, o l'augment d'estrès oxidatiu degut a una infecció, o el canvi de l'estatus d'antioxidants induïts per la dieta, etc... (Collins et al. 1997b; Gutiérrez et al.1998a). Hi ha una sensibilitat de les cèl·lules sanguínies a l'estat físic, fisiològic i nutricional que podria donar en part aquestes variacions, una altra part podria ser deguda a l'atzar. Aquests autors també presenten el fet de variacions inter-individuals importants, quan es treballa amb mostres de sang, que pot ser degut a aquests mateixos factors, les característiques del donant, l'edat, si són fumadors o no, i molts altres paràmetres, com també, diferències en la reparació, etc... (Collins et al.1997b; Gutiérrez et al.1998a,b; Rojas et al.1999; Möller et al.2000; etc...). Així hi hauria una sèrie de factors que influïrien en la detecció del dany al DNA pel comet test en cèl·lules sanguínies humanes. L'avaluació del dany al DNA en altres tipus cel·lulars pot mostrar menys heterogenitat (Mckelvey-Martin et al.1993).

Però en quan a la reproductibilitat del test, és bona. S'han fet diversos experiments en diferents moments amb les mateixes mostres, pel cas de limfòcits, en diferents electroforesis, en diferents portaobjectes, o en diferents gels en el mateix porta, utilitzant duplicats i replicats de les mostres, i es va observar que la correlació és bona en tots els casos (Collins et al.1997b). Holz et al.(1995) utilitzant leucòcits mirava la variabilitat dins l'assaig i entre diferents assajos, i la variabilitat intra-individual, i inter-individual, obtenint en el seu cas concret que la variació dins i entre assajos és menor que la intra-individual, essent aquesta última del mateix ordre de magnitud que la inter-individual. Hartmann et al.(2001b), entre d'altres, també parla d'una bona reproductibilitat del test.

Test dels Micronuclis (MNT)

Protocol:

Preparació de les mostres :

- Fer els frotis de sang en portaobjectes ben desengreixats (amb aigua i sabó, etanol de 70°, acetona i deixar assecar a l'aire). Dos portaobjectes per individu .
- Deixar assecar la sang i fixar amb calor (utilitzant la flama d'un encenedor).
- Es poden guardar així molt temps fins el dia que es passa a fer la tinció:

Tinció de sang MayGrünwald-Giemsa :

- MayGrünwald comercial: 3 minuts.
- MayGrünwald amb H<sub>2</sub>O destil·lada (proporció 1:1) : 3 minuts.  
(queda més ben tenyit si es prepara abans la solució, però es pot fer sobre el portaobjectes, tantes gotes d'un i tantes de l'altre).
- Rentat ràpid amb aigua destil·lada.
- Giemsa: 15-20 minuts.  
(una gota de Giemsa comercial per 1ml d'aigua destil·lada . Primer es posa el colorant, després l'aigua destil·lada i es barreja bé).
- Es fan diferents rentats amb aigua destil·lada. Es deixa uns segons l'aigua destil·lada sobre la preparació.
- Deixar assecar. Es pot guardar així la mostra molt temps.

Comptatge:

- Amb el microscopi òptic es passen a comptar 1000 cèl·lules per portaobjectes. (Schmid, 1973).

Un nombre normal de micronuclis, un valor basal de dany, es considera fins a 3-4 micronuclis per mil cèl·lules comptades. A partir d'aquests valors, nombres superiors indiquen una quantitat de dany al DNA causat per algun tipus de tòxic, i aquests a partir d'ara van relacionats amb la quantitat de dany.

Discussió Test dels Micronuclis:

El test dels micronuclis (MNT),( Schmid, 1973; Von Ledebur i Schmid,1973; Borràs 1986; Ashby et al.1990; Tucker i Preston, 1996), s'utilitza des de ja fa molts anys en estudis de genotoxicitat, acceptant-se com a un mètode vàlid en aquest tipus d'estudis. Aquesta tècnica és capaç de detectar, amb un nivell de sensibilitat, de fiabilitat i d'esforç raonables, els compostos clastògens, és a dir, que produeixen fragmentació de l'ADN, així com també els denominats tòxics del fus acromàtic (*spindle poisons*), que impedeixen la correcta separació de les cromàtides.

---

L'assaig es realitza generalment en eritròcits (tot i que actualment s'ha ampliat molt el seu ús en altres tipus de cèl·lules, utilitzant un sistema d'incubació amb citocalasina-B per aturar la divisió evitant la citoquinesi, produir cèl·lules binucleades i detectar així també micronuclis que poden ser induïts per una determinada substància genotòxica, Fenech,1993; Panneerselvam et al. 1995; Van Goethem et al.1997; Garaj-Vrhovac & Kopjar, 1998; Pitarque et al.1999a; Kašuba et al.1999; Fenech et al.1999-2000, Lucero et al.2000,Villani et al.2000 etc...). Els glòbuls rojos, en la majoria dels mamífers (amb l'excepció dels camèlids), sofreixen en les fases finals del seu procés de maduració una extrusió del nucli. Els fragments procedents de l'activitat clastogènica o d'una separació parcialment incorrecta de les cromàtides s'agrupen en cossos esfèrics de mida petita que no són expulsats. Aquests cossos, que es produeixen espontàniament en una porció inferior al tres per mil, són denominats, en condicions fisiològiques, corpuscles de Howell-Jolly. Quan per l'acció d'un mutàgen, aquests cossos excedeixen significativament les xifres considerades normals, constitueixen els micronuclis, el percentatge dels quals es considera proporcional al potencial mutagènic del compost.

El test de micronuclis és típicament usat en moll de l'os. En el cas dels ratolins es treuen els fèmurs, es tallen les epífisis i es passa una solució de sèrum per extreure les cèl·lules de la diàfisi, i després d'unes centrifugacions es fan els frotis, es compten els eritròcits policromatòfils fins a un número de 1000 o a vegades 2000, i es fa la relació sobre ‰ del nombre de reticulòcits amb micronuclis; a vegades es fan els comptatges també dels eritròcits normocromàtics per comparar amb els valors dels reticulòcits perquè interessa veure aquesta relació en cas que s'estigui causant una aplàsia medul·lar. És un bon mètode per a la detecció dels possibles efectes genotòxics a més o menys curt plaç. Tanmateix, un altre sistema permès és la utilització de sang circulant, tot i que pot ser menys sensible, ja que per exemple en rates, la melsa elimina els eritròcits defectuosos, llavors no es troben quasi les formes amb micronuclis en sang circulant; el nostre cas seria diferent ja que pels ratolins estudiats, aquesta eliminació semblaria ser parcial, (Zúñiga-González et al.2000, indiquen que el nombre normal d'eritròcits amb micronuclis en sang circulant varia entre espècies segons l'efectivitat de la melsa, en un estudi realitzat en diverses espècies de rosegadors i altres mamífers, ocells, i rèptils). En un treball similar al nostre (DaSilva et al 2000 a,c) realitzat en *Ctenomys torquatus* en el que a més, fan un estudi comparat dels MN en sang perifèrica i moll de l'os, detecten micronuclis en sang circulant, però en menor quantitat que en moll de l'os; expliquen aquesta diferència per la destrucció no total dels eritròcits amb MN en la melsa. Com ja he dit, però, el MNT és un sistema menys sensible a l'utilitzar sang circulant, però útil.

El comet test pot detectar molt ràpidament efectes deguts a l'exposició de substàncies tòxiques a nivell del DNA, de manera molt sensible i a molt curt termini, perquè pot trobar aquests efectes en forma de trencaments de cadena abans de ser reparats o durant la reparació, essent molt útil en treballs de laboratori per a testar la genotoxicitat de determinades substàncies. El MNT en moll de l'os, en l'anàlisi dels eritròcits policromatòfils, també és una mesura relativament ràpida, a curt plaç, per aquest tipus d'experiments. Si considerem que el MNT en sang circulant, detectaria una mica més tard els efectes d'una exposició d'aquest tipus, ja que cal que es donin les mutacions als eritròcits joves, i passa un temps fins que arriben a la sang; en el cas de la detecció d'uns determinats efectes d'una exposició puntual, també s'ha de tenir en compte la durada de vida d'aquests eritròcits. Tanmateix, a diferència dels experiments en laboratori en que s'exposen els animals a unes determinades substàncies

durant uns temps establerts i a unes dosis concretes, a l'examinar una exposició crònica d'una certa contaminació en individus d'aquesta espècie, (com és el cas del nostre estudi), per als dos tests, (MNT i SCGE en sang perifèrica), semblaria que es poguessin trobar cèl·lules danyades o afectades al llarg de la vida dels animals, i així poder avaluar uns efectes de l'exposició més o menys continuada a la contaminació. Cal però tenir amb compte el fet que és un estudi en el medi ambient, i gens controlat, i en el que molts altres factors poden intervenir, i altres mecanismes dels animals, (mobilitat per a esquivar les zones contaminades, sistemes corporals de defensa, habituació, etc...).

Moltes vegades les mostres de frotis eren molt brutes i costaven molt les lectures del MNT, el que faria pensar en la possibilitat d'uns resultats una mica esbiaixats. Tanmateix pot quedar més o menys solventat pel fet de llegir també els duplicats, de comparar amb el control (totes les mostres són tractades i llegides en igual condicions) i el fet que, quan les mostres tenen micronuclis degut a una exposició a un genotòxic, es solen veure molts micronuclis i és evident la diferència entre les altres mostres, (com en el cas dels frotis de la zona B), i cal indicar també que les lectures es feien a cegues, sense conèixer quina mostra era, i es van fer repeticions dels comptatges obtenint els mateixos valors per mostra. De tota manera, actualment, en estudis amb el MNT, en ocasions determinades, com en el cas d'animals salvatges també, hi ha autors que intenten utilitzar un altre tipus de tinció més específica per a DNA (colorants fluorescents; ex: *Crest staining*, Degraasi et al.1999), en comptes de May-Grünwald i Giemsa utilitzats en aquest treball, per a visualitzar millor els possibles micronuclis. En aquest cas ha semblat prou adequada la tinció, malgrat els problemes de lectura, i potser per un altre cop s'intentaria aplicar, almenys a efectes de comparació, una d'aquestes modificacions del MNT amb altres colorants que pogués mostrar millor els micronuclis.

El test dels micronuclis i el SCGE es basen en principis diferents i detectarien coses diferents, resultant potser, més sensible el comet test (DaSilva et al.2000a) en segons quins estudis o depenent del que es vol detectar; el MNT, però compta amb el reconeixement i estandardització de la tècnica des de fa anys, i tot i que pugui ésser menys sensible en aquest cas presentat per aquest investigador, pot ésser molt vàlid en nivells elevats de contaminació.

---

1.1.c. Resultats:

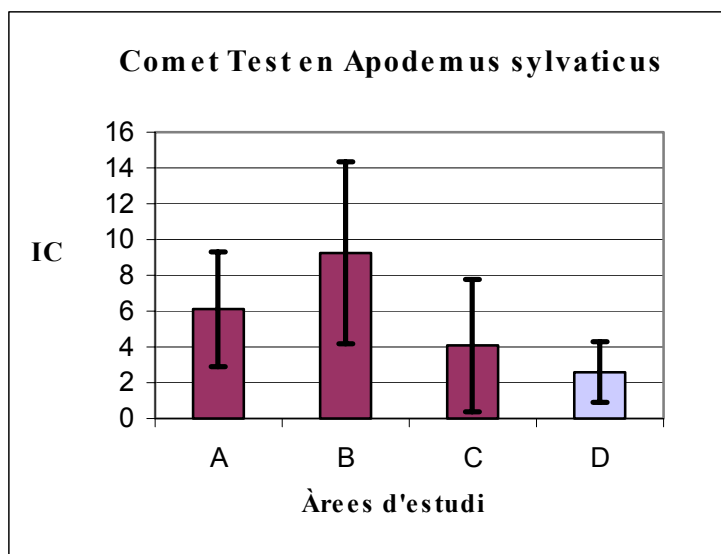
Taules i gràfics dels resultats obtinguts amb la tècnica del Comet test:

**Taula 1.1.1.** Comet test en sang circulant d'*A.sylvaticus* en les diferents àrees d'estudi:

Àrea d'estudi	n	Mitjana IC $\pm$ SD
A	25	6.11 $\pm$ 3.2
B	15	9.26 $\pm$ 5.1
C	15	4.08 $\pm$ 3.7
D	13	2.59 $\pm$ 1.7

A: dalt de tot de l'abocador; B: sota la bassa de lixiviats;  
 C: 2km riera avall; D: zona control.  
 IC: índex de comet; SD: desviació estàndard;  
 n: nombre d'animals

**Fig.1.1.3.** Gràfic del Comet test, representant els valors de la taula anterior:





**Taula 1.1.2.** Comet test: Test de Kruskal-Wallis (Anova no paramètrica). Comparació múltiple de Dunn dels resultats de la taula 1.1.1:

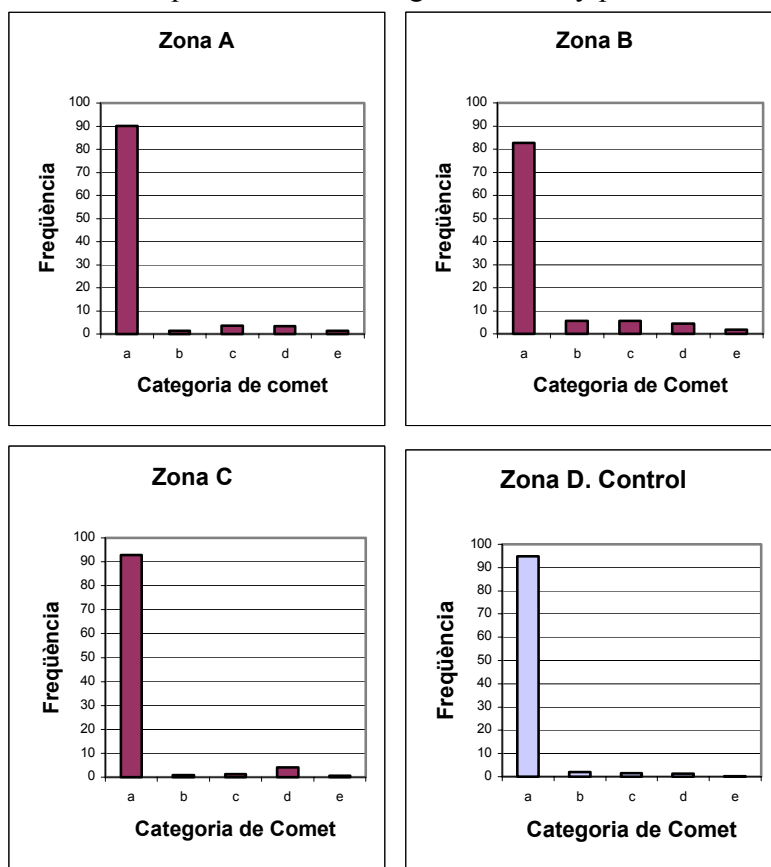
Comparació	Significació
B vs A	ns
B vs C	*
B vs D	***
A vs C	ns
A vs D	*
D vs C	ns

ns: no significatiu ( $p > 0.05$ ); (\*): $p < 0.05$ ; (\*\*): $p < 0.001$ .

SCGE: El valor d'IC del gràfic (Fig.1.1.3) i la taula (1.1.1) és justament la mitjana dels valors de l'índex de dany (que he anomenat "Comet Index") per a tots els animals de cada àrea.

Seria doncs, la mitjana dels índex de dany (IC) que corresponen a les freqüències de cada categoria de dany multiplicada pel seu coeficient assignat, i tot sumat per a cada individu:  $\{(n^{\circ}a) \times 0\} + \{(n^{\circ}b) \times 0.25\} + \{(n^{\circ}c) \times 0.5\} + \{(n^{\circ}d) \times 0.75\} + \{(n^{\circ}e) \times 1\}$ .

**Fig.1.1.4.** Distribució de freqüències de les categories de dany per a cada zona d'estudi:



Vull recordar en aquests gràfics, que l'augment de dany al DNA incrementaria d'esquerra a dreta, essent la categoria "a" sense dany, fins a la categoria "e", la de major dany.

Comet test:

Tot i que no hi ha quasi diferències significatives entre les tres zones pertanyents a l'abocador, es pot veure una clara tendència decreixent dels valors del SCGE que indicarien el possible efecte de la contaminació de tipus genotòxica, de més gran en la zona B (sota la bassa de lixiviats) amb un valor de 9.26 (Taula 1.1.1, Fig.1.1.3), considerada la més contaminada, seguida de la zona A (a dalt de tot de l'abocador) amb un valor de 6.11, fins la zona C (a uns 2 km riera avall després de la bassa de lixiviats) de menor valor 4.08, on suposadament ja no arribarien tant els tòxics. Sí es pot observar de manera marcada la diferència entre els valors de les zones afectades per l'abocador (A,B,C) i les zones control(D), essent més elevats els primers. Trobem diferències significatives entre les zones A i B respecte les control (D), com seria d'esperar ja que es pot considerar que serien les zones més influenciades pel possible efecte contaminant de l'abocador, mentre que la zona C, correspondria a l'àrea d'influència més allunyada de l'abocador, i es pot observar un valor més pròxim i no significatiu estadísticament, si bé que superior, a l'àrea control D, (amb un valor de 2.59); això ens indicaria que a mesura que ens allunyem de l'abocador els valors són més similars als control, zona lliure de contaminació.

En la Fig1.1.4, es pot veure la distribució de les categories de dany. Essent les freqüències més elevades a les categories de més dany (b,c,d,e) en la zona B que en les altres zones, indicant-nos un dany superior en aquesta zona. Si ens fixem en la zona control es pot veure que manca la categoria "e" (la de major dany) a diferència de la resta d'àrees d'influència per l'abocador.

El que sí podem observar és una desviació estàndard elevada en totes les zones. Varis autors han comentat una variació inter-individual a vegades elevada en els resultats del SCGE en la mesura de la genotoxicitat. De tota manera, en aquest cas, podem veure una diferència de valors de SD, essent més alts en les àrees d'influència de l'abocador que en el control, això indicaria una variabilitat inter-individual superior en les zones on s'ha observat més dany al DNA i per tant que es poden considerar de major contaminació de tipus mutàgen. Això s'explicaria en el fet que cada individu pot respondre de manera diferent a un determinat tipus de contaminació, considerant també els mecanismes de detoxicació que tenen, que es poden desencadenar de manera diferent en els diferents individus, així com també els mecanismes de reparació. Però, en termes generals, s'ha de tenir en compte i considerar que segons el seu règim alimentari i de vida, pot portar moltes diferències a l'hora de la seva exposició a aquestes substàncies mutàgenes. Com també la distribució i biodisponibilitat del contaminant al medi ambient pot ser molt irregular i diferent, cal recordar que aquest sistema de mesura seria molt indirecte dins un sistema molt complex.

Taules i gràfics dels resultats obtinguts per al Test dels Micronuclis:

**Taula 1.1.3:** Mitjanes dels valors de nº de Micronuclis per zona estudiada:

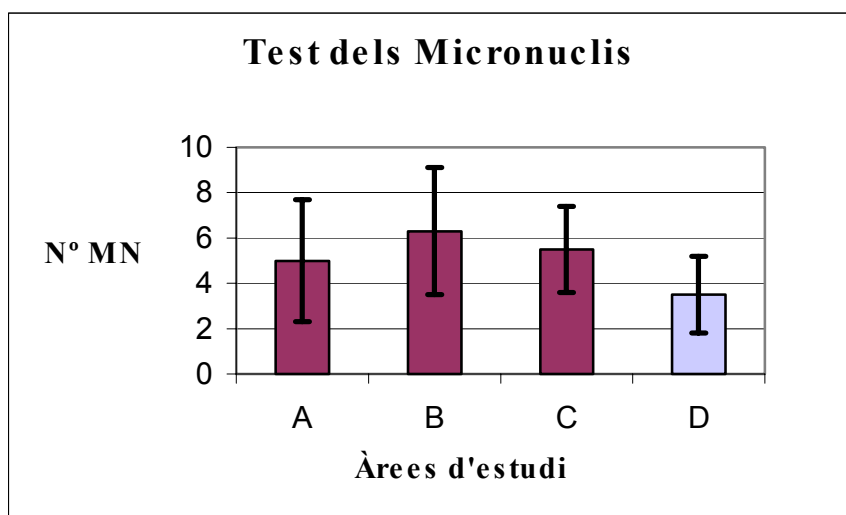
Àrea d'estudi	n	Mitjana ± SD
A	25	5.0 ± 2.69
B	15	6.3 ± 2.79
B*	9	6.4 ± 2.40
C	12	5.5 ± 1.93
D	13	3.5 ± 1.70

n: nº de mostres. SD: desviació estàndard

Les àrees d'estudi, així com els individus són els mateixos que en el cas del Comet Test.

B\*: són mostres recollides a la zona B, l'any 98, abans de la construcció de la segona bassa de lixiviats, no hi ha dades per al comet test ja que eren els principis de posada a punt de la tècnica i no es consideren vàlids, per això no s'han inclòs en la taula 1.1.1.

**Fig. 1.1.5.** Gràfica dels resultats obtinguts per al test dels Micronuclis en les diferents àrees d'estudi:



**Taula 1.1.4:** Test dels Micronuclis. Anova; comparació múltiple de Tukey-Kramer:

Comparació	Significació
A vs B	ns
A vs C	ns
A vs D	ns
B vs C	ns
B vs D	*
C vs D	ns

ns: no significatiu( $p>0.05$ )

(\*):  $p<0.05$

Els valors anomenats mitjanes a les gràfiques són el valor mig (del nº d'eritròcits amb micronuclis trobats per cada 1000 cèl·lules comptades) de tots els individus de cada zona.

Tal com indiquen les taules una vegada més tindriem que, encara que no hi ha estadísticament diferències significatives entre les diferents zones, es pot observar una tendència a presentar valors diferents. Així doncs, el de la zona control D (3.5; taula 1.1.3) seria el més baix en comparació amb les zones d'influència per l'abocador (àrees: A=5; B=6.3 i C=5.5), en els que es manifesta valors molt iguals entre ells, destacant però un cop més, el més alt en la zona considerada més contaminada, la B, amb diferències significatives entre aquesta zona i la control amb una  $p<0.05$ .

En aquest cas les zones A i C tindrien resultats molt similars, molt més similars que no pas els obtinguts amb el comet test.

Podem observar una altra mesura feta en la zona B, (marcada com a B\*), sota la bassa de lixiviats, a l'any 98, just abans de la construcció de la segona bassa de lixiviats, resultats dels quals no podem comparar amb els del SCGE ja que s'estava tot just posant en marxa la tècnica i s'han descartat els valors obtinguts, considerats erronis. Comparant doncs els resultats del MNT en les mostres de l'any 98 (B\*) i les de l'any 99 (B), es pot observar que el nombre de micronuclis en els dos casos són els mateixos pràcticament ( van de 6.4 a 6.3 respectivament).

Si afegim als valors de MNT de la zona C, els d'unes captures realitzades de les que es van descartar els resultats per al comet test degut a problemes en la realització d'aquest, trobem que aquest valor de 5.5 per a 12 captures (taula 1.1.3) augmentaria fins a 6 per a 20 captures (resultats no inclosos en la taula 1.1.3). En aquest cas tindriem un valor superior en aquesta zona situada 2km riera avall de la bassa de lixiviats que en la zona A de dalt de tot de l'abocador (amb una quantitat de 5 en 25 captures), cosa que ens indicaria una tendència diferent als resultats obtinguts pel comet test. I aquest valor s'acostaria molt a l'obtingut en la zona B, de la bassa de lixiviats (6.3 en 15 animals), la suposada zona més contaminada. De tota manera seria millor poder comparar amb el mateix nombre d'individus en cada cas, i per a les dues tècniques, perquè podria influir una mica, tractant-se de diferències tan petites entre els diferents valors, ja que hem observat per exemple, una variació bastant gran en el SCGE entre individus.

En el cas dels micronuclis, al mirar les desviacions estàndards es pot observar valors menors de variabilitat inter-individual que en el cas del comet test, i una petita diferència amb els de la zona control, en la qual seria més baixa la variació. Indicaria que aquesta tècnica tot i estar sotmesa a les mateixes condicions de variabilitat ambiental i de dieta de cada individu, mesura de diferent manera la genotoxicitat i en un altre tipus cel·lular que el SCGE, també és conegut que els agents mutàgens tenen preferències per teixits diana, i en aquest cas, podria afectar de manera diferent als diferents tipus cel·lulars; de tota manera, són dues mesures diferents de la genotoxicitat. També cal tenir en compte que segurament, tant per un tipus d'assaig com per l'altre, els valors variarien una mica si tinguéssim un nombre més gran d'exemplars.

Comparació del MNT i SCGE:

Si es compara els resultats del dos test en una recta de regressió lineal, ens dóna un coeficient de correlació  $r = 0.836$ , es pot considerar una correlació molt bona tot i tenir en compte la diferència en quan a sensibilitat dels dos assaigs, i el fet que es realitzen en diferents tipus cel·lulars i mesuren de manera diferent la genotoxicitat de tipus clastògen.

Ara bé, si es fa la comparació considerant les dades aparellades, és a dir comparant els valors obtinguts segons els dos tests per a cada individu, la correlació no és tan bona. Pot ser degut, com ja he anomenat, al diferent sistema de mesura dels dos assaigs. En la taula següent es mostra aquesta comparació:

**Taula 1.1.5** : Comparació de resultats de SCGE-MNT:

Àrea d'Estudi	n	r	SD
A	25	0.19	3.2
B	15	0.58	4.3
C	12	0.06	3.9
D	13	0.49	1.5

#### **1.1.d.Discussió:**

El *Comet Assay* és un test molt sensible ràpid i relativament econòmic. La seva sensibilitat es basa en que és capaç de detectar baixos nivells de dany al DNA (Tice et al.2000); es poden dur a terme estudis amb relativament petites quantitats de substància problema, es requereix un petit nombre de cèl·lules per mostra, és de fàcil aplicació, flexibilitat, etc.... És un test realment molt útil i molt usat actualment en la mesura a curt termini de l'efecte genotòxic d'algunes substàncies mutàgenes. Els danys al DNA a curt plaç, poden ser en gran part reparats, detectant així menys dany amb el comet test segons el temps que faci que s'ha donat l'exposició al genotòxic, en molts casos s'utilitza justament la mesura de la reparació, que pot ser detectada en aquest test en forma de trencaments de cadena, com a sistema indirecte del dany causat per una substància, i es pot mesurar al cap d'un temps més llarg per a veure l'eficiència de la reparació.

En l'estudi que nosaltres proposem es tractaria d'una exposició a més llarg termini, i per tant, no estariem parlant sols de la detecció de mutacions espontànies que poden ser reparades en un determinat temps que pot ser relativament curt, sinó d'una exposició de llarga durada i amb conseqüències ja d'acumulació de mutacions que no han estat reparades o que han estat mal reparades, tot i que no deixa que es pugui detectar al mateix temps efectes deguts a una contaminació puntual, o hi hagi algun altre paràmetre que els hagi pogut produir en un moment molt concret.

Ja s'havia comentat anteriorment el que es podrien considerar com a complicacions en la sensibilitat del test per aquest estudi, en varis aspectes: com seria la variació inter-individual (comentada per varis autors, Gutiérrez S. et al 1998a; Collins et al.1997b, etc...), encara que ja és conegut que hi ha una variació a nivell individual pel que fa a la resposta vers els diferents tipus de contaminació, a la reparació i a tot tipus de condicions del medi. Una altra problemàtica d'aquesta sensibilitat seria que podríem estar detectant danys al DNA amb aquesta tècnica deguts diferents tipus d'alteracions puntuals i momentànies que serien reparades ràpidament i que emascararien els resultats, serien per exemple causades per una infecció a l'animal en aquell moment, o per un excessiu esforç o per estrès; són condicions de l'estat de l'animal en el precís moment de la captura i que podrien fer variar els resultats, ja que per exemple els limfòcits es poden alterar molt fàcilment per diversos factors (com comenta Rojas et al.1999 per a limfòcits humans; Gutiérrez et al.1998a, indica la possible sensibilitat de les cèl·lules sanguínies a l'estatus físic, fisiològic i nutricional de l'individu), i podrien ser detectats pel comet test. De tota manera aquest punt podria quedar més o menys resolt amb la comparació amb els controls que haurien estat en les mateixes condicions de captura.

La zona B, que és la zona de mostreig de just sota la bassa de lixiviats, (la 2<sup>a</sup> bassa). Com ja he comentat anteriorment, quan es van començar les captures l'any 1998 per a les primeres proves de posada a punt de la tècnica del comet test, només hi havia una bassa, i la segona estava en construcció, però en els mostresjos dels següents dos anys, que són amb els que realment es va fer l'avaluació de la possible contaminació genotòxica, ja hi havia aquesta segona bassa construïda i en funcionament. De tota manera, la zona de mostreig va ser la mateixa, des de la bassa fins varis metres riera avall, ja que és la que considerem la zona més contaminada, degut a que cada cop que hi ha hagut una pluja forta s'han pogut escapar els lixiviats de la bassa, i fins i tot escombraries procedents de l'abocador que anirien riera avall. Tot i que és un sistema molt controlat, al anar caminant seguint riera avall, es pot veure que està tota plena de plàstics i de tot tipus de deixalles. Encara que en els darrers temps s'ha pogut observar una millora, almenys visualment.

Cal recordar que els lixiviats són unes aigües residuals que es recullen de totes les substàncies de l'abocador que van colant-se cap avall, junt amb les de l'aigua de pluja que penetra per tot l'abocador i en fa augmentar el volum, més l'aigua de pluja que baixa pels voltants d'aquest i que també és canalitzada cap a la bassa (en el cas que no hi hagi una bassa de recollida d'aigües seminetes), concentrant així una gran quantitat de substàncies tòxiques diverses (entre les quals pot haver molts mutàgens potencials) procedents de les pròpies deixalles de l'abocador o del seu procés de degradació. Aquests lixiviats s'han de tractar i es tracten, en una planta especial de tractament d'aigües residuals. S'ha de tenir amb compte, però, que quan hi ha escapaments de lixiviats degut al gran volum provocat per una forta pluja, aquests poden

quedar diluïts. La manera com els contaminants arriben a la terra i després a les plantes i com es distribueixen o mobilitzen en el medi, és complexa, hi pot haver dilucions, i cal a més comptar en que tant els animals com vegetals tenen sistemes de destoxicació. Seria important considerar el règim de pluja, i la seguretat en la correcta impermeabilització de l'abocador i la no percolació dels contaminants cap a les capes freàtiques. Això ja estaria indicant que el tipus de contaminació que intentem veure, no és de tipus puntual en un moment temporal concret, sinó una exposició a llarg termini de tots aquests possibles contaminants, i de fins a on pot arribar el seu efecte, en el sentit que, aquestes aigües baixen riera avall, i aquesta va a parar al final, al mar. No sense tenir en compte que en el seu camí alimenta, o rega tot un seguit de plantes i zones, on hi ha no sols els animals salvatges, habituals de la zona, que se n'alimenten sinó també ramats que hi pasturen, àrees de conreu i zones de vivendes, encara que a una distància considerable de l'abocador, pot ser una zona influenciable per aquest. Un altre tipus de contaminació important en aquest cas són també les olors i l'elevada temperatura a les zones del voltant de l'abocador, queden també canalitzades a la riera, afectant totes aquestes zones, però aquest tipus de contaminació no és el nostre objectiu d'estudi en aquest moment.

S'ha suposat doncs, que aquesta àrea (B), més propera a l'abocador i just a sota la bassa de lixiviats, seria la zona més afectada per la contaminació. La que hauria estat exposada més vegades i en més altes concentracions a les aigües que contindrien els tòxics. Segons els resultats del comet test, fent la mitjana dels índex del comet de totes les mostres de la mateixa zona que ens indicaria el dany en aquesta zona, dóna el valor més elevat comparant-lo amb les altres zones de l'abocador A i C, i amb el control D. El mateix resultat es dóna amb el test dels micronuclis, en el que també aquesta zona és la que ens indica més alt valor de contaminació. (Taules 1.1.1 i 1.1.3).

De la mateixa manera s'ha vist en els dos tipus de test, que les àrees pertanyents a l'abocador tenen valors més alts que l'àrea control, això ens indica d'alguna manera que el fet de viure al voltant d'aquesta zona d'influència de l'abocador, afecta d'alguna manera als ratolins, provocant-los un índex de mutació (dany al DNA) més elevat que els de la zona control. El fet que s'hagi vist amb dues tècniques diferents dóna més credibilitat al resultat, i més tenint en compte que el test dels micronuclis és un test de genotoxicitat ben establert des de fa anys. Tot i així, caldria fer un estudi més a fons, utilitzant varis tipus de tècniques (per a complementar i mesurar diversos tipus de dany), però aquest treball ens serviria com un primer *screening* de la situació de la zona.

En el cas del Comet test ens trobem que la zona de dalt de tot de l'abocador (A) té un valor més elevat que la zona (C), i menor que la B (bassa de lixiviats). Els animals que viuen en aquesta part, a dalt de tot de l'abocador, mengen les plantes dels voltants de l'abocador, i els insectes del mateix lloc, que estan exposats a les escombraries "fresques", i a on a més, la terra que hi ha és nova i neta, la van dipositant per a tapar les deixalles, i les plantes haurien d'arribar a més profunditat per a arribar als contaminants, llavors tampoc pot ser tant gran l'efecte. Sí es va poder observar però, que els ratolins d'aquesta zona (A), eren més grans de mida que els de les altres zones, això ens faria pensar que possiblement allà no tenien cap problema per a l'obtenció de menjar ja que potser baixarien a l'abocador a alimentar-se, i això podria provocar aquest petit valor més elevat que la zona C, tot i que no presenten diferències significatives. El valor de la zona C, és el menor de les tres àrees d'influència de l'abocador estudiades, i similar al

---

control, això ens indicaria que a aquella distància de l'abocador no arriben tant aquests tipus de contaminants. Amb el test dels micronuclis, els resultats en aquestes dues zones (A-C) són molt i molt similars (una mica més elevat per C), sense diferències significatives tampoc. Excepte si considerem els valors del MNT (que no estan inclosos en la taula 1.1.3, però sí comentats al apartat anterior 1.1.d), llavors tenim un valor més elevat en la zona C i similar a la zona més contaminada(B). Ja he comentat, però, que haguera estat interessant poder-ho avaluar en un nombre més similar d'individus per a cada zona.

Caldria tenir present per això, diverses coses:

Aquest tipus de contaminació és molt complex, i aquest sistema de mesura seria bastant indirecte, tenint en compte que el ratolí de bosc ha de menjar plantes d'aquesta zona, i potser hagi pogut beure aigua d'alguna bassa que hagués quedat al sòl, i aquesta planta ha d'haver recollit a través de les arrels el contaminant i acumular-s'hi, o els possibles insectes que serien part de la dieta dels ratolins també.

Aquestes tècniques mesuren mutacions puntuals, de tipus clastògen, però no altres tipus de mutacions (encara que en el cas del comet, pot detectar altres tipus de mutacions que causarien llocs alcalino-làbils, que a pH elevats com els que es donen en aquesta tècnica, es convertirien en trencaments i serien detectats; es podien haver utilitzat enzims com la Endonucleasa III o la FPG; Rojas et al.1999; Collins 2000; Tice et al.2000, per detectar també altres tipus de mutacions, de tipus oxidatiu; però a més, podria estar detectant trencaments deguts al procés de reparació del DNA), llavors es pot considerar una mesura bastant concreta i petita d'un sistema molt complex, i caldria una bateria de test, no n'hi ha prou amb dues tècniques, encara que el MNT sigui tan ben establert des de fa anys, per a una valoració exhaustiva, però sí ens ha pogut servir, com a una primera ràpida observació de l'estat d'aquests animals, per a poder continuar en la investigació d'aquesta contaminació posteriorment.

Una altra observació, és que no es corresponen els valors per a cada individu del comet test amb el del test dels micronuclis (Taula 1.1.5), però això és degut a que mesuren coses una mica diferents, i que en el test dels micronuclis mirem els eritròcits mentre que en el SCGE mirem la línia leucocitària, pràcticament limfòcits. Altres autors han trobat diferències entre els resultats dels dos test també (Vrzoc & Petras, 1997; Gutiérrez et al.1998a; Pitarque et al. 1999a; DaSilva et al.2000a, Villani et al.2000). Vrzoc & Petras mesuren els eritròcits pel cas del MNT i limfòcits en el SCGE, podent ser la causa de les diferències; en el cas de Gutiérrez i Pitarque mesuren limfòcits binucleats pel MNT, i la línia leucocitària pel SCGE, aquest fet pot estar relacionat amb les diferències també; Kassie et al.(2000) indiquen com a una part de les diferències que pot haver entre els tests, els diversos tipus cel·lulars utilitzats per a cada assaig. Així, com ja s'ha comentat, això s'explicaria degut a que mesuren diferents coses, de manera diferent, i en aquest cas, en cèl·lules diferents. Un estudi de Hartmann et al.(2001a) en que vol provar el SCGE com a un test per a un *screening* rutinari de noves substàncies químiques a nivell industrial, realitzat en cèl·lules V79 de hamster xinès, compara aquest test amb el MNT i en ocasions amb el test d'Ames, obtenint un alt grau de concordància entre els resultats del MNT i SCGE. Sasaki et al.(2000) també troben algunes correlacions, entre el SCGE i el MNT i test

---



d'Ames, per a algunes de les substàncies provades, en la valoració del comet test com a test de genotoxicitat en l'avaluació de substàncies carcinogèniques.

En aquest experiment el que preteníem era la valoració de l'efecte de l'abocador a nivell genotòxic en el ratolí de bosc, utilitzant dos test de genotoxicitat, amb l'aplicació més novedosa del SCGE en aquest àmbit i un altre més considerat en aquests tipus d'estudis (MNT), però al mateix temps que ens servís aquest últim per a validar el SCGE, tot i que, al mesurar coses diferents, es poden també complementar en aquest sentit, tal com suggereixen Van Goethem et al.(1997) i Zhong et al.(1999), on comenten la utilitat de la valoració del dany al DNA utilitzant el SCGE amb combinació amb el MNT per a investigar els possibles mecanismes de components genotòxics. És així, millor la utilització dels dos mètodes alhora. D'altra banda, en aquest cas trobaríem una correlació bastant bona en general, sense mirar d'individu en individu, entre els dos test ( $r=0.836$ ).

Com ja havia comentat abans, la sensibilitat dels dos test depèn en part també del nombre d'individus, així doncs amb un nombre més elevat de mostres, augmentaria la sensibilitat d'aquests, els resultats podrien potser ser més clarificadors, o no, en trobar més semblances entre les zones A i C per exemple o més diferències. Volia comentar però, respecte nombre d'animals mostrejats, que no sols es volia un nombre mínim suficient per a aconseguir una primera avaluació de l'estat del medi ambient a nivell d'efectes genotòxics, sinó alterar el menys possible l'ecosistema capturant el menor nombre possible d'individus. Per altra banda, les sortides requerides per aquest propòsit i el temps de dedicació va ser molt elevat, degut a que el nombre d'animals obtinguts en cada mostreig era molt menor al que s'esperava, atribuïble a un possible descens temporal en la població d'aquesta zona durant aquests períodes de captures, segurament degut a la climatologia (sequera, règim de pluges, etc..) o algun altre factor ambiental.

---

### **1.1.e. Conclusions**

Així doncs, les nostres hipòtesis inicials es complirien:

1. *Apodemus sylvaticus* indica ser una espècie útil com a biomarcador de la contaminació de tipus genotòxic en un abocador, concretament el del Garraf.
2. Es veuen resultats diferents entre les zones afectades per l'abocador i les zones control, tant amb el MNT com amb el SCGE, trobant valors més elevats de lesions al DNA en les zones afectades per l'abocador, zones que es consideren contaminades.
3. Les mostres recollides més properes a la bassa de lixiviats, que seria la zona de major contaminació estudiada, mostren valors de genotoxicitat majors (tant pel SCGE com el MNT) que les altres zones més allunyades, en les que s'acostarien més als valors control, però essent majors que aquest.
4. Els dos tipus de test han mostrat ser útils per a un primer *screening* de l'estat de contaminació per substàncies de tipus mutàgen en el medi ambient. Contaminació que provindria d'un abocador de residus urbans en aquest cas.

### **Suggeriments:**

A partir de totes les observacions, millores de la tècnica, suggeriments, nous articles i treballs, col·laboracions amb altres investigadors, proves realitzades i experiència adquirida durant tot aquest temps:

- . Si es tornés a fer un estudi similar s'utilitzaria una quantitat menor de sang per a la tècnica del Comet test.
  - . S'utilitzarien enzims com l'Endonucleasa III i el FPG en la realització del Comet Test per detectar més tipus de dany al DNA, mutacions de tipus oxidatiu i altres alteracions de les bases. Farien més sensible el test. (Es podrien detectar altres tipus de danys, més concrets, que potser ens podrien ajudar a informar de la presència d'alguna substància mutàgena determinada).
  - . Caldria una bateria de test, no sols per a validar el comet test sinó també per ampliar la detecció d'altres tipus de mutacions que es podrien donar en aquest tipus de contaminació, ja que hi pot haver moltes diferents mutacions que podrien no ser detectades.
-

Es realitzaria l'assaig del comet test en plantes de la zona, i també el MNT, el seu anàlisi serviria per a donar una idea de la possible influència de l'abocador a nivell genotòxic en altres nivells de l'escala tròfica, com també es podria pensar en realitzar el test en altres tipus d'animals que visquin en la zona. Analitzar mostres de terra, fer anàlisi d'aigües, mirar metalls pesants en les plantes i animals, etc... Si es pensés en una ampliació dels tests en que calgués el sacrifici de l'animal, es podria aprofitar per extreure mostres de diversos òrgans per a un estudi histològic i al mateix temps dur a terme el comet test per analitzar els diferents teixits: fetge, ronyó, cervell, etc.. serien òrgans molt interessants; també es podria realitzar algun test de genotoxicitat en cèl·lules germinals dels ratolins, per a completar l'estudi i veure com afectaria a nivell reproductor i de la descendència. Es podria realitzar l'experimentació a diferents èpoques de l'any, relacionant-lo amb els períodes de pluges, etc... Hi hauria una llarga llista de possibilitats per a la realització d'un estudi més complet. Tanmateix, per al primer *screening* de la situació, ens ha servit els mètodes utilitzats i les mostres analitzades.

**Annex1.1.1:****Fig.1.1.6.** Exemple de trampa Sherman utilitzada per a la captura dels ratolins:

Fig.1.1.7. *Apodemus sylvaticus*



Fig.1.1.8. Imatge de la bassa de lixiviats.



**1.2. ABOCADOR GARRAF – ALLOLOBOPHORA CALIGINOSA**

**Avaluació de la possible contaminació de tipus genotòxic causada per l'abocador de Garraf, en lumbrícid (*Allolobophora caliginosa*) exposats en mostres de terra del mateix.**

**1.2.a. Introducció:**

L'estudi de la contaminació del Medi Ambient és molt ampli i complicat, hi ha molts factors que hi intervenen i tot és un conjunt que està relacionat, moltes vegades resulta difícil estudiar parts per separat, i és més difícil encara interpretar els resultats dels treballs sobre aquest, degut justament a la gran complexitat i que no es pot abastar la seva totalitat. Estudiar tot l'ecosistema seria ideal. El nostre grup de recerca, com ja he comentat anteriorment, es centra en l'ecotoxicitat, això comporta el fet que, moltes vegades s'han de realitzar estudis en varis esglaons de la cadena tròfica, per poder comprendre una mica millor el conjunt i avançar en la interpretació de la complexitat de l'avaluació.

Els cucs de terra, són la biomassa primària en el sòl, la seva excreció i secreció, modifica els components i la matèria orgànica del sòl (Mariño et al.1992), així són importants en la descomposició de la matèria orgànica, per la seva digestió, desintegració, transport, i en l'estímul dels processos de descomposició microbians. D'aquesta manera, els cucs també poden ajudar a afavorir la descomposició de contaminants orgànics, i poden ser d'ajut en les mesures preses per a posar remei en llocs contaminats inorgànicament (Yearley et al.1996). Per tot això, és interessant el seu estudi en àrees contaminades, per a veure l'efecte o l'impacte que causen determinades substàncies contaminants en el medi ambient, la mesura de l'estat de la contaminació, etc... (un exemple és la seva utilització en avaluar la recuperació d'un abocador clausurat, Judd & Mason,1995, entre molts d'altres). Són uns bioacumuladors potencials de metalls pesants i són uns agents de transmissió potencials a la cadena tròfica, per això la importància del seu estudi. Avaluant la concentració de metalls pesants en el sòl, i en cucs, ens indica el risc possible i la transferència a la cadena tròfica d'aquests (Mariño et al.1992).

Autors com Verschaeve & Gilles (1995); Diògene et al.(1997); Burch et al.(1999) entre molts d'altres, han indicat que els cucs de terra són doncs, bons per a la mesura de la contaminació en el medi terrestre. En aquest cas nosaltres centrem l'estudi en el lumbrícid, *Allolobophora caliginosa*, espècie autòctona, àmpliament distribuïda per tota la Península Ibèrica, i molt abundant i resistent, per avaluar la possible contaminació de tipus genotòxic en diferents àrees al voltant de l'abocador de Garraf, aprofitant les característiques d'aquest grup com a bons prospectors del medi terrestre.

---

Dins aquesta mesura de la contaminació en el medi ambient, que pot ser tan àmplia, i sabent que no n'hi ha prou amb la utilització d'una sola tècnica sinó que en caldrien varies per a la realització d'un estudi tan complex, igualment com coneixent que caldria portar a terme aquest estudi en diverses espècies animals i no sols en una, s'ha centrat el treball en tan sols una tècnica, el "Comet Assay", en el que seria l'estudi d'una part molt específica de la genotoxicitat. Es volia un indicador de la genotoxicitat que hi pogués haver al medi ambient, a nivell d'una primera anàlisi per a posteriors investigacions, en el cas que calguessin. Com ja he explicat anteriorment, aquest test és molt sensible i s'ha utilitzat menys freqüentment, en l'estudi del medi ambient en espècies "salvatges", però cada cop va augmentant el nombre de treballs d'aquests tipus en diverses espècies, contaminacions i ambients, adquirint més importància cada cop, i on es pot arribar a veure que realment és una bona eina per a avaluar de manera ràpida la genotoxicitat en el medi ambient (alguns d'aquests diferents estudis en diversos animals estan resumits en els *reviews* de Mitchelmore & Chipman 1998; Rojas et al.1999; Cotelle & Ferard,1999).

La necessitat creixent cada vegada més, de fer els experiments amb mètodes alternatius a l'experimentació animal, ha fet decidir voler provar la idea de fer aquest estudi mitjançant la tècnica del *Comet test* amb la utilització de lumbrícid, idea ja proposada i portada a terme per Verschaeve & Gilles (1995); Hooghe et al.(1995); Šalagovič et al.(1996). Una prova d'aquesta voluntat per avaluar el possible efecte genotòxic causat pels lixiviats d'un abocador, amb tècniques d'estudi de la genotoxicitat, en altres espècies, és el treball fet pels autors Cabrera i Rodríguez (1999) sobre un abocador de Mèxic utilitzant tres tipus de test de genotoxicitat diferents, en plantes, i la seva avaluació per a aquest ús.

A més, *Allolobophora caliginosa* (Savigny,1826), amb els sinònims *Aporrectodea caliginosa* i *Nicodrilus caliginosus*, presenta una sèrie d'avantatges per al nostre treball: és una espècie autòctona de gran distribució i abundància a tota la Península Ibèrica (Trigo et al., 1989; Díaz Cosín et al.1992); té gran resistència i adaptació en varis tipus de sòl; i és molt fàcil reconèixer-la, moltes vegades, a simple vista, característica important a l'hora de treballar amb aquesta espècie. Tot això fa que sigui una espècie ideal en el nostre estudi.

La complicació que hi pot haver en la utilització d'aquesta espècie és que és polimòrfica. Té també moltes varietats ecològiques degut a que hi ha molts clons partenogenètics i això explicaria la complexitat i dificultat taxonòmica. (Bouché,1972). Presenta dues subespècies *A.caliginosa caliginosus* (principalment centroeuropea) i *A.caliginosa trapezoides* (mediterrània), la seva distribució en la Península Ibèrica, seria: la primera més a la regió euromediterrània, com Catalunya, i a les regions pirenaica i cantabro-atlàntica; mentre que la segona es presenta a la resta peninsular, havent zones on coincideixen les dues (Álvarez, 1971). El fet de ser triploide i partenogenètica, podria donar una taxa de mutacions elevada, podria complicar l'estudi, però això pot quedar resolt més o menys amb la comparació de varis grups control, i amb el fet de tenir una colònia establerta al laboratori.

La majoria d'estudis realitzats en laboratori amb lumbrícid es fan amb *Eisenia foetida* o *Eisenia andrei*, una espècie molt fàcil de mantenir en laboratori, amb una taxa de reproducció elevada, en uns dos mesos es pot arribar a duplicar la seva població. Però tot i que és una espècie ben establerta i utilitzada en els laboratoris, no sols en estudis de toxicitat (Walker et al. 1997), sinó també en estudis de tractament dels sòls i d'eliminació de residus orgànics, (com

---

excrements bovins o altres, produint humus i adobs, Elvira et al.1996), i altres estudis, no és una espècie molt abundant a la Península Ibèrica i es va preferir treballar amb una espècie autòctona, més abundant, i més cosmopolita, per apropar-nos més a la realitat del nostre ambient i veure com podia afectar aquest tipus de contaminació a espècies habituals del lloc. *E.foetida* necessita una quantitat considerable de matèria orgànica per a poder viure, i les mostres de terra a les que els sotmetria en aquest tipus d'experiment serien normalment molt pobres, això faria que l'animal pogués patir un estrès enorme fins a adaptar-s'hi o no hi pogués viure, i per tant podria interferir en els resultats del nostre estudi, mentre que per *A.caliginosa* no seria un problema la pobresa de la terra.

Al fer unes proves d'adaptació d'*E.foetida* a aquest tipus de mostres de sòl més pobres pel que és habitual en aquesta espècie, es va veure que a llarg plaç es podien habitar més o menys bé, però trigaven bastant, es retardava tot el seu cicle i necessitaven un aport extern de matèria orgànica per a viure-hi, com podia ser el suplement amb farines de cereals per a infants (Eyambe 1991; Burch et al.1999). Com ja he comentat, molts laboratoris utilitzen aquesta espècie, és molt conegut doncs, el seu cicle, el seu manteniment al laboratori és fàcil, i la seva reproducció és ràpida, etc...En alguns treballs que vam realitzar amb aquesta espècie, vam veure que es podia treure més cèl·lules amb el mateix procediment d'extracció que pel cas de *A.caliginosa*, a més, està més ben establert el protocol per la tècnica i per al seu manteniment en laboratori. Haguera sigut senzill obtenir-ne una quantitat suficient al poder-los comprar i fer criar al laboratori, però es va preferir una espècie que fos més habitual al sòl, amb més possibilitats d'adaptació a diferents condicions i tipus de sòl, més àmpliament distribuïda i que poguéssim utilitzar-la com a indicadora de la contaminació en casos *in situ* també. Tot i que en el nostre treball no s'han recollit mostres de cucs de les zones contaminades per a l'estudi comparat amb els de laboratori en que els hem exposat a les terres contaminades. Tanmateix, dir que *A.caliginosa* és de bon mantenir al laboratori, tot i que el seu cicle sigui més lent, i és al mateix temps, relativament fàcil aconseguir-ne exemplars a la natura.

Hipòtesis:

- S'esperaria trobar diferències entre les zones d'influència de l'abocador i la zona control, essent més elevats els valors per al comet test en les àrees considerades contaminades, indicant així els efectes d'una contaminació de tipus genotòxic a les àrees properes a l'abocador.
  - S'esperaria poder trobar una gradació en la quantitat de dany al DNA en l'espècie utilitzada, essent major quan més a prop de la font de contaminació, i menor quan més allunyats d'aquesta, fins al punt d'assemblar-se a valors control i així mesurar els efectes en la distància, i potser poder veure fins a on arribaria la influència d'aquest tipus de contaminació, en aquest cas, que fos mesurable pel test utilitzat i en els individus estudiats.
  - El comet test en *Allolobophora caliginosa* podria ser utilitzat com a primera avaluació dels possibles efectes genotòxics d'un abocador en el medi ambient.
  - *Allolobophora caliginosa* es podria utilitzar com a bioindicador d'aquesta possible contaminació en el medi ambient.
-

Objectius :

- Posar a punt la tècnica del Comet Test per a treballar amb cucs de terra.
- Aconseguir un grup de cucs de terra autòctons de la mateixa mida i condicions per a l'experimentació.
- Recollir mostres de terra de diverses zones pertanyents a l'abocador de Garraf, a zones d'influència d'aquest, i d'una zona control.
- Avaluar la possible contaminació de tipus genotòxic que hi pugui haver, amb la realització del Comet Test.
- Avaluar la utilització d'aquesta tècnica en aquest tipus d'estudi en el medi ambient.
- Considerar l'experimentació en aquesta espècie per a la seva utilització com a bioindicadora de contaminació.

Pla de treball :

- Aconseguir una espècie abundant, autòctona de cucs de terra per a la realització de l'estudi.
- Un cop trobada l'espècie adequada, aconseguir un nombre suficient d'exemplars, de la mateixa mida i similars en condicions per la realització de l'estudi.
- Ambientació de l'espècie en una terra considerada control.
- Recollir mostres de terra de l'abocador de Garraf i de zones properes considerades àrees d'influència d'aquest:

**Zona A:** a dalt de tot de l'abocador enmig de les escombraries, les quals estan recobertes amb terra de fora d'aquest, és a dir, terra neta.

**Zona B:** Sota la bassa de lixiviats.

**Zona C1:** 1Km sota la bassa de lixiviats, riera avall.

**Zona C2:** 2 Km sota la bassa de lixiviats, riera avall.

**Zona C3:** 3 km sota la bassa de lixiviats, riera avall.

- Recollir mostres de terra d'una zona considerada control. Vall paral·lela a la de la riera de l'abocador (Fondo de can Perers), per tant, zona similar però considerada neta, fora de la influència de l'abocador:

**Zona D**

- Preparació d'una terra estàndard, lliure de contaminants considerada com a un altre control:

**Terra S**

- Exposició dels lumbrícidis durant cinc dies en les mostres de terra d'estudi.
  - Observació al microscopi de fluorescència i comptatges de les mostres en les que s'ha dut el SCGE.
  - Comparació dels resultats amb els obtinguts en les mostres d'*Apodemus sylvaticus*.
-



**1.2.b. Material i Mètodes:**

Mostres de terra:

Les mostres de sòl van ser recollides excavant fins a 20 cm al terra, són mostres superficials. Es van guardar al laboratori en bosses de plàstic.

Àrees de mostreig:

- A : zona de dalt de l'abocador. És una terra dipositada a l'abocador recentment per enterrar les escombraries, i que es podria considerar com a neta al ser "nova" en l'abocador, ja que prové de fora d'aquest. Terra argilosa i de greses.
- B : zona de sota la bassa de lixiviats, a la riera. Terra argilosa.
- C1 : 1 km sota la bassa de lixiviats, riera avall. Terra argilosa i amb pedres.
- C2 : zona a 2 km sota la bassa de lixiviats, riera avall. Terra argilosa i amb pedres.
- C3 : riera avall 3km de la bassa de lixiviats. Zona boscosa i sòl més sorrenc, amb més quantitat de matèria orgànica degut a la vegetació abundant del voltant, sobretot d'arbres. La riera està amb una pendent molt suau en aquest tram i queda molt tapada per la vegetació que l'envolta, no és una zona tan àrida com en les altres àrees (on no hi havia arbres sinó arbustos o matolls), i hi ha les pastures del ramats de xais i cabres.
- D : Mostres de terra de l'àrea control. Zona als voltants d'una riera de la vall paral·lela a la de l'abocador (Riera Fondo de Can Perers). Terra també argilosa. Es pot considerar mostra similar a les mostres B,C1 i C2.
- S : Terra preparada al laboratori i considerada estàndard. Composició: 3 parts de terra argilosa dues parts d'escorça de pi fermentada; l'he anomenada: STD1, pH:7.31).

Els valors aproximats de pH de les terres, són en tots els casos entre 7 i 8 (es poden considerar neutres), essent adequats per la vida dels lumbrícid estudiats.

Les mostres de terra agafades a la zona A, B, C, D, van ser més o menys les mateixes zones d'estudi que per als ratolins, variant una mica A, ja que es va anar una mica més al mig de l'abocador i no als marges com pels *Apodemus*, i la zona D (control), que en el cas dels ratolins, va constar de diverses zones, una d'elles la mateixa zona d'on es treu les mostres de sòl pels cucs. A fi de poder establir alguna relació entre els resultats obtinguts en els dos tipus d'estudi diferents, si és possible. Cal però tenir en compte que les àrees mostrejades pels ratolins eren més grans, pels cucs, només s'agafava mostra de sòl en un punt concret, i així la zona B en ratolins és més àmplia quasi arribant a la zona C1 dels cucs, i la zona C2 dels cucs, seria un punt mig de la gran àrea que abastava l'àrea de C en els ratolins.

Per a l'experimentació :

Es posaren 400 grams de mostra de sòl problema en cubetes de plàstic. Es controlava la humitat per a les diferents mostres de sòl, intentant que fos similar. Les cubetes amb les mostres de sòl es mantenien a temperatura ambient, no es posaven a la nevera ni en cambres especials per a mantenir la temperatura constant, perquè es volia aconseguir que poguessin estar en condicions el més naturals possibles, tot i que el no controlar aquest factor, pot fer que interfereixi en els resultats. Els cucs al estar en mostres tan petites de terra (encara que suficient pel temps en que els hi manteníem i el nombre d'individus que hi habitaven), no tenen oportunitat d'enterrar-se més o menys, però es va mantenir la humitat, i la temperatura del laboratori va ser més o menys constant, llavors es considera que va ser prou adequat. Tampoc no es va voler mantenir els cucs en la foscor constant tancats en una cambra, sinó que es va deixar que poguessin tenir els canvis de llum a foscor, com en condicions naturals. El que es pretenia era acostar-los el més possible a condicions naturals.

En cada cubeta amb 400 grams de mostra de sòl es va posar deu cucs (similars en mida, uns 0.4-0.6 grams per aquest experiment, i en condicions, d'aspecte saludable i sense haver entrat en època de reproducció) durant 5 dies. Es va observar el seu comportament (si s'enterraven, es volien escapar-se, o si processaven la terra, etc...) durant aquest període.

Després d'aquests dies d'exposició al sòl problema es portava a terme el comet test, només en 8, o a vegades 9 dels cucs posats en la terra.

Protocol: Comet Test per a *Allolobophora caliginosa*:

(Modificació del protocol d'extracció de celomòcits donat per l'Eyambe et al.1991; i modificació del protocol per a comet test donat per Singh et al.1988).

. Preparació de la suspensió cel·lular:

- Rentar els cucs amb solució salina a temperatura ambient. (Solució salina donada per Eyambe et al.1991: 0.57g/100ml NaCl, ajustat a 210mOsm segons Diògene et al.1997. pH=7.3). (També es poden rentar amb PBS segons Šalagovič et al. 1996, o amb aigua de l'aixeta segons Diògene et al.1997; però es varen rentar amb solució salina).
  - Posar el cuc sobre un paper humit amb aigua de l'aixeta i fer el massatge a partir de ¼ de la part posterior del cuc per fer que expulsi la matèria orgànica que pugui tenir i així no contaminar o emmascarar la mostra de cèl·lules que s'extreurà.
  - Posar el cuc en un tub de centrífuga, i llavors posar 3ml de líquid d'extrusió (98% de salí, 2.5mg/ml d'EDTA sòdic, 10mg/ml de Guaiacol Glyceril Ether [GGE] i 2% d'etanol absolut) a temperatura ambient i a un pH de 7.3 durant 3 minuts. (Es posa primer el cuc i a sobre la solució perquè no l'afectin tant els vapors de l'etanol, Diògene et al. 1997).
  - Treure el cuc i posar-lo en un tub amb 6 ml de salí+ GGE (salí:0.57g/100ml de NaCl + 10mg/mlGGE) a 4°C i a pH=7.3 durant 6 minuts.
  - Treure els cucs, rentar-los amb salí i tornar-los a la terra.
  - Afegir els dos líquids.
-

- Centrifugar a 500g (~2000rpm) durant 7 minuts.
- Treure el sobrenedant i llençar-lo.
- Afegir 4 ml de salí( sense GGE) a 4°C i pH=7.3 .
- Centrifugar a 500g (~2000rpm) durant 7 minuts.
- Treure el sobrenedant i llençar-lo.
- Resuspendre en 0.5ml de salí (sense GGE).

. Preparació dels portaobjectes:

- S'utilitzen portaobjectes normals esmerilats.
- Es posen els portaobjectes en un recipient amb aigua destil·lada (2/3) i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1/3).
- Es manté bullint entre 30 minuts o una hora . Mai menys de 30 minuts.
- Es deixen assecar a temperatura ambient. Es poden guardar dies així en un recipient tapat.
- Preparar l'agarosa: Agarosa standard de baixa electroendosmosis (D1), (Pronadisa. Hispanlab.ref.8012). Agarosa a l'1%. Es prepara al microones sense que arribi a bullir.
- Es manté l'agarosa al bany maria perquè no solidifiqui, es suquen els portaobjectes a l'agarosa, i s'eixuga, es treu amb un paper l'agarosa d'una banda del porta.
- Es deixen assecar a temperatura ambient.
- Es posen a l'estufa a 60°C durant uns 30 minuts.
- Es poden guardar durant una any en caixes per a portaobjectes.

Aquesta és una de les opcions que s'ha proposat per a poder utilitzar portaobjectes normals sense tots els problemes que comporta els portaobjectes rugosos (Collins 2000, Tice et al. 2000), com és el fet de que incrementen el soroll de fons de les lectures, no es poden reciclar gaires vegades, hi ha més pèrdua de capes i són més difícils d'aconseguir, tot això queda doncs solventat amb la utilització de porteobjectes normals.

. Preparació de les capes d'agarosa i procés:

- En portaobjectes normals preparats prèviament amb una capa d'agarosa estàndard assecada a l'estufa per fer de suport per la següent capa d'agarosa, i com a substitut dels portaobjectes rugosos es fa una primera capa de 110 µl d'agarosa de punt de fusió normal, preparada a l'1% en PBS (1%).
  - Es posa un cobreobjectes de 24x60mm, i es deixa uns 5 minuts en una placa metàl·lica situada sobre una cubeta amb gel perquè solidifiqui.
  - Es retira el cobreobjectes i es passa a posar la segona capa d'agarosa: es barregen bé 20µl de suspensió de cèl·lules amb 80 µl d'agarosa de baix punt de fusió ( LMP,al 0.9% amb PBS) mantinguda a 37-40°C per no afectar les cèl·lules. I es posen 80µl de la barreja. Es posa un cobreobjectes a sobre i es deixa de 5 a 10 minuts en una placa metàl·lica sobre gel, perquè solidifiqui bé.
  - Es fa una tercera capa amb 80 µl d'agarosa LMP.
  - Es retira el cobreobjectes i es posen els portaobjectes en una cubeta de tinció amb líquid de lisi (NaCl al 2,5M, Na<sub>2</sub>EDTA100mM, Tris 10mM, NaOH per ajustar el pH a 10, i
-

DMSO al 20% i Triton a l'1% que s'afegeixen just abans de posar les mostres) a 4°C. Es guarda a la nevera i tapat (per evitar que la llum pugui causar algun dany addicional al DNA), durant 2 hores per permetre la lisi alcalina de les membranes i algunes proteïnes.

A partir d'ara tots els passos són a les fosques (o es pot fer servir una llum vermella):

- Assecar una mica els porteobjectes i posar-los en la cubeta d'electroforesi horitzontal amb el tampó d'electroforesi (Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, NaOH 300mM), preparat el mateix dia i mantingut a 4°C, a un pH de 13, durant 20 minuts per provocar el "desenrotllament", separació de les dues cadenes de DNA. Es manté la cubeta d'electroforesi en fred a 4°C, (posant-la en una cubeta amb gel).
- Electroforesi a 25-30 volts i 300 mA, durant 20 minuts mantinguda en fred. Es fixen els volts i s'aconsegueixen els mA, treient o afegint tampó fins arribar els desitjats.
- Assecar els portaobjectes i posar-los en un placa horitzontal amb forats, i passar a fer tres rentats posant gotes a sobre el portaobjectes amb una pipeta pasteur( els dos primers rentats de 5 minuts i l'últim de 10) amb tampó Tris (0.4M) fred a pH 7.5 per neutralitzar i eliminar l'excés d'alcalí i la resta de detergents .
- Assecar una mica els portaobjectes i fer la tinció amb 65µl de DAPI, posar els cobreobjectes i esperar uns 6 minuts, llavors treure l'excés de colorant espolsant una mica el porta i guardar-los en una caixa per portaobjectes amb una paper humitejat amb PBS , ben tapada i a la nevera.
- Els comptatges es fan de la mateixa manera que com està comentat a l'apartat 1.1.b d'aquest capítol, pels *Apodemus sylvaticus*. S'estableixen les mateixes categories de formes de cèl·lules, relacionades amb el dany, i es calcula de la mateixa manera l'índex de comet (IC).

### Discussió de la tècnica:

#### .Tipus cel·lular:

Varis autors com Hooghe et al.(1995), Verschaeve & Gilles (1995) i Šalagovič et al.(1996), utilitzaven el *Comet Assay* en celomòcits de cucs de terra per l'estudi de la contaminació en terres dels voltants d'un abocador il·legal de residus o en zones afectades per altres tipus de contaminacions. La utilització dels celomòcits en estudis de toxicitat, per avaluar els efectes de determinades substàncies, o per mesurar-ne el seu efecte en la resposta immunològica dels cucs, o per valorar la contaminació ambiental, ha estat feta per varis autors (com els que he anomenat abans, i també, Suzuki et al.,1995; Cooper ,1996; Burch et al.,1999, entre d'altres).

Els celomòcits, cèl·lules que estan dins la cavitat celomàtica dels cucs, tindrien bàsicament la funció de defensa. Una de les complicacions que es troba en la seva utilització per al comet test, es va fer palesa de seguida en veure diferents mides de cèl·lules. Hi ha molts tipus de celomòcits, que s'han intentat descriure diverses vegades utilitzant diferents tècniques de tinció i de microscòpia, (alguns exemples: Duprat & Bouc-Lassalle 1967; Linthicum et al. 1977;

Valembouis 1971; Stein et al. 1977; Cooper 1996) donant diversos noms i nomenclatures variables i moltes vegades confuses. En la classificació que dona Stein et al.(1977) i Cooper (1996) en estudis realitzats sobre *Lumbricus terrestris*, es pot observar els diferents tipus següents: basòfils, neutròfils (estarien dins el grup d'amebòcits hialins), acidòfils de tipus I i II, i granulòcits (pertanyents al grup d'amebòcits granulats), les cèl·lules cloragògenes de tipus I, II (que estarien dins el grup dels eleòcits), i les formes transitòries. De tots aquests, sembla que en *Lumbricus terrestris*, els basòfils són els més abundants en un 63.5%. I les mides entre els diferents tipus varien molt, per exemple, en els basòfils les mides estan en un interval d'entre 5 a 30 µm, i segurament les proporcions entre els diversos tipus poden variar segons les espècies i les situacions. Però, no és encara massa clara tota la classificació, funcions, etc..

.Metodologia:

Un dels grans problemes al començar a treballar amb lumbrícidis va ser el fet d'aconseguir un nombre suficient de cèl·lules, de celomòcits. Segons Eyambe et al.(1991), amb la seva tècnica d'extrusió, podia aconseguir fins el 50% del nombre total de celomòcits ( $2.5-6.1 \times 10^6/\text{ml}$ ); pel Comet test, un número ideal seria  $1 \times 10^6$  cèl/ml o inclús valors menors. Per altra banda, Diògene et al. (1997), al discutir diferents sistemes d'extrusió comentaven que els nombre que es pot treure per a cada espècie és variable, i també pot variar segons els individus, havent-ne alguns que extreuen poques cèl·lules, cosa que vaig poder comprovar personalment, sobretot en els exemplars de mida més petita d'una mateixa espècie. Tot i això, en els estudis de Verschaeve & Gilles (1995) i Šalagovič et al. (1996) utilitzaven dos cucs per mostra i barrejaven les extraccions de cèl·lules dels dos individus per a la realització del Comet test. El mètode d'extracció utilitzat per tots aquests autors va ser l'extrusió per part dels propis lumbrícidis de les cèl·lules, seguint el mètode de l'Eyambe et al.(1991), posant els cucs en un líquid que conté una petita quantitat d'etanol, que és irritant, i causa una sèrie de contraccions musculars que fa que s'alliberin els celomòcits junt amb una gran quantitat de mucus (Eyambe et al.1991); un mucolític com és el GGE (Guaiacol glyceryl ether ; Suzuki et al.1995; Diògene et al.1997; Burch et al. 1999) i l'EDTA que incrementarien l'eficiència de l'obtenció de cèl·lules per l'alliberació dels celomòcits del mucus extret amb les cèl·lules i la reducció de l'agrupació de les cèl·lules, respectivament (Burch et al.1999), és una solució a pH 7.3 adequat per no irritar ni causar danys al cuc. Es va considerar un sistema menys traumàtic i al mateix temps, més eficient per a l'extracció de les cèl·lules, evitant ja els sistemes de punció (el sistema més utilitzat per a l'extracció d'aquest tipus cel·lular. Es va provar d'utilitzar al principi en aquests experiments, però a més de ser agressiu, és bastant costós de fer si no es té pràctica i no s'adorm el cuc, el pots travessar amb la pipeta sense aconseguir cèl·lules, degut a que no es paren de moure i és molt fàcil de poder-los travessar sense voler, i per tant danyar-los, moltes vegades sense aconseguir prou mostres cel·lulars, i etc...) aquest sistema ja el va comparar Eyambe et al.(1991) amb aquesta nova tècnica d'extrusió menys invasiva utilitzada en aquest capítol, i porta més avantatges i comoditat; Diògene et al.(1997) va intentar millorar l'extracció amb un sistema al buit amb èmbols, per obtenir més celomòcits amb menys contaminació fecal, i Burch et al.(1999) donen un petit xoc elèctric per estimular la contracció muscular i així hi hagi l'extrusió de cèl·lules, tot i que ho ajuda amb una solució que conté l'agent mucolític GGE. Malgrat tot això, en el nostre cas es va preferir fer una variació del sistema presentat per Eyambe et al.(1991) utilitzant una solució per a fer que els mateixos animals expulsin les cèl·lules.

La preparació d'aquest líquid d'extrusió, així com les altres solucions per al procés d'extracció de celomòcits: salí, salí+GGE, PBS, etc..., han d'estar a un pH=7.3 per evitar danys i irritacions a l'animal, ja que es pretén la recuperació d'aquest i fer servir un sistema d'extracció no agressiu. En la preparació d'aquestes solucions, aconseguir el pH adequat porta molt de temps, és per això que Diògene et al.(1997) van proposar un protocol alternatiu on utilitzaven tot un seguit de reactius per ajustar el pH i fer així més senzilla la seva preparació. Una altre de les proves que es van realitzar, doncs, va ser la comparació dels dos mètodes de preparació d'aquestes solucions, obtenint els mateixos resultats en els dos casos, així doncs, es va escollir el que en aquell moment va ser més còmode i el que feia servir menys quantitat de reactius, tot i haver de dedicar molt temps a la mesura i ajust dels pH, que va ser el protocol donat per Eyambe et al.(1991), però amb algunes modificacions pròpies.

En el procés cal doncs: netejar el cuc posant-lo en una solució salina a pH=7.3; (tal com Eyambe et al.1991; Verschaeve & Gilles 1995; Šalagovič et al. 1996; Burch et al.1999; o en aigua de l'aixeta, Diògene et al.1997) a temperatura ambient per no produir cap xoc al cuc. I llavors desar-lo sobre un paper humit, (en aquest cas es mullava el paper amb aigua de l'aixeta i no en solució salina, o PBS), fer-li un massatge amb el dit de la quarta part posterior del cos cap enrera, suaument per no danyar-lo, però fent una mica de pressió per aconseguir que expulsi tota la terra, o una bona part, que conté a l'intestí, per reduir la contaminació fecal en el fluid d'extrusió, (Eyambe et al.1991; Verschaeve & Gilles,1995), i així no contami ni embruti tant les mostres.

El líquid d'extrusió permet doncs, que els cucs expulsin el mucus que tapen els porus corporals i surtin així les cèl·lules de la cavitat celomàtica (que segons Eyambe et al.1991 i Verschaeve & Gilles 1995, són majoritàriament basòfils, degut a la seva presència al voltant dels porus integumentals a través dels quals surt el mucus, i segons Stein et al. 1977 i Cooper 1996, són els més abundants), un rentat posterior amb salí i GGE acaba d'ajudar a expulsar aquest mucus i cèl·lules (es barrejarà aquest fluid amb l'obtingut amb la solució de lisi, per a recollir els celomòcits), i llavors es pot posar el cuc en un bany amb salí sol, per treure l'excés de GGE i poder-lo tornar així a la terra. Tot i que s'utilitzen totes aquestes solucions a 4°C per mantenir les cèl·lules, l'exposició al líquid d'extrusió es fa a temperatura ambient, tal com altres autors (Eyambe et al.1991, i Šalagovič et al. 1996, Diògene et al. 1997), perquè així expulsen més mucus i cèl·lules (als primers experiments vaig utilitzar el líquid d'extrusió en fred, 4°C, i vaig poder comprovar com expulsaven menys quantitat de mucus, i cèl·lules), però les altres solucions s'utilitzen a 4°C, per mantenir les cèl·lules. Segons els protocols (Eyambe et al.1991, Diògene et al.1997) utilitzen unes quantitats elevades de les solucions per als rentats en l'extracció de celomòcits, però degut als problemes per aconseguir suficient nombre de cèl·lules en les nostres proves, vaig de reduir la quantitat de solució per a concentrar més les cèl·lules. Així doncs vaig utilitzar 4ml de líquid d'extrusió + 8ml de salí amb GGE, per als cucs més grossos usats en les nostres proves (com els exemplars d'*Eisenia*) i 3ml de líquid d'extrusió + 6ml de salí amb GGE (per als més petits). Eyambe et al.(1991), i Šalagovič et al.(1996), utilitzaven també valors de 3ml de líquid d'extrusió, però 17ml del salí per als rentats, mentre que Diògene et al.1997, fan servir diferents ml segons la mida de l'espècie, quan més gran, més quantitat de líquid d'extrusió, així utilitzen 8 i 25ml per a les espècies en que experimenten (*L.terrestris*; i *E.foetida*, *O. tyrtaeum*, respectivament), i de 22 a 75ml de la solució de suspensió, volums realment elevats.

Així com la suspensió final la faig en 0.5ml de salí, sense GGE, en comptes d'1 ml de la solució de suspensió com pels anteriors investigadors. Les solucions on es fa la suspensió cel·lular també varien segons els autors (entre posar-los en solució salina, LBSS: *Lumbricus balanced salt solution*, Eyambe et al.1991; o PBS lliure de  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$ , Šalagovič et al. 1996; o HBSS: *Hanks' Balanced Salt Solution*, Burch et al.1999; M-HBSS:*modified Hanks' balanced solution*, Diògene et al.1997).

A partir d'aquí es fan dos rentats amb salí, alguns autors en fan tres (Eyambe et al.1991), altres dos (Šalagovič et al. 1996), o un (Burch et al.1999). En tot cas, es va comprovar que és millor fer-los per eliminar la fracció de terra que pot quedar, ja que no s'aconsegueix amb el massatge que expulsin tot el que tenen als intestins, i per eliminar en gran part la fracció bacteriana, que a més de contaminar les mostres, causa un soroll de fons ,que interfereix en la tinció i visualització de les imatges, i no permet fer bé les lectures dels comets; altres autors, però, suplementen el medi de suspensió amb antibiòtics i antimicòtics (tal com comenta Diògene et al.1997).

Una de les altres variacions, va ser reduir la concentració d'alcohol en la solució d'extrusió, passant del 5% (Eyambe et al.1991), al 2% (Diògene et al.1997), ja que, es va considerar que així podia ser menys agressiu per l'animal i recuperar-ne més nombre, mentre s'aconseguia el mateix efecte en quan a la quantitat de cèl·lules recollides, i tal com comenta Diògene, aquesta menor concentració minimitza el dany a les cèl·lules també, (tot i que va comprovar que la mortalitat dels cucs després de l'extrusió, continuava essent elevada en *L. terrestris* i l'atribueix possiblement més a l'agent mucolític que al propi etanol).

A part de les proves i petits canvis per aconseguir més nombre de cèl·lules, es van fer frotis, i així es veia a priori si s'aconseguia extracció o no de cèl·lules. Haguera sigut convenient fer comptatges de les cèl·lules en cambres (com la de Neubauer), per veure si hi havia un nombre suficient de cèl·lules per a dur a terme el comet test; però enlloc d'això, es realitzava el comet test i es mirava si hi havia un nombre adequat de celomòcits per porta, així de pas, s'agafava més pràctica amb el procediment de la tècnica i les mostres. Es van fer frotis també en cada pas de la preparació de la suspensió cel·lular per al comet test, sobretot en la part dels rentats per veure si es perdien cèl·lules, i si eren d'algun tipus concret les que es perdien. Es va poder veure que es perdien cèl·lules en tots els passos, però al final no es van eliminar aquests rentats ja que eren necessaris per la neteja de les mostres a nivell bacterià sobretot, s'hauria però, de tenir en compte, en la interpretació dels resultats.

Altres frotis es van tenyir amb el protocol utilitzat per a tenyir sang (MayGrünwald-Giemsa, explicat a l'apartat 1.1.b), i es va poder observar molts tipus diferents de celomòcits i de difícil classificació, degut a tot el que he comentat anteriorment. Les diverses mides dels diferents tipus cel·lulars dificulten a vegades les lectures del comet test, a diferència dels cultius cel·lulars o de les mostres sanguínies, on les mostres són més homogènies. Però tot i que és més difícil, no és un problema únic en aquest tipus de mostra, ja que també es dona aquesta heterogenitat cel·lular en altres classes de mostres analitzades amb el comet test, com per exemple mostres d'epiteli intestinal, pulmonar, etc.. De tota manera, quan es va aconseguir obtenir un nombre suficient de cèl·lules per a tots els experiments, que la tècnica del comet test es pogués dur a terme sense problemes, i les mostres fossin més ben preparades per a facilitar els

---

comptatges, es va veure que predominava una mida i ja no van ser tant difícil els comptatges, les mostres sortien més homogènies, tot i que sempre es comptaven totes les mides de cèl·lula.

### Primers experiments

Al principi es van recollir diverses espècies de cucs per a fer diferents proves, en quan a l'extracció cel·lular, i preparació de la tècnica del comet test en cucs.

Va caldre aprendre a classificar els diferents exemplars i conèixer les característiques de les espècies per a poder escollir entre elles, les que complien els requisits que volíem, ja comentats anteriorment (àmplia distribució en la Península Ibèrica, abundants, etc...), i que fossin al mateix temps de fàcil manteniment, s'adaptessin bé a diferents mostres de terra i condicions, anessin bé, i superessin la metodologia del comet test, etc...

Un cop escollida l'espècie *Allolobophora caliginosa* per les característiques ja comentades anteriorment, es va passar a recollir-ne un nombre suficient d'exemplars per aconseguir una colònia estable al laboratori. Es van mantenir durant bastant temps per permetre que es reproduïssin, però la reproducció és lenta comparada amb altres espècies com *E.foetida* (per *A.caliginosa* el seu desenvolupament triga cap a dos anys, i el nombre de capolls i cucs és molt menor que per a *E.foetida*. En condicions de laboratori, *A.caliginosa* pot arribar a viure de 4 a 8 anys, Edwards & Bohlem, 1996). Pels experiments es volien exemplars que fossin de la mateixa mida, així es va anar recollint del mateix lloc un nombre adequat d'exemplars diverses vegades, (en comptes d'esperar a que els petits de la colònia arribessin a adults), i es mantenien en una terra considerada control varis mesos o setmanes en casos, per a la seva habituació en aquesta, i la seva possible recuperació (o en podríem dir "neteja"), dels efectes del sòl on vivien en el que podria haver hagut algun tipus de tòxic. Els cucs s'obtenien excavant en una zona humida d'un galliner on s'havia detectat un gran nombre d'individus d'aquesta espècie. Es mantenien en grup en uns recipients grans on es tenien arrecerats però a l'aire lliure, intentant no posar-los en cambres on es controlaria les condicions de llum, humitat, temperatura. Sinó que es podien notar els canvis de dia-nit, i de temperatures de l'ambient, es controlava la humitat, es regaven amb aigua de pou (aigua que no rep cap tractament), i s'alimentaven un cop per setmana amb engrunes de pa i farines de cereals per a infants. Així durant unes setmanes i llavors es portaven al laboratori, es mantenien allà en les mateixes condicions però en el laboratori, en recipients més petits i amb menys quantitat d'individus, amb la humitat controlada, la temperatura més o menys constant al laboratori i les variacions de llum de dia-nit, alimentant-los també un cop per setmana amb farines de cereals, aquest cop es feia servir aigua de l'aixeta reposada una setmana per a regar-los, tot i que alguns autors fan servir aigua de l'aixeta bullida (Diògene et al.1997). Potser hagués sigut millor utilitzar aigua destil·lada en aquest cas, enlloc d'aigua de l'aixeta, ja que pot fer variar l'estat i biodisponibilitat dels tòxics de les mostres de sòl de l'abocador. L'aigua sempre pot alterar aquests factors, però si a més porta clor o altres substàncies o minerals, més encara, per això en els següents estudis, com pel cas de Doñana (capítol 2), on hi ha elevada concentració de metalls pesats al sòl, es va mantenir la humitat amb aigua destil·lada.

---



Una part de l'estudi es va basar també en l'observació de la colònia establerta de cucs, com mantenir-los, la cria, com s'adapten a diferents tipus de sòls, i les proves corresponents de Comet Test per posar a punt la tècnica i per veure com responen a aquesta, ja que tal i com indica Eyambe et al.1991, després de l'extracció de cel·lul·lules per aquest sistema de fer expulsar el mucus al estar exposat en una solució d'extrusió, al cap de sis setmanes és possible tornar fer el Comet Test en *E.fetida*, ja que el cuc es recupera bé, no és una extracció tan agressiva, comparada amb les utilitzades anteriorment com les de punció. Així en els experiments que vaig realitzar vaig comprovar que les *E.foetida* viuen bé i es recuperen bé després de sotmetre'ls a l'extracció cel·lular, com també altres espècies, per a *A.caliginosa* en canvi, una part dels individus no sobreviuen, caldria ajustar més la tècnica, però degut a que el principal problema que tenia amb aquesta espècie era la falta de cèl·lules, he hagut de mantenir les proves més destinades a l'obtenció d'aquestes, intentant ésser el menys agressives possibles, però sense aconseguir encara que tots sobrevisquin a aquesta extracció. He pogut observar que segurament és degut a la mida del cuc, les *E.fetida*, més grosses, treuen més cèl·lules i amb menys impacte per a elles, i les *A.caliginosa*, quan més grosses, també treuen més cèl·lules i més resisteixen a l'experiment. Altres proves realitzades en espècies més grans de mida, resistien bé també. En el cas de *Microscolex* (tot i que és un Megascolècid, i no un Lumbrícid), essent de mida més petita, era més resistent a l'extrusió que *A.caliginosa*, però treia menys cèl·lules. Tot i això, com ja he comentat anteriorment, Diògene et al.1997, indica que més del 50% de *L.terrestris* en que se li ha fet l'extrusió, moren a les 24h, i aquests tenen mides i pesos considerables, o sigui que probablement també té a veure l'espècie, en la seva resistència o algun altre paràmetre. En alguns casos hi actuaria també l'estat de l'espècie per l'exposició a les terres, si són o no favorables, o si hi ha algun tòxic que els afecta, farien que encara fossin més susceptibles, i poguessin tolerar menys fortament, el tractament d'extrusió.

En quan a les variacions en el protocol del Comet test respecte a l'utilitzat en l'apartat anterior per a ratolins, hi ha algunes petites diferències:

L'ús de portaobjectes normals amb una banda esmerilada, preparats amb una capa d'agarosa assecada a l'estufa com a base per a l'adhesió de les següents capes en aquest cas.

Respecte a la preparació del líquid de lisi, cal un comentari sobre la seva preparació: no hauria calgut posar-hi DMSO en aquest cas, ja que és per prevenir el dany al DNA induït pels radicals associats amb el ferro alliberat en la lisi pels eritròcits presents a la sang o al teixit (Tice et al 2000), però es va utilitzant en aquesta prova.

Una altra diferència, és el temps de lisi, que el vaig augmentar a dues hores, ja que amb les proves anteriors em va semblar que no era suficient temps una hora, com fan la resta d'autors que treballen amb cucs com a mostra per al SCGE (Verschaeve & Gilles, 1995; Hooghe et al. 1995; Šalagovič et al. 1996). Les imatges que obteníem en una hora de lisi eren estranyes, semblava com si la membrana no s'hagués trencat, les cèl·lules mostraven formes similars a ous ferrats (fig.1.2.1), com els vaig anomenar; així que vaig augmentar el temps fins a les dues hores

---

de lisi, el mínim per obtenir unes imatges adequades perquè la lisi s'havia dut a terme bé. Com ja he comentat en altres capítols, els temps de lisi es poden augmentar, segons varis autors, fins a varies hores sense que es produeixi alteracions als resultats, i inclús fins a dies segons altres autors. Tal com comenta Tice et al.(2000), i jo n'havia fet referència en un apartat anterior en aquest capítol (1.1.b), hi ha un temps mínim necessari per alliberar el DNA apropiadament, i aquest temps pot variar segons el tipus cel·lular. En el nostre cas doncs, vam augmentar el temps de lisi a dues hores, a diferència dels altres autors pel mateix tipus cel·lular, però és que un menor temps, no ens permetia veure les imatges típiques de nuclis de DNA del comet (fig.1.2.2.).

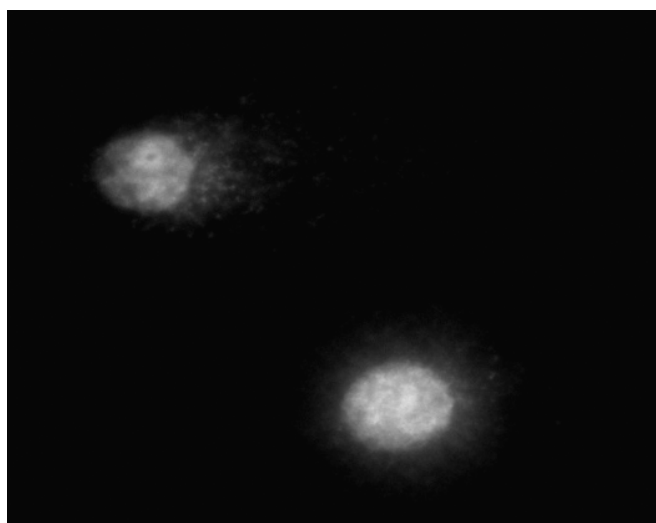
---

**Fig.1.2.1.** Fotografia de la imatge de la majoria de cel·loms cits després d'una hora de lisi, i del procediment normal del comet test, tenyit amb DAPI, i observat a 400x al microscopi de fluorescència. Seria la forma que he anomenat "d'ou ferrat", on possiblement la lisi no està complerta i les membranes no estarien del tot trencades encara.



Tot i no apreciar-se massa bé la imatge, ja que està massa intensament tenyida, i la cèl·lula ha quedat una mica doblegada, es pot veure el nucli i el citoplasma, hi hauria les membranes cel·lular i nuclear encara. Moltes de les formes obtingudes per aquestes mostres en 1 hora de lisi, eren d'aquest tipus.

**Fig.1.2.2.** Imatge dels cel·loms cits després de dues hores de lisi, seguits del procediment normal del comet test, tenyit amb DAPI, i observat a 400x al microscopi de fluorescència. Imatge digital. Es pot veure la forma de les categories **a** (imatge inferior) i **b** (imatge superior).



1.2.c. Resultats:

Taula 1.2.1. Resultats del Comet test:

Zona	n	IC ± SD
A	7	36.00 ± 5.36
B	8	55.53 ± 11.28
C1	7	57.25 ± 3.84
C2	9	49.30 ± 6.55
C3	8	59.43 ± 11.75
D	7	36.82 ± 5.57
S	8	32.87 ± 8.58

Comet test en *A.caliginosa*, exposada en les mostres de sòl de les diferents àrees de l'abocador (A,B,C1,C2,C3), i les control (D control extern, i S que seria un control de laboratori).

IC: Comet Index; SD: desviació estàndard; n: nombre d'individus.

Taula 1.2.2. Resultats del Test de comparació de Tukey-Kramer:

ns: no significatiu,  $P > 0.05$  ; \* :  $P < 0.05$   
 \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

Taula 1.2.2. Comparació

Comparació	Significació
A vs B	***
A vs C1	***
A vs C2	*
A vs C3	***
A vs D	ns
A vs S	ns
B vs C1	ns
B vs C2	ns
B vs C3	ns
B vs D	**
B vs S	***
C1 vs C2	ns
C1 vs C3	ns
C1 vs D	***
C1 vs S	***
C2 vs C3	ns
C2 vs D	ns
C2 vs S	**
C3 vs D	***
C3 vs S	***
D vs S	ns

Fig.1.2.3. Representació gràfica dels resultats del comet en *A.caliginosa* exposats a les diferents mostres de sòl de l'abocador mostrats en la de la taula 1.2.1.

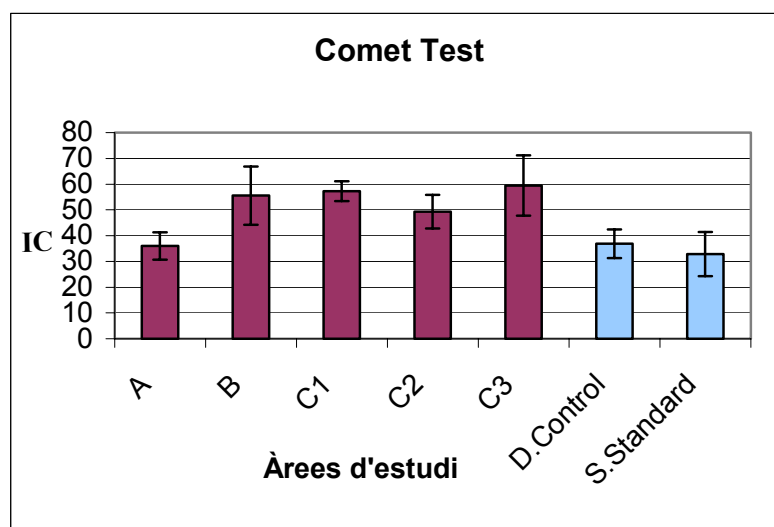
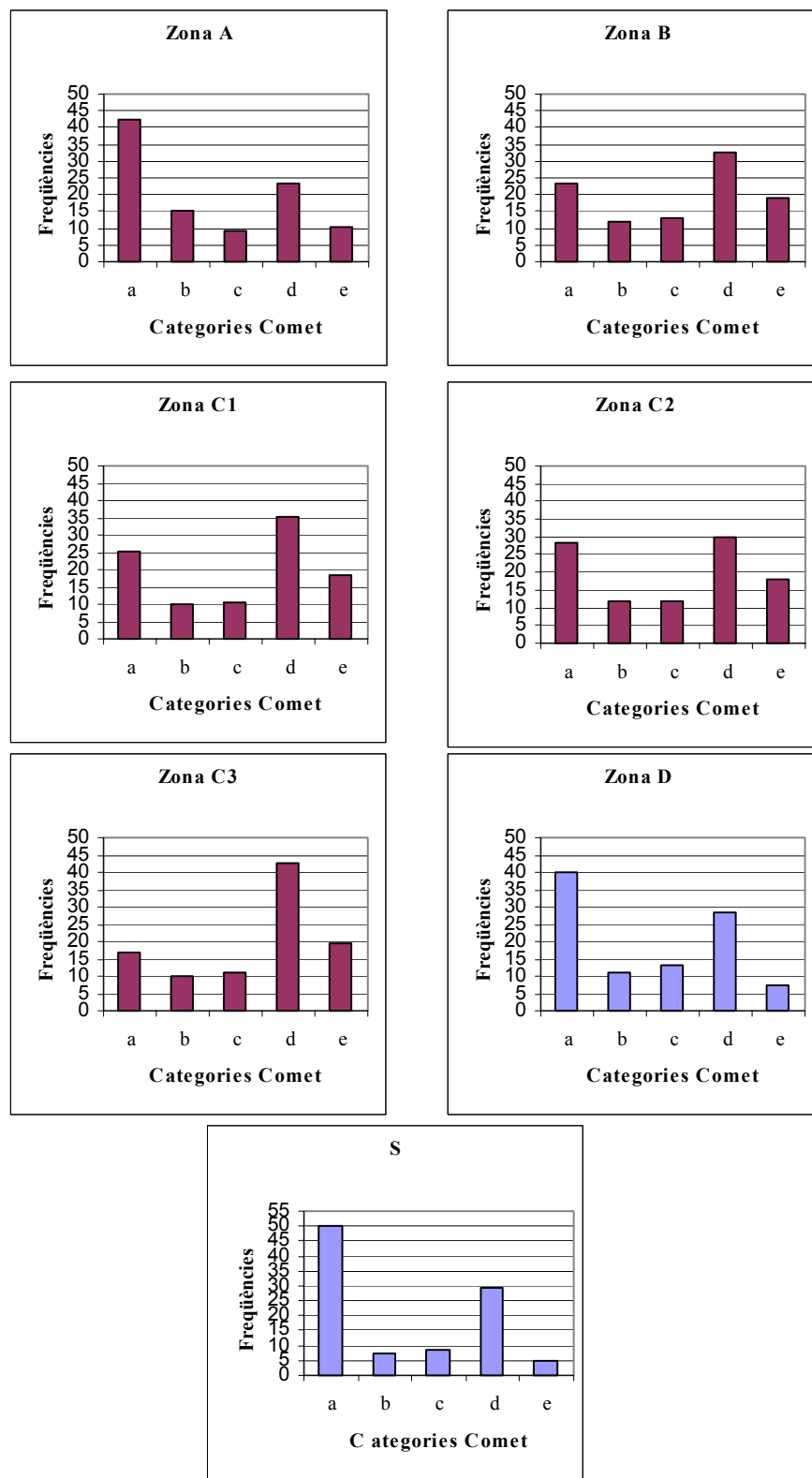


Fig.1.2.4. Representació gràfica de les freqüències de les categories de comet per a les diferents mostres de sòl.



Tal com es pot observar en la taula 1.2.1 els valors control i estàndard, són pràcticament iguals, i són més baixos que els valors de les mostres extretes en àrees d'influència per l'abocador (A,B,C1,C2,C3), amb excepció de la zona A, que té un valor molt semblant al control, és la zona de dalt de l'abocador, on estan posant les deixalles i enterrant-les de terra que porten d'un altre lloc, i on el contacte de les deixalles amb aquesta terra per cobrir-les era també recent.

Per altra banda les mostres de les zones properes a l'abocador, com la zona B, sota la bassa de lixiviats, i les C1,C2,C3, a varis Km de la bassa, mostren valors similars entre elles (taula 1.2.1, figures:1.2.3-4). S'esperaria que fos més contaminada quan més a prop de l'abocador, però si miren les C1,C2,C3, en aquest cas semblaria que és al revés, tot i que aquests valors són massa semblants per considerar-ho.

Si observem la figura 1.2.4., on hi ha representades les freqüències de les categories de comet, es veurà també la semblança entre els valors i distribució del comet en cucs exposats a la mostra de terra controls S, i D, i d'aquests amb la zona A de l'abocador; com també es veuran les diferències entre aquestes i les altres mostres (B,C1,C2,C3), que al mateix temps són més semblants entre elles, i que mostren freqüències més altes en les categories considerades de major dany en el comet (**c,d,e**; Fig.1.1.2), contràriament als controls en que la que predomina més és la forma sense dany (**a**; Fig.1.1.2).

#### **1.2.d. Discussió:**

Es va considerar al principi de l'estudi, la possibilitat d'utilitzar no sols la colònia de cucs establerta al laboratori sinó també comparar l'estudi en mostres de cucs extrets de les zones d'influència de l'abocador. Aquesta última opció, no s'ha pogut dur a terme degut a la gran dificultat que comporta treure les mostres d'una espècie concreta de lumbrícid en una zona extremadament seca. Hi ha diversos tipus d'extracció dels cucs del sòl, es pot utilitzar formol (Judd & Mason, 1995, i varis autors més) per a fer-los sortir, o cavar directament. Es pot abocar una quantitat d'uns 2.5 litres de formol al 0,55% per a una superfície de sòl de 50 a 100 cm<sup>2</sup>, i esperar uns 30 minuts, tots els cucs existents en una profunditat fins a 20-25 cm (depenent del tipus de sòl), sortiran sols, (Díaz Cosín et al.1981; Díaz Cosín & Moreno,1985; Mariño et al, 1987; Briones et al 1991). Però aquest sistema, en el nostre cas, es va creure millor no utilitzar-lo degut al tipus d'estudi que volíem realitzar, intentar veure si existia algun tipus de dany genotòxic (en aquest cas de tipus clastogen) relacionat amb el possible efecte contaminant causat per un abocador. Hem de tenir en compte que el formol podria emascarar els resultats ja que es considera una substància genotòxica, encara que l'exposició a aquest fos molt curta en el cas de l'extracció dels cucs del terra, i el fet que estaria bastant diluït, i no sabem del cert si pot afectar o no de manera tan directa i ràpida a les espècies d'estudi, i que segurament, al ser una contaminació puntual i momentània podria no afectar-los, ja que només es tracta de causar unes condicions desfavorables per a fer-los sortir, llavors només podria causar-los un estrès o irritació tan sols, o inclús el poc dany que es pogués produir, podria ésser reparat de manera més o menys ràpida. Es va preferir no acceptar aquest mètode per l'extracció de les mostres d'aquest tipus

---

d'invertebrats *in situ*. Encara que es comenta que amb suc d'una ceba aixafada i diluïda en aigua faria el mateix efecte perquè sortissin els cucs, això no es va provar de fer en aquest cas. També cal dir que el nostre treball es tractaria més de l'estudi d'una contaminació i un possible efecte a llarg plaç, en una exposició crònica pels cucs que viurien als voltants de l'abocador, i degut a això, podria ser encara més petita la detecció, però com que aquest test és molt sensible es volia veure si es podia detectar, per tant, tot possible factor per petit que fos i que pogués interferir o emmascarar els resultats, vam considerar millor descartar-lo. Però com ja he comentat, no es van recollir mostres de cucs en l'àrea de l'abocador, per aquesta i altres raons.

Els cucs poden ser absents en un sòl contaminat, per a mortalitat o perquè els poden evitar, d'altra banda es pot trobar individus que resideixen en sòls contaminats, que podrien donar-se degut a una adaptació, resistència de l'espècie a aquest tipus de contaminació, o a l'aclimatació, i tolerància de les concentracions d'aquests, tal com comenta en un estudi sobre contaminació per metalls pesants Aziz et al.(1999). Així en un estudi amb individus de la zona afectada s'ha de tenir en compte aquest aspecte, ja que el seu grau d'estrès pot ser diferent, i la tolerància pot confondre els resultats, tal com comenta Mariño et al.(1999) en un estudi de cucs en zones amb metalls pesants. D'aquesta manera l'estudi en individus recollits *in situ*, mostra una complicació en la interpretació dels resultats, a més de comptar que poden intervenir molts factors alhora en l'estat d'aquests animals, malalties, estrès degut a condicions ambientals, característiques dels sòls, època de l'any, etc...

Es va decidir llavors aconseguir una colònia de cucs i mantenir-los al laboratori (cucs que es van obtenir cavant), i exposar-los a les mostres de terra. La tècnica del Comet Test, com ja he dit, és molt sensible; en altres estudis com els de Verschaeve & Gilles (1995); Hooghe et al.(1995); Šalagovič et al. (1996), han indicat la utilitat d'aquesta tècnica per a l'avaluació de la contaminació en el medi terrestre amb cucs de terra, per a diferents fonts i casos de contaminació. Exposen els animals a les mostres de sòl en el laboratori també, no agafen mostres dels individus *in situ*.

El temps d'exposició es va considerar de cinc dies, tot i que altres autors (Šalagovič et al.1996) feien només 48 h., o altres (Hooghe et al. 1995) 24h., perquè tot i que es corre el risc de possibles reparacions en el dany del DNA, és millor tenir-los més dies per a reduir la possibilitat de l'efecte de l'estrès al estar en una terra nova i diferent, i aquest temps vaig considerar que era adequat per a l'adaptació dels cucs a la terra d'estudi. Els problemes d'estrès podrien causar falsos positius, i per altra banda, els cucs tampoc no processen la terra durant un temps quan se'ls canvia de tipus de sòl, si aquest és més pobre o diferent del que estaven abans, o a la inversa, si és més ric, la processen molt ràpidament i fan un creixement ràpid també, cosa que també podria influir,(com ja comentaré més endavant en el capítol 3), en els valors del Comet, indicant uns falsos positius una vegada més. La primera prova per veure si els cucs accepten la mostra de sòl o no, és l'observació de si s'enterren o no, això és un primer indicador, si volen fugir, és que hi ha alguna cosa a la terra que no els va bé, sigui el pH, algun tipus de tòxic, la salinitat, etc... I després l'observació continua en veure si processen o no la terra, quan la processen, la terra adquireix una forma típica i particular. De totes maneres, es coneix poc sobre si aquestes espècies poden veure's afectades per aquests tipus de tòxics en el sòl ni de quina manera, si els arribarà a causar mutacions al DNA o no, si aquests tòxics seran biodisponibles o no per aquesta espècie, i també s'ha de considerar com els afectarà segons les concentracions, i la barreja o la

---

forma en que estiguin aquestes substàncies, com també s'hauria de tenir en compte la capacitat dels animals per evitar els contaminants o els sòls contaminats (Yeardley et al.1996). Però, pels estudis de valoració de la contaminació en el medi ambient amb el comet test en cucs de terra, com els de Verschaeve & Gilles (1995); Hooghe et al.(1995); Šalagovič et al.(1996), i Binderup et al.(2001) en sòls contaminats per diversos tipus de substàncies com benzè, anilines, i altres PAHs: hidrocarburs aromàtics policíclics, i PCBs: Bifenils policlorats, dioxines, etc... algunes d'elles conegudament genotòxiques, i en les que van trobar diferències entre les zones properes a les afectades per aquestes contaminacions i les zones control, va ser el que ens va fer pensar que realment era adequat el treballar amb lumbrícidis per a fer una primera valoració de la situació. Molts tests en cucs de terra però, són per a fer test de toxicitat, per mirar la DL50 i/o CL50, i l'avaluació del potencial immunotòxic dels contaminants (Suzuki et al. 1995; Cooper 1996; Burch et al 1999, etc...), els quals consideren els cucs de terra com a sentinelles per avaluar els riscos de l'exposició a contaminants al sòl. Cooper (1996), comenta que el sistema immune d'aquests serviria com a biomarcador alternatiu dels canvis causats per la contaminació ambiental.

Es va pensar en fer un control positiu amb els cucs en la utilització del comet test, per a veure si eren adequats per l'estudi que es volia fer, el problema era quina o quines substàncies fer servir, ja que en la possible contaminació per l'abocador el que hi hauria seria una barreja de diverses substàncies, en una quantitat desconeguda. Aquest fet fa que canviïn les característiques de l'exposició i del possible dany, ja que hi pot haver efectes sinèrgics o antagònics, entre els diferents compostos químics contaminants. Als principis de la tècnica es varen fer unes proves amb ciclofosfamida en *E.foetida*, en el que s'esperava un resultat positiu de la tècnica en cucs, però es van descartar aquests experiments degut a que la tècnica no estava del tot posada a punt, i llavors es va basar amb els resultats dels estudis d'altres autors com els comentats anteriorment en els que utilitzen els cucs amb èxit per a la detecció d'una possible contaminació de tipus genotòxica al sòl amb el SCGE.

És difícil saber del tot quin nivell de contaminació hi ha al sòl, es pot distribuir de moltes maneres, i pot estar més o menys disponible per als éssers vius. És també difícil veure com pot afectar, ja que segons l'espècie animal, segons l'individu i molts altres tipus de factors, el seu efecte pot ser molt diferent. En l'avaluació de l'exposició de la contaminació del medi ambient en cucs, el comet test mesura el dany al DNA acumulatiu causat per tots els (geno)tòxics contaminants que són disponibles per aquests organismes (Šalagovič et al.,1996). Això fa que la interpretació dels resultats, junt amb la de tots els factors i paràmetres que hi intervenen, pugui ser complicada. Si mirem els resultats trobats en el nostre cas, com he comentat abans, en les taules 2.1.1, 2.1.2, i el gràfic (Fig.1.2.3), es pot veure que no hi ha diferències significatives entre les zones d'influència de l'abocador (B, C1, C2, C3), tot i estar a diferents distàncies d'aquest, però si hi ha diferències significatives entre aquestes i la zona A, que és la de dalt de tot de l'abocador i com ja he comentat anteriorment, seria una terra nova dipositada sobre l'abocador per a tapar les escombraries, i que té valors similars i no significativament diferents amb els controls D, i la terra de referència S (terra estàndard preparada al laboratori). El que és sorprenent és que els valors de B,C1, C2, C3 siguin tan similars (essent de 55.53, 57.25, 49.05, 59.43 respectivament, exceptuant una mica el de C2), ja que són de distàncies diferents des de la bassa de lixiviats. Tal com esperàvem en el cas dels ratolins, es va trobar majors valors en la zona B (zona de la bassa de lixiviats), on suposàvem que seria la més contaminada, seria la que

---



més intensament hauria estat exposada a la contaminació al ser la més propera a la font de contaminació, i la que més concentració de substàncies hauria de contenir; en aquest cas dels cucs però, es veuria que zones més allunyades de la bassa, a varis Km, tindrien valors majors inclús, però que es poden considerar, més que majors, similars, perquè no hi ha diferències significatives entre aquestes zones B,C1,C2,C3. Les mostres es recolliren en un punt concret, i potser la distribució de la contaminació en aquella àrea sigui diferent d'un punt a l'altre, tots aquests valors doncs, també es deuen a l'atzar. Si considerem però aquestes diferències de valors (no significatives estadísticament) en el que semblaria que en zones tan allunyades de l'abocador es troben valors més alts que els control, trobaríem diversos punts a considerar en la interpretació de les dades. Així com pels ratolins ens interessaria la contaminació que han rebut les plantes i insectes que pugui menjar, sobretot les plantes, la contaminació ha d'haver penetrat a nivells més profunds per afectar les arrels mentre que pel cas de les mostres de terra recollides per als cucs són mostres agafades a una profunditat màxima de 20cm i per tant, molt superficials. Caldria veure si l'aigua que s'escapa de la bassa, pot córrer riera avall fins a grans distàncies arrossegant els contaminants, es pot evaporar i no penetrar, o pot quedar embassada en llocs concrets. Tot això faria variar la concentració en les diferents zones i àrees i causar concentracions o no, en llocs concrets. Com també, i molt important, caldria conèixer les característiques de cada tipus de sòl recollit, ja que, podria ser que els cucs s'adaptessin millor o els agradés més un tipus de sòl que l'altre i llavors podrien sofrir un estrès major o menor al posar-los en un o altre tipus de sòl, i processar-lo més o menys. També cal tenir en compte, que les substàncies tòxiques poden acumular-se més en una forma o altra segons les característiques i condicions del sòl, i poden estar més o menys biodisponibles pels éssers vius segons aquestes. Entre moltes altres coses, hauria sigut interessant fer una anàlisi química de les mostres de terres, per veure la possible presència, o no, i la concentració dels (geno)tòxics, per poder comparar amb aquests resultats del Comet test. En la mostra C3, justament la que està més lluny de la bassa de lixiviats, i on la riera ja té una pendent molt suau (i menor que en les altres zones, això podria fer que s'acumulés més o permetés més l'estancament de l'aigua i la deposició d'aquesta en aquest punt, aigua que podria portar arrossegant algunes substàncies contaminants encara), era una zona molt sorrenca i envoltada de vegetació, arbres, i arbusts que fan augmentar el contingut de matèria orgànica al sòl, i això podria beneficiar el creixement del cucs exposats uns dies en aquesta terra, i com ja comentaré més endavant en el capítol 3, podria afectar amb uns falsos positius a la prova del SCGE, fent augmentar el valor d'IC; però per altra banda, al ser de tipus sorrenc, no és precisament un tipus de sòl gaire adequat per *Allolobophora caliginosa*, tot i que és una espècie que pot viure en molts diferents ambients, sempre té predilecció per uns llocs. La terra on els havia mantingut, tenia característiques diferents a la C3, i al posar-los a aquesta C3, hi podien viure, s'hi podien adaptar i viure-hi, però patien l'estrès del canvi i adaptació que pot durar uns dies, això també es podria veure reflectit en aquests valors tan elevats en aquesta mostra. El pH per aquesta mostra no és perjudicial per aquesta espècie, però mentre es feia la mesura d'aquest, es va veure que aquesta terra tenia un contingut de ferro elevat en comparació amb les altres mostres ja que quedava enganxat a l'imant de l'agitador, potser això seria un altre factor que podria influenciar d'alguna manera als cucs, donant aquest valor elevat d'IC. Podria ser doncs, que la contaminació procedent de l'abocador no arribés en aquesta zona, i aquests valors més alts en aquesta zona siguin deguts a aquests altres factors ja anomenats, o podria haver-hi algun altre tipus de contaminació o algun altre fet, com el que aquesta zona està a prop de camps que podrien haver estat tractats amb pesticides, però es descarta aquesta opció degut a que les mostres van ser preses a la riera i estava una mica allunyada de la influència d'aquest

---

possible factor; així com pel cas dels ratolins hauria sigut més evident degut a la seva mobilitat (no es van agafar ratolins d'aquesta zona), pels cucs es van recollir mostres de terra de la riera. Però una altra cosa que cal tenir en compte és que la terra C3, C1 i D es van recollir un any abans de les altres mostres, i pot ser en el cas de la C1 i C3 (la D és un control, en una àrea diferent, allunyada de l'abocador) presentessin més contaminació, ja que encara no estava feta la segona bassa de lixiviats, i podien estar exposades a més contaminació, i/o més freqüentment. Si ho comparem amb els resultats del MNT en ratolins en la zona B (que inclouria la zona C1 dels cucs) l'any anterior a la construcció de la segona bassa de lixiviats, amb els resultats de la mateixa zona un cop construïda (taula 1.1.3), no es veuen diferències entre un i l'altre. Pel cas dels cucs hauríem de tenir en compte, però, que les mostres recollides eren de terra i no dels propis animals que viuen en aquella zona, i a part de no poder-se comparar del tot amb els ratolins pels diferents tipus d'exposició i per ser diferents espècies, hi ha altres factors que possiblement influïrien en els valors dels resultats, estiguin o no relacionats amb el fet de l'existència d'aquesta segona bassa; la contaminació causada pels lixiviats al sòl és més directe, en el sentit que si s'escapen els lixiviats arribarien directament al sòl que nosaltres hauríem recollit, i podria afectar també de manera més directa i a curt termini als cucs, d'aquesta manera seria important conèixer les condicions en el moment de la recollida de la mostra, ja que influiria no sols a nivell crònic la contaminació, sinó també a nivell més localitzat en el temps. Així un altre factor que pot influir en la diferent recollida de mostres en aquest cas dels cucs, és l'època en que es van recollir, si hi havia hagut més o menys pluges (el règim de pluges podia haver estat diferent en aquell any o les condicions, i fer que hi hagués hagut més escapaments o en aquell moment concret de la recollida de mostres), i si eren més recents o no, ja que les mostres de terra extretes són molt superficials, pot haver concentracions del tòxic en basses, així poden ser diferents les condicions en el moment del mostreig, en que s'hagin concentrat els contaminants més o menys en un determinat moment, i lloc. D'aquesta manera, en el cas d'aquestes mostres de sòl, potser s'hauria de considerar no sols la contaminació a llarg plaç de l'abocador, sinó també a nivell puntual. Un altre factor que pot haver influït, seria el temps que feia que es van guardar les mostres abans de l'experiment, es van guardar al laboratori en bosses de plàstic, i potser no hauria estat la millor manera ja que al guardar-les llarg temps així abans de l'experimentació, hauria pogut fer canviar les condicions del sòl. Una millor opció hauria pogut ser guardar-les a la nevera, o deshidratar-les, però això haguera pogut alterar la composició i l'estat de les bacteries del sòl, i fer canviar les condicions també. Haguera sigut interessant agafar més punts en el mostreig de cada zona

En quan a la zona A, ja he comentat que té un valor molt similar al control D (36 i 36.82 respectivament; Taula 1.2.1), i es pot explicar, no sols pel fet que és una terra agafada de sobre l'abocador en que no ha estat gaire temps en contacte amb les deixalles, ja que va ser posada per tapar-les molt recentment, i procedeix d'un altre lloc, i per tant es podria considerar per tot això, nova en aquest punt i neta dels efectes de l'abocador, (no sabem d'on ve, en tot cas és d'una zona on no ha tingut un tipus de contaminació com la que han rebut les zones de l'abocador, sinó més aviat s'acostaria a la situació en que estaria el control pels resultats obtinguts, i és col·locada de forma primera en aquesta àrea). La zona que es va triar com a control, va ser una zona on les característiques del sòl ens van semblar similars a les de la zona de l'abocador, està situada a una vall paral·lela a aquest, i no hi ha cap punt de contaminació conegut. Tot i així, si mirem els valors del control comparant-los amb els de la terra estàndard S, utilitzada en l'experiment, veiem que la terra S, dona un valor d'IC de 32.87, una mica inferior al control (36.82), i això es

---

podria explicar degut a les diferents condicions i característiques dels dos sòls, i on els cucs podrien adaptar-se millor en un que a l'altre, o encara que menys probable, a algun tipus de possible contaminació en la control, encara que molt petita, però que pogués afectar aquests valors. Tot i així, no hi ha diferències significatives estadísticament entre aquests dos tipus de terra control, com tampoc entre aquestes i la zona A de l'abocador. És per això que es poden considerar similars.

No surt estadísticament significativa la diferència entre la zona C2, i la control D, però es pot veure que els valors són diferents (de 49.3 a 36.82). Aquesta zona però, té un valor molt inferior a les altres considerades zones d'influència de l'abocador (exceptuant la A).

Aquests resultats, però, ens poden servir per fer una primera anàlisi de com influiria l'abocador en una espècie de lumbrícid, que ens podria servir com a bioindicador i sistema d'alerta alternatiu a altres estudis més complexos i invasius, per a fer un *screening* de la situació, i després d'una valoració fer o no posteriors treballs més exhaustius i complets.

Si volem comparar tots aquests resultats amb els obtinguts per als ratolins, trobarem a nivell general una diferència entre els valors de les zones d'influència per l'abocador i les control en els dos casos. Tanmateix cal tenir en compte que no és comparable del tot, ja que es tracta de dos nivells diferents en l'escala alimentària, hàbitat, etc... i on també pot afectar de maneres diferents la contaminació, però considerant això, els resultats ens indicarien doncs, un efecte de l'abocador per a les dues espècies. A un nivell més concret, pot variar una mica en el sentit que, per exemple en el cas dels ratolins teníem que les zones d'influència per l'abocador (A,B,C), no tenen diferències significatives entre elles, però podíem veure els valors diferents que ens mostrarien una tendència, on el valor més elevat d'IC estaria en  $B > A > C$ , i on trobaríem diferències significatives amb el control, exceptuant la zona C, que tot i tenir un IC de 4.08, respecte el control de 2.59, no mostra diferències estadísticament significatives. Així doncs, la zona més contaminada per als ratolins seria a prop de la bassa de lixiviats (B), essent a uns 2km d'aquesta bassa(C) uns valors més propers al control (D), mentre que per als resultats amb els cucs de terra justament tenim que la zona A, a sobre l'abocador, no té diferències amb el control (ja he comentat però que seria una terra dipositada recentment i sense una influència de contaminació), com tampoc la zona C2 (tot i que els valors d'IC són diferents), mentre que la zona B, C1 i C3 sí mostrarien diferències amb els controls, així doncs mostrant una possible influència de la bassa de lixiviats en aquests animals. El valor de C3, tan lluny de la bassa queda ja més per a discutir el perquè d'aquest valor tan elevat essent el lloc més allunyat dels estudiats (i pel fet que el C3 doni tan elevat després que C2 sigui de valor més similar als controls, quan havien considerat que l'efecte de la font de contaminació es podia veure disminuït per la distància a aquesta), pot ser atribuïble a altres factors diferents a la possible contaminació per lixiviats, o al fet que la recollida de la mostra es fes quan encara no estava construïda la segona bassa de lixiviats (a diferència de les mostres C2 i B per a cucs).

De tota manera, a l'intentar comparar els resultats en els dos casos, cal tenir en compte diverses coses com ja he comentat anteriorment: és una contaminació que pot afectar de manera diferent a les diverses espècies, no només pel fet de no ser iguals i estar en diferent nivell en

---

l'escala tròfica, sinó també per estar exposats de manera diferent, i tenir mecanismes diferents de destoxicació, etc...

També estem parlant de nivells de mostreig diferents. En un estudi més ampli, s'hauria hagut d'agafar més mostres de terra per a cada zona per als cucs, ja que la contaminació en el sòl pot estar més concentrada en un punt que en un altre; hauria estat interessant analitzar les terres, i també agafar cucs *in situ*, cosa que es va pensar en un principi, però que es va descartar més endavant com ja he comentat, ens haguera pogut donar una visió potser més aproximada del que realment passa en aquestes zones, tot i que potser haguera complicat l'estudi, per la dificultat en la comparació amb les espècies exposades al laboratori. Ja que els lumbrícid que viuen a la zona podrien esquivar les àrees de concentració de contaminants o simplement adaptar-s'hi (Spurgeon & Hopkin, 1999), fins que no arribés a afectar-los massa, com també podria haver una manca d'aquesta espècie en alguna àrea degut a la mortalitat o al seu desplaçaments a llocs més favorables (Depta et al.1999); els cucs poden escollir les àrees on viuen i fugir a zones no contaminades (Depta et al.1999), però si estan en un lloc que no els és del tot favorable per les condicions, poden estar molt de temps sense menjar si els cal, a més *A.caligionosa* té moments de diapausa estival i hivernal (Álvarez, 1971), i per tant no s'alimentarien durant aquests períodes i no els influiria tant, a nivell, o via ingestió, la contaminació, i per tant podrien canviar els valors segons l'època en que es recol·lectessin. Així doncs, per mirar els efectes d'una exposició no puntual, sinó a llarg termini, això faria encara més complicada la interpretació dels resultats en individus capturats *in situ*, parlant de cucs com ja havia comentat anteriorment. I segurament s'haguera hagut de diferenciar entre els adults i juvenils, en els que podria potser variar la resposta a aquesta contaminació. Tot i això, ja he comentat també la dificultat en l'extracció en aquesta zona tan seca, a més que potser no es trobarien individus d'aquesta espècie, o en suficient nombre, ni amb la utilització de l'extracció per formol, tècnica que no es volia utilitzar, i cavar haguera sigut molt complicat.

Tanmateix, obtindriem, que, malgrat ser diferents espècies a diferents nivells d'exposició i condicions, no és tan diferent el resultat, si considerem les zones B-C1 dels cucs, donen un valor major que la C2 i A, i majors que el control, com en cas dels ratolins la zona B dona valors majors que C i A, i on podríem també considerar que els valors de C i del control D són molt propers, com la C2 i D dels cucs (malgrat que les zones D, en el cas dels ratolins van ser diverses zones i en cucs sols una, la qual també és una de les àrees mostrejades pels ratolins), i la zona A es podria considerar similar també en els dos casos al control, tot i que pels ratolins té explicació que tingui un valor elevat, perquè té més influència per l'abocador que en el cas de la mostra recollida pels cucs. Quedaria un cop més la mostra C3 per comparar amb la de ratolins, però no es va mostrejar aquella zona per *l'Apodemus sylvaticus*, hagués sigut interessant saber si aquest valor tan elevat pels cucs en aquesta zona ho seria també en ratolins, tot i que els valors de la zona C per a ratolins és molt proper ja al control i potser indicaria que ja no arriben allà els efectes de la contaminació per l'abocador (cosa semblant si miréssim el C2 dels cucs sense conèixer la C3). Hauria doncs estat curiós veure si aquest valor de la zona C3 era degut a la concentració de substàncies genotòxiques o a altres factors que ja he comentat, perquè just en aquesta zona hi ha pastures d'ovelles i cabres que mengen les plantes d'aquesta zona, hi ha activitat agrícola a prop i també hi ha cases.

Vull remarcar però, que quan parlo de cucs aquí, em refereixo sols a una espècie determinada, caldria veure si per altres espècies obteníem els mateixos resultats o no, com també pels ratolins, no puc generalitzar res, però per aquest estudi es pot veure doncs que semblaria que l'abocador influeix d'alguna manera en el seu entorn, a les espècies que hi viuen a nivell de dany al DNA, pel nostre cas estudiat. Si s'hagués fet l'estudi a nivell de cèl·lules germinals, s'hauria pogut veure quin efecte podria tenir sobre l'herència de les espècies. I si s'hagués mirat a nivell de diferents òrgans en el cas dels ratolins, s'hauria pogut establir quins òrgans es veurien més afectats per aquestes substàncies. Però l'objectiu del nostre estudi era un sistema d'avaluació, de primer *screening* dels efectes de l'abocador sobre unes espècies que utilitzaríem de bioindicadors de la contaminació, un sistema el menys invasiu i perjudicial possible per a les espècies però que al mateix temps ens donés una primera i vàlida informació per a posteriors treballs i per tenir un idea primera de l'estat de la situació i la seva influència i de manera relativament ràpida.

Una altra dada interessant que vull mostrar aquí, és la diferència de nombre basal de comets del què partim, si comparem els valors obtinguts per l'*A.sylvaticus*, són valors d'IC de entre 2 a 9, mentre que per *A.caliginosa* són valors de entre 32 a 59. Això ens indicaria doncs la diferència inter-específica en els resultats d'aquesta tècnica. És interessant també comparar els gràfics de les distribucions de categories de dany entre les dues espècies (Figures: 1.1.4 i 1.2.4), en que es veu doncs més remarcat aquest diferent dany basal, on en els cucs hi ha més freqüències en les categories considerades de major dany, les **c**, **d**, **e**, mentre que pels ratolins predomina les categories de menor dany (**a**, **b**).

Si observem les SD, veiem que pels cas dels ratolins són també menors que pels cucs, en els cucs hi ha una major variació entre individus (Šalagovič et al.1996 també troba uns valors elevats de SD en cucs). Pel cas dels ratolins augmentava la SD en la zona més contaminada i de major valor d'IC, mentre que pel control tenia valors petits; per als cucs però, sí que els valors menors estan en les zones control i la A, i en canvi per a la zona B i C3 són més alts, seguint els valors elevats d'IC, aquestes variacions podrien ser explicables degut a les diferents exposicions o reaccions als tòxics i a les diverses condicions per a reaccionar i destoxicar dels individus.

Una altra part interessant hauria estat, com ja havia dit, no sols l'anàlisi de les mostres de sòl amb les que es va dur a terme l'experiment en cucs, com ja he comentat, sinó també haver recollit mostres de plantes de la zona i analitzar-les, no sols per a obtenir una idea del seu contingut en tòxics o no, sinó també del seu potencial com aliment per altres espècies en el fet de contribuir el l'acumulació de tòxics com podrien ser metalls pesants, i que posarien a disposició de la xarxa tròfica. Els cucs de terra ingereixen partícules minerals, microorganismes, matèria orgànica morta procedent de plantes i animals (Álvarez 1971; Abdul & Bouché, 1992), per això són importants com a bioindicadors de la contaminació al medi terrestre, al temps que també constitueixen una part important de la massa animal, i són part de l'aliment de gran quantitat de vertebrats i també de nombrosos invertebrats, llavors el seu paper en la xarxa tròfica és d'interès, com ja havia comentat, sobretot en quan a la possibilitat de contaminació del sòl que pugui afectar-los i per tant, afectar a altres nivells de la cadena alimentària.

---

**1.2.e. Conclusions:**

1. Els resultats del comet test realitzat en exemplars d'*A.caliginosa* exposats a mostres de sòl de les zones d'influència de l'abocador, donarien valors més elevats d' IC que els controls (zona D i S), exceptuant la zona A, que es podria considerar molt semblant als controls degut a ser una mostra de terra que prové de fora de l'abocador, estaria dipositada recentment a l'abocador per a tapar les deixalles i hauria estat poc temps en contacte amb aquestes.
  2. *A.caliginosa* es podrien considerar vàlids com a bioindicadors de la contaminació causada per l'abocador.
  3. El comet test en exemplars d'aquesta espècie animal, ens podria servir per a una primera valoració de la contaminació de tipus genotòxic causada per l'abocador.
  4. No es pot establir però, amb els resultats d'aquest estudi, una relació dels efectes d' aquesta contaminació amb la distància a l'abocador. Caldria repetir i fer altres proves tenint en compte més factors, com ara la dispersió dels contaminants, el règim de pluges, etc...
-

**Annexos:** Altres proves realitzades amb lumbrícidis:

### **Annex 1.2.1**

Comet test en exemplars d'*Eisenia foetida* exposats a mostres de l'abocador de Garraf:

Introducció:

Abans de fer servir *Allolobophora caliginosa* es van fer una sèrie d'experiments preliminars amb *Eisenia*, no tan sols per la posada a punt de la tècnica sinó també per fer una primera observació de l'estat de les terres, si es podia detectar alguna diferència o no entre alguna de les zones de l'abocador.

Material i Mètodes:

El protocol és el mateix que l'anterior però:

- Amb la utilització de portaobjectes rugosos en comptes dels normals amb la capa d'agarosa assecada, com en el cas dels *Apodemus*, ja que encara no coneixia aquest nou sistema per utilitzar portaobjectes normals.
- Es posen els cucs en 4ml de medi d'extrusió + 8ml de salí amb GGE (en comptes de 3+6 respectivament). I el primer rentat de les cèl·lules en salí es fa amb 6ml en comptes de 4. Es fa servir més quantitat perquè els cucs són més grossos, i també perquè treuen més nombre de cèl·lules.
- La resta del protocol és igual.

Els exemplars d'*Eisenia* eren mantinguts amb excrements de vaca, ja que necessiten una quantitat de matèria orgànica elevada per a viure. El xoc que podien rebre al passar d'aquest tipus de sòl a un molt diferent i més pobre els podria causar un estrès enorme i obtenir així uns resultats alterats amb major nombre de comets, no deguts a possibles contaminants. Fins i tot podrien arribar a morir, i els primers dies no processarien la terra i per tant no servirien per a mesurar la possible contaminació d'aquells sòls. Es van fer doncs, unes primeres proves per a veure si s'adaptaven bé o no a les mostres de terra del l'abocador, obtenint bons resultats. Així vam creure millor exposar durant cinc dies els cucs en aquestes terres, malgrat que en els alguns articles (tant si utilitzen *E.fetida*, com una altra espècie) ho fan durant 48 h (Hooghe et al.1995; Šalagovič et al.1996) tal com ja havia comentat anteriorment en l'apartat 1.2.b d'aquest capítol.

Procediment:

Es van posar durant 5 dies, 10 exemplars d'*E.fetida* en una mostra de terra amb un 70% humitat (humitat adequada per aquesta espècie).

Les mostres de terra eren:

- Zona C1: 1km sota la bassa de lixiviat
  - Zona C3: 3Km sota la bassa de lixiviat
  - Zona D: Control
-

- Mostra W: terra ( amb excrements de vaca) on es mantenien els cucs abans de tots els experiments i considerada control. Seria el blanc.

Resultats i Discussió:

Zona d'Estudi	IC ± SD	n
Control D	42.75 ± 5.95	8
C1	45.97 ± 11.60	5
C3	37.60 ± 12.80	6
W(blanc)	40.43 ± 6.10	4

Com es pot observar les diferències no són marcades, i estadísticament tampoc no hi ha diferències significatives (Kruskal-Wallis;P=0.69). Cal tenir en compte però que sols va ser una prova, el nombre d'individus és diferent, i que, necessiten un valor més elevat de matèria orgànica que els exemplars d'*A.caliginosa* per viure, i es van haver d'adaptar a les terres.

Degut a aquesta semblança de valors, no puc establir tendències com en els casos anteriors. Però malgrat això, podria intentar discutir algunes coses: els valors control i el blanc són molt iguals, mentre que en la zona C1, més propera a la bassa de lixiviats de l'abocador té un valor una mica més elevat, sent però la zona C3, d'un valor inferior al control i al blanc inclús (podria considerar un valor com els dels controls perquè la terra fos de característiques similars als controls en quan a contingut o biodisponibilitat de contaminants, però aquest resultat seria contrari amb l'obtingut per *A.caliginosa*, apartat 1.2.c d'aquest capítol, taula 1.2.1, on justament el valor de C3 era el més elevat de tots). Tindria més sentit però, dir que és més real aquest resultat ja que és una zona molt allunyada ja de l'abocador i no hauria arribat la seva influència, o es podria atribuir també, a la diferència entre les dues espècies, en aquest sòl hi podria haver algunes condicions desfavorables per a *A.caliginosa* que per a *Eisenia* no ho fossin. La mostra C3 és la zona més allunyada de l'abocador, i més a prop del mar, de característiques més sorrenques (cosa que no es gaire favorable per *A.caliginosa*), però al mateix temps amb un elevat contingut de matèria orgànica perquè la zona estava envoltada d'una gran vegetació arbòrea i també era lloc de pastura per a xais, deixant nombrosa quantitat d'excrements, això fa que les característiques del sòl siguin diferents a les altres mostres de terra i pot influir de manera diferent en les dues espècies. Les mostres on es van exposar els cucs en els dos experiments, van ser recollides al mateix moment, mentre que l'experimentació es va dur a terme en anys diferents (primer per *Eisenia* i al cap d'un any per *Allolobophora*), podria ser que el fet de guardar les terres durant un any (de la manera descrita) haguessin variat d'alguna manera les condicions d'aquesta.

La zona C1 té un valor una mica més alt que les controls, però tampoc no gaire i no es pot considerar, mentre que per *A.caliginosa* si hi havia diferència respecte el control D (taula 2.1.2).

Si comparem els valors dels controls són en el cas d'*Eisenia f.*, més elevats que per *A.caliginosa*. Si ho mirem però, un cop més, en relació amb els ratolins, veurem que aquests valors basals d'IC són molt menors en aquests que per les dues espècies de lumbrícid. La variació d'IC en diferents espècies, en diferents individus o en diferents teixits del mateix



organisme, és evident. Perquè en cada espècie el dany basal pot ser diferent, o la manera que influeix el possible tòxic, o l'estat de l'individu o com reacciona a determinats factors o contaminacions, i de manera similar passaria en els diferents teixits, ens els quals també s'hauria de tenir en compte les possibles diferències en la taxa de recanvi cel·lular que podrien representar una variació fisiològica (no patològica) dels valors.

També s'ha de considerar al tractar amb dues espècies diferents de lumbrícids, que poden haver variacions en la manera d'adaptar-se a les terres i en la manera de processar i assimilar els possibles tòxics existents al sòl, podent afectar més a una espècie que a una altra. Malgrat tot això, l'experiment es va realitzar amb poc nombre d'individus i era tan sols una prova, per a veure si els exemplars d'aquesta espècie podien viure en mostres de terra de característiques diferents a la que vivien fins llavors i veure al mateix temps si observàvem alguna diferència entre les mostres procedents d'àrees d'influència per l'abocador i les controls. Un altre fet a comentar seria que alguns dels exemplars estaven en època de reproducció, o ja havien posat els capolls, i això podria portar també alguna diferència o influir d'alguna manera, (en els experiments amb *A.caliginosa* es va intentar que cap estigués en època de reproducció).

Per aquests resultats sense cap diferència entre les diferents zones, no es pot concloure justament el que s'esperaria, unes diferències entre la zona control i les àrees afectades per la influència de l'abocador. Cal però, dir que la zona C1 i C3, estan molt allunyades de l'abocador, i potser precisament això faria que no arribés la seva influència o efecte en aquestes zones. Es podria pensar en que els valors elevats en el cas d' *A.caliginosa* en les mateixes zones C1 i C3, i diferents a la control, serien aleshores potser més deguts a altres factors que no a l'efecte contaminant per l'abocador, però no es pot afirmar degut a que caldria ampliar aquest experiment. Hauria estat interessant repetir els experiments amb *Eisenia foetida*, per a totes les zones, i sobretot en la zona B, que està més a prop de la bassa de lixiviats, per veure si es diferenciava dels valors de les altres àrees i del control, i així també poder comparar amb els resultats per *A.caliginosa* (on es trobaven diferències per a les zones afectades per l'abocador i els controls), veure si serien similars o no, i veure si responien de manera diferent en quan a la resposta a la seva exposició en aquestes terres; ja que ara no podem especular en aquestes explicacions perquè faltarien més proves, a més cal tenir en compte que l'ús de la tècnica del Comet en aquest experiment encara era dels principis de la seva posada en marxa, i pot haver deficiències tècniques,.

Tot aquest seguit de proves ens van ajudar , però, a millorar la tècnica.

---

**Annex 1.2.2:**

Exposició crònica de lumbrícidis en terres de l'abocador:

Introducció:

En uns dels estudis preliminars es van fer diverses proves amb diverses espècies de lumbrícidis autòctons (recollits a la natura, en llocs considerats control), que es van exposar a terres de l'abocador, per veure si eren capaços de viure-hi, adaptar-se i per poder al mateix temps, fer proves per posar en marxa la tècnica.

Així doncs, no es tenen resultats de molts dels experiments, ja que eren tan sols proves. Però, després de mantenir aquests cucs en aquestes mostres de terra de l'abocador durant gairebé dos anys, amb l'aportació externa de matèria orgànica en forma de farines per a infants, es va poder veure que la seva supervivència va ser bona, fins el punt d'aconseguir que criessin i creixessin realment bé. En les últimes proves en que els problemes tècnics estaven resolts, es va poder obtenir algun resultat i comparar els resultats amb els de sis mesos més tard.

Metodologia:

Es van mantenir lumbrícidis durant gairebé dos anys en mostres de terra C1 i en una mostra recollida sota la bassa de lixiviats, que correspondria a la zona B, però que és diferent de la recollida pels experiments comentats anteriorment. Aquesta terra semblava dipositada allà, al costat de la riera, però provenint de l'abocador, (amb fangs barrejats inclús). I es va recollir per a fer tan sols algunes proves per curiositat, més que per l'estudi de la zona, ja que no era just el lloc de recollida de mostres per a la zona B. Cal remarcar que en aquesta recollida de mostres la segona bassa de lixiviats encara no estava construïda.

Amb aquests cucs es va dur a terme diverses vegades el comet test, es pretenia fer proves per acabar de posar a punt la tècnica. Respectant entre experiment i experiment, més del temps aconsellat (6 setmanes, Eyambe et al.1991) per a la recuperació dels espècimens després de l'obtenció dels celomòcits pel mètode d'extrusió.

Les últimes proves, de les que en presento alguns valors en la taula següent, es van dur a terme de la mateixa manera que el protocol *per Eisenia f.* (comentat en l'annex 1.2.1), degut a la mida similar d'aquestes amb els cucs analitzats en aquest cas.

---

Resultats i discussió:

Els resultats corresponen als valors d' IC obtinguts dels cucs mantinguts durant quasi un any i mig en terra de la zona C1, i en la zona B'' (" ja he comentat que aquesta mostra de terra no es correspon amb la utilitzada pels experiments amb *A.caliginosa* i *E.fetida*). I dels obtinguts sis mesos més tard pels mateixos individus i algun més, mantinguts en la mateixa mostra de sòl de la zona B''.

Àrea d'estudi	Mitjana IC ± SD	n
B''	54.33 ± 8.62	3
C1	33.75 ± 3.92	3
B''(6 mesos més tard)	41.96 ± 8.57	5

Es pot observar diferents valors entre les zones B'' i C1, sent inferiors en C1, justament la més allunyada de la bassa en aquest cas. Tot i que no podríem comparar-les per a veure els efectes amb la distància a l'abocador, perquè com ja he comentat, la mostra B'' era recollida en un punt on hi havia terra que semblava dipositada de manera artificial en aquell lloc concret, i no correspondria al sòl habitual d'aquella àrea. De la mateixa manera, no podem comparar aquesta prova amb els experiments anteriors (taules: 1.2.1 i Annex1.2.1) en els que hem utilitzat altres espècies, on la mostra B era extreta d'un lloc diferent; per a la zona C1, seria potser comparable entre les diverses proves, però, els temps d'exposició són molt diferents d'aquest cas en que els cucs han estat en la mostra de sòl durant un any i mig fins a quasi dos, mentre que pels altres experiments hi van estar cinc dies, això podria afectar també en els resultats, i fer que surtin inferiors en aquest punt per aquesta espècie (33.75) que per *A.caliginosa* (57.25) i *E.foetida* (45.97); cal però tenir en compte que no tenim cap valor per a la mostra control en aquest cas, que ens pugui servir de referència del valor de comets basal (l'IC basal) per aquesta espècie, i ja havia comentat també anteriorment que els valors basals per a cada espècie són diferents, i les influències dels contaminants poden ser diferents, com també l'adaptació als tipus de sòl, etc...

El que és important a destacar és la comparació dels resultats del comet en la mateixa mostra de cucs després d'estar en la mateixa mostra de sòl (B''), amb sis mesos de diferència. Tot i que en el primer cas hi ha resultats només per a tres individus i al cap de sis mesos es va realitzar en sis individus, poden ser comparables els valors, si tenim en compte que en els dos casos ens dona una quantitat de desviació estàndard similar, i tenint en compte que tot i ésser realitzada la prova en èpoques diferents, cap dels exemplars escollits estava en estadi de reproducció. El que és important és veure la disminució del valor d'IC, en la primera prova ens donava un valor elevat de 54, mentre que sis mesos més tard dona un valor de 41. Si comparem el 54 amb els obtinguts en els altres experiments es pot considerar alt,(malgrat que ja he comentat que hi ha una variació interespecífica del valor basal de comet, IC; de tota manera és un valor elevat, i més si el comparem amb la mostra de la zona C1 del mateix experiment), que podria ser interpretat com a degut a algun tipus de contaminació genotòxica en aquest cas (ja que podria no ser degut a un genotòxic, sinó a un tòxic, o a algun altre factor que alterés l'estat del cuc i que podria fer que el detectéssim com a dany genotòxic). Tot i que els individus han estat vivint un llarg temps en aquesta mostra de sòl, podria ser que tardessin en recuperar-se de tal efecte, i que amb un temps de sis mesos més, d'alguna manera, haguessin pogut assimilar,

metabolitzar, i recuperar-se de tal efecte, o hi hagués una certa adaptació amb el temps, per això donaria un valor inferior. Aquestes consideracions tenen un caràcter especulatiu, ja que és una prova tan sols, amb poc nombre d'individus, i els resultats podrien ser deguts a altres factors que els considerats. Un cop més doncs, caldria incrementar el nombre d'experiments. La divisió cel·lular també hi podria influir (podria haver coincidit en un període de creixement dels individus en aquell moment per al primer experiment en terra B", que hauria pogut explicar aquests valors més elevats). Tot i això, estadísticament, no és significativa la diferència entre aquests dos valors (test de comparació de Tukey-Kramer).

Com a conclusió per aquesta prova, es podria especular sobre la idea (amb certa cura ja que caldria fer experiments per a comprovar-ho) que en una terra suposadament contaminada, al cap d'un temps de ser habitada per lumbrícid, podria canviar les seves propietats i/o composició, i al mateix temps podria d'alguna manera, disminuir l'efecte del o dels possibles tòxics sobre els individus, degut a que podrien assimilar, metabolitzar en part, o restaurar els seus efectes nocius, o per altra banda, es podrien adaptar a aquests en el temps i resultar així en un menor efecte tòxic per a ells.

Caldria doncs, fer més proves i d'una manera més controlada per poder comprovar aquestes especulacions, tenint en compte, que poden haver molts altres factors que hagin intervingut en aquesta diferència de valors, ja que el comet test és un test molt sensible i com ja s'ha comentat diverses vegades, sembla ser que la divisió cel·lular, com també altres factors, podrien interferir en els resultats.

### **Annex 1.2.3:**

Realització de la tècnica del Microtox sobre mostres de sòl:

Introducció:

Es va voler fer una anàlisi de toxicitat a les mostres de sòl amb la utilització d'altres tests ben establerts per a l'avaluació ecotoxicològica d'aquests tipus d'estudis de contaminació per determinats xenobiòtics en el medi ambient. Hi ha una sèrie de tests de toxicitat, que poden indicar la presència de substàncies mutàgenes per la detecció dels seus efectes. Tests que ens haurien anat molt bé per a poder formar, o no, alguna relació amb els valors dels resultats obtinguts pel MNT i SCGE en la prova dels ratolins i pel SCGE en la dels lumbrícid exposats a les mostres de sòl de l'abocador. Es va pensar en el test d'Ames, molt utilitzat des de fa molt temps, en que permet fer una bateria de tests per a la detecció d'aquest tipus de substàncies. Permet mesurar diferents tipus de mutacions, d'aquesta manera ens haguera pogut donar uns resultats que hagueren anat molt bé per a comparar amb els obtinguts en el nostre estudi de genotoxicitat realitzat a partir del test dels Micronuclis i el Comet test. És una prova de llarga durada i necessita d'un coneixement de la tècnica adequat, (no es va poder dur a terme en aquest cas). Altres tests com el Mutatox, i el Microtox, molt utilitzats en aquests tipus d'estudi, molt ràpids, automatitzats, i més econòmics; tot i que no permeten fer una bateria d'assajos per a

---

detectar diferents tipus de mutacions com en el cas del test d'Ames, són molt útils per a un primer *screening* ecotoxicològic de la situació. Són molt utilitzats per a valorar o mesurar el nivell de tòxics en aigües, vessaments o lixiviats, que poden afectar al medi ambient.

El Mutatox, és capaç de detectar tan mutacions puntuals (per substitució de parell de bases o bé de tipus *frameshift*), com l'acció de genotòxics inhibidors o intercaladors (Ulitzur, 1986). Hagués sigut interessant realitzar la prova amb el Mutatox, en aquest cas també.

Es va fer, però, una primera valoració de les mostres amb la realització d'unes proves amb el Microtox, basat en la pèrdua de bioluminiscència d'una determinada soca bacteriana com a conseqüència de la seva exposició a tòxics. Un test que presenta totes les avantatges comentades anteriorment, i que és molt validat i està contemplat en moltes normatives per aquestes menes d'estudis. Uns exemples de la seva utilització en la valoració en el medi ambient, tan a nivell d'anàlisi d'aigües, com de medi terrestre són, Filipic (1995), en riu, Salanitro et al.(1997), entre molts altres.

Material i Mètodes:

El test del Microtox és molt utilitzat en aquest tipus d'estudis degut a la seva rapidesa i sensibilitat. Es realitza a partir d'una soca bacteriana liofilitzada (una soca mutada de *Vibrio fischeri*), d'origen marí que són bioluminiscent. Es fa la mesura de la bioluminiscència, que disminueix en presència d'alguna substància tòxica.

A partir de les mostres de terres es va fer un extracte, sense però, utilitzar cap tipus de dissolvent orgànic que podria fer variar la mobilitat, i per tant també la biodisponibilitat dels possibles tòxics en el medi ambient, així s'obtidria el que podria passar al ploure, si s'arrossegarien degut a l'aigua de pluja i anirien sent transportats fins a distàncies més o menys grans, o si no passaria res d'això. I al mateix temps, avaluant aquests extractes, ens permetria veure doncs, l'existència o no dels tòxics que podrien ser més disponibles per a les espècies (encara que a vegades és difícil mesurar la biodisponibilitat per a una espècie animal d'unes determinades substàncies, tal i com comenta Weltje 1998, calen encara bons sistemes per aquest tipus de mesura de la disponibilitat, posant exemples dels metalls pesants en un sòl, on segons com es mesuri la seva extracció en relació a la seva biodisponibilitat pot donar valors molt diferents, on hi ha alguns autors que consideren que són biodisponibles aquells que es treuen tan sols amb aigua, mentre per altres consideren els que també s'obtenen per dissolvents orgànics).

Va ser necessari prèviament mesurar els pH de les mostres ja que aquest bacteri pot viure entre pH de 6 i 8 , és doncs important aquesta condició. Les terres eren de pHs neutres.

Es van prendre 7grams de mostra de terra de les zones: C1,C3 i D, en les que es va afegir 35ml de la dilució de NaCl al 35% amb aigua milliQ, degut a que la soca bacteriana és d'origen marí i cal ajustar la salinitat. Es barrejar durant 10 minuts en un agitador, i se'n van treure 5 ml que es van centrifugar durant cinc minuts per a treure les partícules sòlides que poden interferir en les lectures de la bioluminiscència per l'espectrofotòmetre de l'aparell de microtox (equip M500 de Azur Environment). Es van filtrar i es va realitzar les dilucions de 1:2, 1:4, 1:6, ....., fins

---

a 1:24. Es va fer una solució blanc de NaCl també. Es prepararen els bacteris que estaven liofilitzats i es posà una quantitat de 20µl del preparat a cada tub per la posterior addició i lectura de les mostres, s'incubaren durant uns quinze minuts perquè es recuperessin les bactèries i comencessin a emetre llum. Llavors es posà 0.5ml de cada mostra de dilució dels diferents sòls i es féu una primera lectura, que es repetí al cap de 30 minuts. Si la bioluminiscència disminueix ens aquest temps, podria indicar la presència d'alguna substància tòxica. La mesura de la reducció de l'emissió de llum s'expressa segons la dosi efectiva 50 (EC<sub>50</sub>), concentració que produeix una reducció del 50% de la llum emesa pel control. També s'expressen com a unitats de toxicitat o unitats Equitox que suposa (Equitox= 100/EC<sub>50</sub>).

#### Resultats i Discussió :

Tot i que aquest test és molt utilitzat i totalment comprovat, pot haver casos en que no marqui la possible existència de substàncies tòxiques que no poden penetrar la membrana o afectar als bacteris, o pot ser també que hi hagi substàncies al sòl que interfereixin a les lectures, facin com de pantalles, i llavors els valors no siguin correctes.

Els resultats obtinguts van ser valors elevats de bioluminiscència en tots els casos. Es va trobar algunes variacions poc usuals en les mostres de C1, que ens va fer pensar que l'extracte podia haver estat no ben preparat en aquest cas, hi podia haver moltes substàncies que interferien en la lectura, o realment que no hi hagués substàncies tòxiques per aquests bacteris, però degut a l'estrany resultat en els valors, es va pensar més en les dues primeres possibles opcions, i caldria repetir doncs les proves.

Potser la manera de preparar l'extracte no va ser la més adequada en aquest cas, i haguera estat convenient utilitzar un dissolvent orgànic com el DMSO, i per això no es van obtenir resultats suficientment conclusius, perquè no es detectaria cap substància tòxica en aquest tipus d'extracte.

Aquest tipus de test detecta possibles substàncies tòxiques, però no vol pas dir que aquestes substàncies siguin genotòxiques, poden o no ser-ho, així doncs en el cas que els resultats haguessin sigut correctes i ens haguessin donat positius, ho podríem relacionar amb el comet test però fins a cert punt, tenint en compte aquesta limitació.

Pels resultats obtinguts no es pot concloure que hi hagi o no presència d'algun tipus de tòxic. Caldria doncs repetir els experiments, canviar la manera d'aconseguir l'extracte o buscar algun altre tipus de test de toxicitat en aquest cas.

---

### **1.B. Conclusions del capítol:**

1. A partir dels resultats obtinguts en aquest capítol, per les zones analitzades de l'abocador, en les dues espècies estudiades (*Apodemus sylvaticus* i *Allolobophora caliginosa*) amb l'avaluació de les mostres pel SCGE, i el MNT en el cas dels ratolins i del SCGE en el cas dels lumbrícids, es pot considerar que l'abocador de Garraf tindria una influència, a nivell d'efectes al DNA sobre les espècies estudiades. Ja que podem veure que en les zones afectades per l'abocador s'obtenen valors superiors de dany al DNA que en les zones control, pels dos casos.
  2. En aquesta primera prova doncs, de la valoració de la tècnica del SCGE sobre aquest tipus de contaminació en aquestes espècies animals, es podria dir que el comet test podria ser utilitzat com a una primera avaluació ràpida de la situació de contaminació de tipus genotòxic en el medi ambient en aquestes dues espècies (les quals es poden utilitzar com a sentinelles per a aquesta mena de contaminació, més clarament pel ratolí de bosc, i amb algunes reserves de moment, pel lumbrícid utilitzat). Així, la seva contribució o primera anàlisi en aquest estudi seria molt avantatjosa, degut a la seva rapidesa, sensibilitat, i a que la seva realització és alhora relativament econòmica; essent el sistema de recollida de mostres el menys invasiu i menys perjudicial possible per a les espècies, ja que es necessita poca quantitat de mostra, i en el cas dels cucs seria un bon sistema per a la utilització de sistemes alternatius en l'experimentació amb vertebrats, i en el que també permet la recuperació de l'individu.
-

## Capítol 2

---

### 2. COMET TEST EN L'AVALUACIÓ DE LA POSSIBLE CONTAMINACIÓ DE TIPUS GENOTÒXIC EN MOSTRES DE TERRA DE DOÑANA

---

#### 2.A. Introducció :

El 25 d'Abril de 1998, es va produir el despreniment d'una part del mur de contenció d'una de les basses de productes residuals de les extraccions de la mina a cel obert d'Aznalcóllar, mina dedicada a l'extracció de Zn i Cu, situada aproximadament a uns 60 Km del Parc Natural de Doñana, (Solà et al.2000). Aquest dipòsit contenia més de 5 milions de metres cúbics de residus, incloent partícules fines de pirites, fangs i aigües àcides residuals. La riuada tòxica va baixar pels rius Agrio i Guadiamar, inundant totes les terres del seu voltant en una franja de fins a 500 metres d'amplada. Entre 2 i 5 milions de m<sup>3</sup> de llots, van fer un recorregut de 40Km, decantant en la llera i les riberes del riu fins arribar al principi de la zona d'Entremuros on el gruix dipositat va ser mínim; però l'aigua àcida va recórrer uns 20 Km més fins a ser detinguda per l'últim dic que es va construir molt a prop del parc; una setmana més tard, però, es va transvasar aquesta aigua a través del Brazo de la Torre cap el Guadalquivir, contaminant així també el seu estuari amb metalls pesants (Solà et al 2000).

Així doncs l'aigua àcida i el fang del vessament van afectar un àrea de fins a 6000ha., que inclou el sistema aquàtic (afectant els rius Agrio i Guadiamar, afluents del Guadalquivir), i l'ecosistema terrestre, on va afectar també zones de conreus localitzades dins l'àrea del Parc Natural (Vidal et al.,1999). Unes 4100 ha. de cultius, arbredes, i prats van ser coberts per una capa de llots, que a prop de la mina arribava fins a 1.7m de gruix. Després de la riuada àcida i de la deposició de fangs, es van oxidar parcialment les capes de la superfície en espècies de sulfur de ferro, donant una precipitació d'òxids de ferro. Durant aquest període es van produir pluges que formaren una quantitat de lixiviats d'espècies solubles que van ser absorbides pel sòl (Vidal et al.1999).

Per tant, hi ha un clar efecte contaminant i tòxic a curt termini, que inclou mort de peixos, i altres animals, degut a les riuades àcides i també a la deposició de grans quantitats de llots; a llarg termini, tot i les mesures preses per intentar treure al màxim la contaminació i evitar que s'estengués, també tindrà repercussions. S'han retirat els llots diverses vegades així com una part del sòl. Però el treball de les màquines van fer barrejar part d'aquest fang amb la terra, i també que s'escampés, hi ha parts inaccessibles per les màquines que cal treure-ho a mà, llavors, la retirada no és total. A més hi ha partícules de pols escampades pel vent i pels treballs de les màquines, les pluges que provoquen i arrossequen lixiviats dels fangs amb continguts de metalls

---



pesants, que es colen per les esquerdes cap a profunditats superiors. Depèn molt també dels tipus de sòl afectats, la contaminació tindrà més o menys efectes. S'han tractat de forma físico-química mostres de sòl (ex: afegint calç, etc...) per a equilibrar els pH, etc.... Però l'efecte tòxic encara hi és, i hi ha moltes espècies animals que s'alimenten en aquesta zona, les plantes acumularan metalls, i en la cadena tròfica s'anirà acumulant en cada esglaó de manera diferent segons les espècies, arribant a nivells letals provocant morts prematures o a nivells sub-letals, que els afectaran de diverses maneres, fisiològicament, i segurament també en la reproducció, etc... aquest serà l'efecte a més llarg termini. Hi ha ja estudis fets en espècies que viuen, s'alimenten, i neixen en aquesta zona, (un exemple, Pastor et al.2001, fa un estudi utilitzant el SCGE en *Ciconia ciconia*).

Així com ja he comentat doncs, les primeres mesures preses per a pal·liar la contaminació a partir de llavors van ser l'extracció dels llots contaminats i també els primers centímetres de sòl, amb màquines i camions, i tornar-los a portar a la mina. Aquests fangs contenien una elevada quantitat de metalls pesants. Els que estan en concentracions potencialment més perilloses són el zenc, plom, arsènic, coure, cobalt, bismut, tali, cadmi, mercuri i antimoni. Encara després d'un any de l'accident hi havia un 5% de llots, i les concentracions d'aquests metalls pesants tenien valors de 6 a 15 vegades superiors als valors considerats normals, essent molt difícil de solventar aquest tipus de contaminació. Els metalls pesants no poden ser degradats biològicament ni químicament en la naturalesa. La seva persistència en el medi ambient i la seva mobilitat, i el fet que es poden bioacumular en els organismes, fa que siguin potencialment molt perillosos, (Solà et al.2000). La seva toxicitat pot ésser de molts tipus, tant letal com sub-letal, afectant llavors la fisiologia de l'organisme i provocant grans alteracions, en les que estan incloses el comportament i la reproducció.

Tots aquests problemes de la contaminació per l'elevada concentració de metalls pesants, es veuen agreujats pels pHs tan àcids de les aigües i fangs tòxics. El pH àcid, fa que canviï la mobilitat d'alguns metalls (Vidal et al.1999), així doncs es va veure que els metalls més mòbils serien Cd i Zn, els quals arribarien a contaminar àrees més llunyanes ja que serien arrossegats per les aigües àcides, amb una mobilitat intermèdia hi hauria el Cu, mentre que el Pb, As, Bi, Tl no serien mòbils (Vidal et al.1999); un altre problema és la mida de les partícules dels sediments, hi ha una gran quantitat que són prou petites per ser respirables, cosa que implicaria una altra font de contaminació i de toxicitat. Amb tot el procés d'extracció dels fangs per màquines i camions, es va aixecar molta pols, respirable per la població, treballadors, i altres organismes, pols que es pot escampar bastant, i llavors també hi havia la barreja produïda per les rodes de les màquines al treballar, tot això fa que hagi quedat encara nuclis de fangs contaminats barrejats amb la terra, per una banda, i que s'hagi pogut escampar la contaminació per aquests metalls per l'altra.

La majoria d'aquests metalls són elements traça, es necessiten en els éssers vius en quantitats molt petites, formant alguns part d'estructures cel·lulars, presents en moltes proteïnes, enzims, etc...(Solà et al.2000; Goyer&Cherian1995). En quantitats tan elevades com es donen en aquest cas, són realment tòxics, inclús letals. Els metalls pesants són bioacumulables pels éssers vius i no poden ser degradats per la naturalesa, ni biològica ni químicament, per tant, degut a la seva permanència al medi ambient, com a la seva mobilitat (que augmentaria a pH àcids, Ma et al 1983; Mueller et al, 1993; Straalen & Bergema, 1995; Walker et al.1996; Weltje 1998; com es

donaria en aquest cas, Vidal et al.1999), els fa altament contaminants i perillosos. Un dels mecanismes de destoxicació dels organismes consisteixen en “amagar” els ions de metall actius dins una proteïna com la metaltioneïna (units covalentment a un sulfur), o dipositant-los en una forma insoluble en uns grànuls intracel·lulars pel seu emmagatzematge a llarg termini, o la seva excreció en les femtes (Walker et al.1996).

És conegut que metalls com l'As, Cr (VI), Ni(II), són carcinògens humans, el Be, Cd són probablement carcinogènics en humans, i el Co, Pb i certs complexos de Fe, tenen efectes carcinogènics en animals, el Ni, Co, Cu, Mn poden causar tumors en certs animals i humans, etc... (Goyer & Cherian, 1995). Els mecanismes en que poden produir la genotoxicitat són molt diversos, des de causar espècies reactives de l'oxigen, fins a inhibir enzims de reparació (ex. As (III)), o enzims antioxidants, etc... Aquestes espècies reactives són importants perquè poden unir-se al DNA, causar trencaments de cadena, i *cross-links*, etc.. alguns metalls poden induir una acció clastogènica i mutagènica (Goyer & Cherian, 1995) a determinades concentracions, ja que, no cal dir que hi ha metalls que són part integral d'estructures cel·lulars o formen part de molècules importants, i els elements traça són requerits en petites quantitats, però si es passen els límits, poden causar molts problemes, no sols de provocar deficiències d'elements essencials degut a la competència amb els llocs actius en molècules biològicament importants, alterant la seva funcionalitat sinó també per a tot el que ja he comentat. Per això és important l'estudi de l'efecte i concentració de metalls pesants. En aquest capítol es pretenia més intentar veure com afectaven aquestes mostres contaminades a nivell genotòxic, en una espècie que es va utilitzar en l'anterior capítol com a bioindicadora, amb l'aplicació del comet test com a una tècnica per a un primer *screening* de la situació.

Com ja havia comentat anteriorment, els cucs de terra s'han utilitzat moltes vegades com a indicadors en estudis de valoració de la contaminació ambiental o en estudis dels efectes de determinades substàncies, tant a nivell de substàncies químiques contaminants (Van Gestel & Ma, 1988; Haimi & Paavola, 1998; Meier et al.1997; Ma et al.1998; Burch et al. 1999; Eason et al.1999; O'Halloran et al.1999; etc..) com a nivell de metalls (Ma et al.1983; Beyer & Cromartie, 1987; Mariño et al.1994,95,96,99; Pižl & Josens, 1995a,b; Spurgeon & Hopkin, 1995,96; Šalagovič et al. 1996; Chmielewská et al., 1998; Kille et al. 1999; Reinecke & Reinecke 1999; Morgan et al 1999, entre molts d'altres), en molts casos, en quan a la mesura de l'acumulació i efectes d'aquests metalls. La seva importància en estudis d'ecotoxicologia terrestre com a biodindicadors de la contaminació és evident, no sols per com els afecti i pugui repercutir en ells i les conseqüències que pugui portar a nivell de sòl, sinó també a nivell de la influència en la xarxa tròfica, ja que són presa per a gran quantitat d'animals i ens podrien indicar el risc en la cadena alimentària (Abdul & Bouché, 1992). Així doncs, valorar la contaminació i possibles efectes en una espècie que farà de sentinella per indicar-nos la possible contaminació i els seus riscos, és realment interessant.

Un cop més es va escollir l'espècie d'*Allolobophora caliginosa* degut a que és una espècie freqüent (Bouché 1972), està àmpliament distribuïda per a tota la Península Ibèrica i és present a quasi tot tipus d'hàbitat, des de prats, cultius, a boscos, etc... des de llocs amb més quantitat de matèria orgànica, a llocs més pobres, des de llocs humits a més secs, i de llocs de pH bàsics a una mica més àcids, com també vivint a rodalies de llocs salobres, té gran plasticitat en quan a humitat, temperatura i relació C/N del sòl, etc.. (Jesús et al. 1981). És una espècie molt eurioica, té una gran capacitat d'adaptació a tots els factors ambientals i edàfics (Álvarez, 1971). Com ja he comentat anteriorment, els cucs han sigut molt usats en l'avaluació ambiental com a bioindicadors o marcadors biològics de metalls pesants (Beyer & Cromartie, 1987, entre molts d'altres), organoclorats, i altres substàncies tòxiques. En aquests treballs troben relacions entre les concentracions d'alguns metalls en els cucs i la concentració en els sòls on viuen, però cal tenir cura en la interpretació dels resultats ja que l'acumulació de contaminants en els teixits varia segons les espècies, segons la dieta, mida, edat, etc ..., i segons les característiques i tipus de sòl i altres factors físics; el pH i la quantitat de calci, la humitat, la quantitat de matèria orgànica, l'intercanvi catiònic, la capacitat del sòl, etc.. són factors importants en la biodisponibilitat, sobretot el pH, ja que una disminució d'aquest fa que siguin més solubles els metalls i llavors es tornen més disponibles pels organismes (Ma et al. 1983; Straalen & Bergema, 1995; Walker et al. 1997; Weltje 1998, etc...), un exemple seria que *A. caliginosa* a pH baixos incrementa l'acumulació de Cd (Edwards, 1998), ja que el Cd es torna molt més soluble a pH àcids). La pell dels cucs es considera la via dominant d'absorció de substàncies químiques, però els metalls pesants també poden ser absorbits en la ingestió del sòl (Weltje, 1998). Cal tenir en compte però, que la majoria del contingut de metalls pesants ingerit amb el menjar, no és absorbit (no està biodisponible), però passa per l'intestí i és excretat, és important doncs, conèixer la part absorbida i com passa a la cadena tròfica. Els metalls no s'acumulen en totes les espècies de la mateixa manera ni al mateix lloc, i hi ha també sistemes de destoxicació, (Lee, 1985).

En diversos estudis centrats en cucs, s'han obtingut valors de concentracions perjudicials de determinats metalls com el Cu, Zn, Hg, Co, (Lee 1985), Cd, Cr, Zn (Van Gestel et al. 1993), etc..., les quals són variables en uns tipus concrets de sòl i per a determinades espècies de cucs, els afecta de manera letal, o altera la reproducció, la producció de capolls, o el seu desenvolupament, etc... Indicant doncs, la toxicitat d'unes determinades concentracions de metalls per als cucs, que poden ser variables segons les espècies. S'ha de tenir en compte, el possible efecte sinèrgic o antagònic quan es tracta d'una barreja de metalls, les característiques del sòl, i de l'espècie, per a la seva acumulació i els efectes, hi ha moltes variables que hi intervenen, segurament això podria explicar la diferència de valors entre diversos autors. Així també, s'ha de considerar que determinades espècies de cucs de terra poden contenir altes concentracions de metalls (com el Pb, Zn, Se) en absència de cap contaminació al medi ambient (Beyer & Cromartie, 1987); poden acumular determinats metalls com el Cd, en més concentració que la que es troba en el sòl on estan, (tot i que per *A. caliginosa*, s'han trobat bones correlacions de les concentracions de certs metalls pesants al sòl i al cuc; Mariño et al. 1996), i s'ha vist que poden tolerar grans concentracions d'alguns metalls pesants, o no els absorbeixen, o els poden regular (Beyer & Cromartie, 1987; Van Gestel et al., 1993; Neuhauser et al. 1995; Mariño et al. 1996). Els poden acumular en formes no tòxiques (és conegut que els cucs poden immobilitzar el Cd, en el teixit cloragògen lligant-lo a proteïnes com les metaltioneïnes, Beyer et al. 1982; Van Gestel et al. 1993, això també fa que sigui biològicament disponible per a les espècies que mengen

cucs, Beyer et al.1982; o en vesícules, lisosomes al citosol ,Reinecke & Reincke,1999; el Zn també es pot associar a aquestes proteïnes però la seva unió seria reversible, Van Gestel et al.1993; o el poden acumular en forma de grànuls en els cloragosomes com el Pb, Reinecke & Reinecke,1999), poden excretar els metalls acumulats en les cèl·lules cloragògenes, o en les cèl·lules calcíferes (el Pb pot ser excretat en la substitució del Ca en l'excreció normal d'aquestes glàndules, Reinecke & Reinecke, 1999) en forma de grànuls, pels nòduls d'excreció, etc.. Així doncs, semblaria que els cucs de terra tenen mecanismes d'immobilització i excreció de metalls pesants a través de les cèl·lules cloragògenes, glàndules calcíferes, i nòduls d'excreció (Lee 1985; Pižl & Josens, 1995a,b).

D'entre molts dels factors que poden intervenir en augmentar l'absorció dels metalls en els cucs, el pH seria un dels més rellevants, però en aquest cas, a més va ser important considerar-lo prèviament degut a les característiques d'algunes de les mostres, fortament acidificades, això ens va plantejar, no sols l'efecte que varia la mobilitat d'alguns metalls i per tant poden ser més biodisponibles pels cucs, sinó primerament i més important, el fet de comprovar si aquesta espècie podia viure en aquest pH. En quan a les característiques d'aquesta espècie es va trobar una mena de discrepància entre varis autors. *A.caliginosa* seria una espècie neutròfila i fortament àcid-tolerant segons Bouché 1972, però alguns han vist que no tolera pH àcids (Edward & Bohlen 1996), i per altra banda, altres indiquen que poden arribar a tolerar pH bàsics fins a 10.7, s'han trobat en molts diferents pH segons el tipus de sòl i la zona en que s'hagin mostrejat. Així, els rangs que donen de pH els diversos autors, varien (tal com comenten Jesús et al.,1981 i Sánchez et al.,1997), però semblaria que hi hauria més majoria en indicar que és una espècie més neutròfila, i nosaltres vam poder comprovar amb els individus utilitzats en aquestes mostres, que no aguantaven pH àcids inferiors a 4.5.

Hi ha altres estudis realitzats en substàncies contaminants al medi ambient centrats en aquesta espècie, degut a la seva abundància, fàcil obtenció i més susceptibilitat a determinades substàncies que altres espècies (O'Halloran et al.1999).

El dany al DNA és un esdeveniment crític, no només en la fase d'iniciació, sinó en la de promoció de la carcinogènesi, per això té una rellevant importància els seu estudi, i així hem volgut aplicar el comet test en estudis d'aquest tipus, ja que molts d'aquests metalls pesants poden induir dany al DNA i ser cancerígens a determinades concentracions. Molts d'aquests metalls no poden ser metabolitzats enzimàticament, i poden reaccionar amb components endògens produint espècies reactives, o radicals que poden causar dany al DNA o alterar els mecanismes de reparació, o els de defensa antioxidants, o causen directament dany al DNA en forma d'*adducts*, o trencaments,etc...(Goyer & Cherian, 1995).

La utilització de la tècnica del comet test per estudis d'aquest tipus és realment interessant. Quedaria palès en un treball realitzat en mostres de cigonyes (*Ciconia ciconia*) de Doñana per mesurar l'efecte del vessament a nivell de dany genotòxic (Pastor et al.2001), en el que troben diferències entre les aus nascudes al cap d'un any del vessament, respecte els controls. Aquestes aus s'alimenten en aquesta àrea, llavors es pot veure com els afecta aquest tipus de contaminació a través de la cadena tròfica. És molt interessant veure els resultats d'aquesta tècnica per aquests tipus d'estudis.

Hipòtesi:

- S'esperaria trobar valors superiors de dany en *A.caliginosa* en les terres afectades pel vessament respecte les zones de referència de la mateixa àrea (no afectades per la riuada tòxica) i les control.

Objectius :

- Realització del Comet Test en cucs de terra exposats a diverses mostres de terra de varies zones afectades pel vessament d'Aznalcóllar, i de zones properes no afectades per l'arribada de les aigües contaminades i el llot.
- Comparació i relació dels resultats obtinguts amb el Comet Test amb les anàlisis químiques de les mostres de sòl
- Veure el possible efecte genotòxic mesurat pel test del cometa en *A.caliginosa* exposada en mostres de terra afectades per una alta concentració de metalls pesants. Aquestes mostres de terra van ser recollides un cop ja s'havien retirat els fangs, i amb aquests, una part dels contaminants de la zona, però, tot i així encara contenen una elevada concentració de diversos metalls pesants.

Pla de treball:

- Obtenció d'una espècie abundant i autòctona de cucs de terra adient per a l'estudi.
- Obtenció de mostres de sòl de diverses àrees afectades per la contaminació a la zona de Doñana i d'una àrea propera no afectada pel vessament.
- Exposició dels lumbrícids en mostres de terres contaminades durant uns dies.
- Establir alguna relació entre els resultats de la contaminació genotòxica obtinguda pel Comet Test amb els valors de les anàlisis químiques dels sòls.

## 2.B. Material i Mètodes :

Mostres de terra:

Les mostres de sòl van ser recollides el 12 de gener de l'any 2000, en diverses zones de l'àrea afectada al llarg del riu Agrio, al mateix temps es recolliren mostres situades a uns metres del riu, on no va arribar el vessament, que considerarem de referència per a l'estat de la terra en aquella zona sense estar influenciada per la contaminació deguda a aquesta riuada tòxica.

Durant aquest any i mig després del vessament i abans de la recollida de mostres, hi ha hagut molts canvis a la zona, ja que es van extreure tots els llots afectats i es van practicar tot de mesures per disminuir el possible la contaminació causada per l'accident. No obstant, tal com ja havia comentat anteriorment, el treball de les màquines i els camions en aquesta zona durant aquest temps, ha fet que es barreassin les terres, s'aixequés pols, i s'escampés la contaminació, quedant encara nuclis molt afectats en aquest període en que es van recollir les mostres. Degut a la magnitud de la contaminació, i malgrat totes les mesures preses per a solventar-la, la

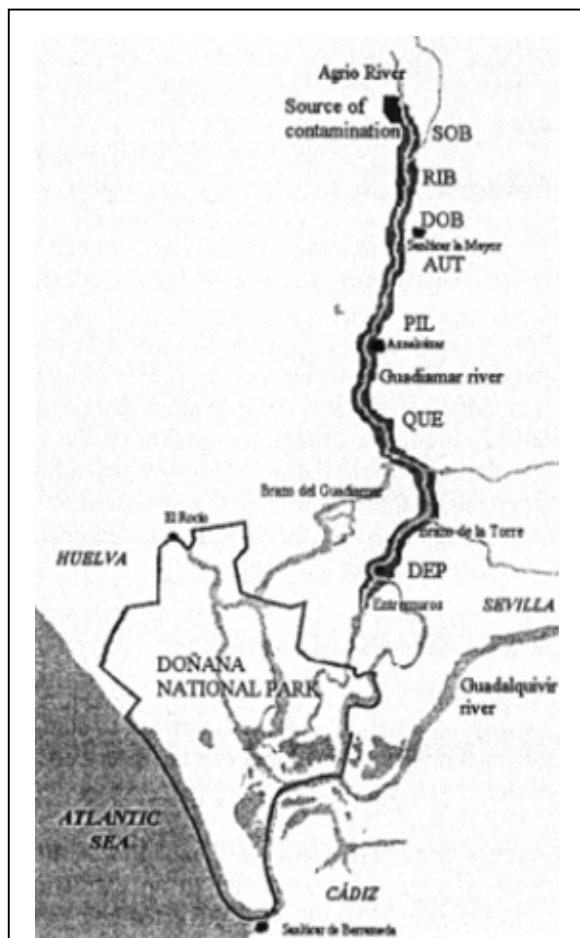
---

contaminació continua essent evident, i els seus efectes s'aniran manifestant durant un cert temps.

**Fig. 2.1.** Mapa de la zona amb els punts d'estudi:

Les àrees d'on es té mostres de sòl estan marcades al mapa i corresponen a:  
Mostra:

- 3RIB : Zona de la Ribera , la més propera a la mina.
- 3RIB ref : Zona de la Ribera, punt de referència, no afectat pel vessament.
- 3PIL : Zona del Puente d' Aznalcázar - Pilas.
- 3QUE: Zona de Vado del Quema.
- 3QUE m.o. : terra de la zona de Vado del Quema , on es va posar matèria orgànica per intentar equilibrar el pH.
- 3QUE ref.: Zona de la mateixa àrea que l'anterior però no afectada pel vessament.
- 3DEP o 3CS : zona de la Depuradora Sud, la més allunyada de la mina però més propera a la zona d'Entremuros.
- 3CS ref.: zona no afectada pel vessament i situada en l'àrea de la Depuradora Sud.



Nomenclatura de les àrees de mostreig: Les lletres es refereixen a la zona on es van recollir les mostres, el número 3 davant del nom, indica que va ser el tercer mostreig de la zona. Quan darrera el nom de la mostra hi ha "ref." significa que són les mostres de referència. Aquestes mostres de terra van ser proporcionades pel grup de recerca de la Dra. Rubio i el Dr. Vidal de la Facultat de Química de la UB, i vaig utilitzar la seva mateixa nomenclatura.

. Procediment:

- En mostres de 300grams de terra es posaren 9 cucs( *Allolobophora caliginosa*) durant 48h.
- Els cucs no estaven en època reproductora, els pesos dels exemplars eren similars (entre 0.3-0.6grams) per a cada mostra.
- Es va humitejar la terra amb aigua destil·lada pulveritzada fins aconseguir un 20% d'humitat (entre el 20-45% d'humitat és l'adequat per aquesta espècie en terra argilosa, Edwards & Bohlem, 1996), la utilització d'aigua destil·lada permet que l'aigua estigui neta de possibles sals que podrien fer variar la forma o biodisponibilitat dels metalls pesants, o altres xenobiòtics que puguin haver a les mostres de sòl, i canviarien les condicions d'exposició d'aquests en aquest medi).

Les mostres de sòl en que es van exposar els cucs, són les indicades en la Fig.2.1, on hi ha mostres afectades per la riuada tòxica, i d'altres mostres de referència de la zona en que no van ser afectades pel vessament. Es va utilitzar també una mostra preparada al laboratori (STD1: terra estàndard: terra argilosa amb escorça de pi en proporció 3:2), i una mostra control, recollida en una zona on suposadament no hi ha cap font de contaminació.

Degut als problemes de la gran contaminació en algunes de les mostres de sòl de Doñana, aquest cop no es va exposar els cucs durant cinc dies a la terra problema, sinó menys temps, tot i que pot existir els problemes d'adaptació a la terra. Es va considerar que pel grau de contaminació de les terres seria suficient una exposició de 48 hores per veure algun efecte mesurat amb el comet test (tal com Šalagovič et al. 1996), sense necessitat de fer un test , (que en aquest cas resultaria més de citotoxicitat que no pas de genotoxicitat), de més dies, ja que es va creure suficient temps per detectar efectes sense necessitat d'arribar a la mort de l'animal. Es va comprovar però més tard que en algunes mostres sobreviuen durant diversos dies.

Un problema afegit en aquest estudi va ser les característiques de les mostres de sòl, no sols per la gran concentració de metalls pesants, sinó també pel fet que hi ha una barreja de diversos metalls, i que aquests poden estar distribuïts irregularment en la terra, més concentrats en les boles de fang que es podien veure a simple vista barrejades amb la terra, (per exemple, es podia veure en forma de boletes grises i compactes, precipitats de sulfur de ferro). No es van homogenitzar les mostres perquè es pretenia veure com actuarien els individus en mostres en aquestes condicions, si esquivarien aquestes concentracions o no, i com respondrien al processament d'aquestes terres.

Un altre punt problemàtic va ésser l'acidificació de les mostres, algunes arribant a pHs realment baixos, com la mostra RIB i QUEm.o, on els valors de pH són de 3-4 i 2.4 respectivament, i en aquests experiments vam poder observar que aquests pHs no permetien la supervivència de l'espècie estudiada, malgrat que com ja he comentat abans, hi ha discrepàncies entre diversos autors sobre l'interval tolerat per aquesta espècie. Aquesta, és molt adaptable a diferents tipus de sòl, però el que nosaltres vam poder comprovar és que no resistia aquestes terres i ho vam atribuir al pH, ja que la reacció era immediata al posar els cucs a la mostra de sòl.

Una altra dificultat va ésser la salinitat en les mostres més properes al mar, ja que hi ha un contingut elevat de sals, es va pensar que era un altre factor que impedia la viabilitat dels individus testats en alguna d'aquestes mostres.

Així es van fer prèviament als experiments, unes proves de les terres a diferents dilucions (25, 50, 75, 100%) amb terra estàndard 1 (la barreja preparada de terra argilosa amb escorça de pi, en proporció 3:2), posant de 2 a 3 cucs per mostra i fent un seguiment visual de l'estat d'aquests diàriament fins a 10 dies (si es que hi arribaven), i així escollir les dilucions que permetessin almenys la viabilitat dels individus, encara que això causi una major dificultat en la interpretació dels resultats ja que també s'està diluint la concentració dels metalls pesants i s'està canviant les condicions del sòl. Šalagovič et al. (1996) també va fer dilucions de terres en les mostres d'una zona contaminada (barrejant-les amb la terra control preparada al laboratori en que mantenien els cucs).

. Obtenció de suspensió cel·lular:

(Modificació del protocol donat per l'Eyambe et al.,1991). Aquest protocol per a obtenir la suspensió de cèl·lules és el mateix que l'explicat a l'apartat 1.2.b. del capítol anterior.

- Es van utilitzar cucs sense estar en època de reproducció i tots d'una mida i pes similars. Mantinguts en un preparat de terra control després de ser recollits al camp, per adaptar-se a les condicions de laboratori.
  - Rentar els cucs amb solució salina a temperatura ambient. (0.57g/100ml NaCl, ajustat a 210mOsm segons Diògene et al.,1997) i a pH=7.3.
  - Posar el cuc sobre un paper humit amb aigua de l'aixeta i fer el massatge a partir de la part  $\frac{1}{4}$  posterior del cuc per fer que expulsi la matèria orgànica que pugui tenir i així no contaminar o emmascarar la mostra de cèl·lules que s'extreurà (Eyambe et al.,1991).
  - Posar el cuc en un tub de centrífuga i posar-li 3ml de líquid d'extrusió a (98% de salí, 2.5mg/ml d'EDTA sòdic, 10mg/ml de GGE i 2% d'etanol absolut) a temperatura ambient i a un pH de 7.3 durant 3 minuts. (Es posa primer el cuc i a sobre la solució perquè no l'afectin tant els vapors de l'etanol; Diògene et al.,1997)
  - Treure el cuc i posar-lo en un tub amb 6 ml de salí+ GGE (salí:0.57g/100ml de Nacl + 10mg/mlGGE) a 4°C i a pH=7.3 durant 6 minuts.
  - Treure els cucs, rentar-los amb salí i tornar-los a la terra.
  - Afegir els dos líquids.
  - Centrifugar a 500g (~2000rpm) durant 7 minuts.
  - Treure el sobrenedant i llençar-lo.
  - Afegir 4 ml de salí( sense GGE) a 4°C i pH=7.3.
  - Centrifugar a 500g (~2000rpm) durant 7 minuts.
  - Treure el sobrenedant i llençar-lo.
  - Resuspendre en 0.5ml de salí (sense GGE).
-



Preparació de les capes d'agarosa i Comet Test:

- En portaobjectes normals (preparats prèviament amb una capa d'agarosa estàndard assecada a l'estufa per fer de suport per la següent capa d'agarosa, i com a substitut dels portaobjectes rugosos )es fa una primera capa de 85 µl d'agarosa de punt de fusió normal, preparada a l'1% en PBS (1%).
- Es posa un cobreobjectes de 24x24mm, i es deixa uns 5 minuts en una placa metàl·lica situada sobre una cubeta amb gel perquè solidifiqui.
- Es retira el cobreobjectes i es passa a posar la segona capa d'agarosa: es barregen bé 35µl de suspensió de cèl·lules amb 85µl d'agarosa de baix punt de fusió (al 0.9% amb PBS) mantinguda a 37-40°C per no afectar les cèl·lules. I es posen 85µl de la barreja. Es posa un cobreobjectes a sobre i es deixa de 5 a 10 minuts en una placa metàl·lica sobre gel, perquè solidifiqui bé.
- Es retira el cobreobjectes i es posen els portaobjectes en una cubeta amb líquid de lisi (NaCl al 2,5M, EDTA disòdic 100mM, Tris 10mM, NaOH per ajustar el pH a 10, i just abans de la seva utilització s'afegeix DMSO al 20%, Triton a l'1%) a 4°C i a pH 10.
- Es guarda a la nevera i tapat (per evitar que la llum pugui causar algun dany addicional al DNA), durant 2 hores per permetre la lisi alcalina de les membranes.
- 20 minuts en tampó per electroforesi fred (pH:13.3), i en foscor, per permetre el desenrotllament de les cadenes i desnaturalització del DNA.
- Electroforesi en fred i en foscor durant 20 minuts. A 25 v i 300 mA.
- Tres rentats, els dos primers de 5 minuts i l'últim de 10 minuts amb tampó neutralitzador Tris a pH:7.5.
- Tinció amb 20 µl de DAPI, en comptes dels 65µl de les vegades anterior (perquè hem fet també les capes més petites en aquest cas), i per intentar que quedin millor les capes no sobretenyides i així es visualitzin millor.
- Els comptatges es van realitzar de la mateixa manera que en el capítol anterior. Breument: comptatge visual establint 5 categories establertes per a les diferents imatges dels cometes, en la que es multipliquen per uns coeficients establerts, i es sumen donant un valor de IC (*Comet Index*).

En aquest cas el protocol per al comet test seria exactament igual que l'utilitzat en el capítol anterior, però tan sols amb les diferències en: la mida dels cobreobjectes que en aquest cas era menor, de 24x24mm enlloc de 24x60mm, ja que s'intentava concentrar més el nombre de cèl·lules degut a que en cucs no obteníem un nombre gaire elevat d'aquestes. Així doncs també es va augmentar la concentració cel·lular en les capes d'agarosa, passant dels 20µl a 35µl. I la tinció amb DAPI, per intentar que no hi hagués un excés de colorant es va passar de tenyir amb 65µl a 20µl en aquest cas.

---

## 2.C. Resultats :

**Taula 2.1.** Resultats del comet test per a les mostres de sòl:

48h	3RIB	3RIBref	3PIL	3QUE	3QUEm.o.	3QUEref	3DEP	3DEPref	STD1	Control
Dilució	50%	-	-	-	50%	-	75%	75%	-	-
IC	46.29**	51.46	53.66	56.91	46.47**	60.38	47.67*	45.16*	42.72	46.27
SD	9.29	10.33	10.14	6.47	9.29	9.09	8.24	8.63	5.57	10.89
n	9	8	9	8	9	9	8	7	9	9
pH	6.67	-	-	-	6.05	-	-	-	7.34	-

Es van mesurar els pH de les mostres en que la terra tenia pH massa àcids i calia la dilució per equilibrar-lo, són els valors per les dilucions.

(\*) indica que hi ha una dilució del 75% de la terra problema amb terra estàndard.

(\*\*) indica una dilució del 50% de la terra problema amb terra estàndard. Cal anar alerta en la interpretació dels resultats per aquestes mostres en dilució.

IC: Comet Index; SD: desviació estàndard; n: nombre d'individus.

Aquestes mostres de sòl corresponen a les recollides el gener de l'any 2000.

**Taula 2.2.** Valors d'arsènic en les mostres recollides el gener del 2000:

	3RIB	3RIBref	3PIL	3QUE	3QUEm.o.	3QUEref	3DEP	3DEPref
As(ppm)	196.39	-	-	815.58	487.52	-	23.54	15.99

Aquests valors són per a les mostres sense dilució.

En la zona d'on es va extreure la mostra 3QUEm.o., degut al seu alt grau de contaminació, es va afegir matèria orgànica per disminuir l'efecte tòxic i intentar neutralitzar d'alguna manera la contaminació, però pel que nosaltres podem veure en les anàlisis químiques d'aquestes comparades amb mostres de sòl de la mateixa zona sense haver afegit aquesta matèria orgànica (3QUE), es va aconseguir per una part diluir la quantitat d'arsènic (taula 2.2), però per l'altra es va donar una disminució de pH. Així doncs en la mostra 3QUEm.o., es va poder observar un pH de 2.45, en el que comprovarem que era impossible la vida per aquesta espècie de lumbrícid en aquesta mostra, tan sols amb l'observació del que passava posant-los en aquest sòl es podia veure la seva reacció al pH. Per permetre doncs l'experimentació amb *A.caliginosa* per a valorar l'efecte genotòxic d'aquests elements en aquesta mostra de sòl, es va diluir en terra estàndard preparada al laboratori, que va produir una compensació del pH fins a valors de 6.05, pH habitable ja per aquesta espècie. Però aquesta barreja fa variar les característiques de la mostra de sòl, la mobilitat i disponibilitat dels metalls pesants, i les condicions de la mostra per aquests individus, així doncs, és difícil la interpretació dels resultats, ja que no sols hi ha una dilució dels metalls pesants, sinó que en canvien les característiques de biodisponibilitat, i les condicions del sòl per a viure-hi aquesta espècie.

En la taula 2.2., es pot observar un valor molt elevat d'arsènic en la mostra 3QUE (815.58ppm), mentre que la mostra 3QUE m.o, va disminuir el contingut d'arsènic a la meitat (487.52 ppm), i els valors d' IC, són també més elevats en la mostra 3QUE (56.91) mentre és un valor més baix en la mostra 3QUEm.o (46.47), però no es poden comparar o relacionar directament els valors d'arsènic en aquestes dues mostres amb els d' IC, ja que en aquesta segona mostra (3QUEm.o), per al comet test, es va diluir al 50% amb STD1 (terra estàndard) per compensar-li el pH. No sabem el contingut d'arsènic d'aquesta dilució, perquè no es va poder fer l'anàlisi química d'aquesta, i al diluir-la amb una altra terra fa que puguin canviar les condicions en que es trobarien els metalls i en que s'absorbirien o afectarien als lumbrícid.

**Taula 2.3.** Determinació dels elements traça en el fang i mostres de sòl (valor de la mitjana en  $\text{mgKg}^{-1}$ ) de l'any 1998:

	1RIB2	1RIB2	2PIL	2QUE	QUEm.o.	2QUEref	2DEP	2DEPref	Fang
pH	3.55	4.34	6.50	6.61	-	8.30	8.00	7.93	-
Zn	647	158	844	1746	-	78	965	88	10707
Pb	516	221	1353	1495	-	25.2	68	32.5	7957
Cu	288	166	171	344	-	21.9	63	31.6	2126
As	261	105	622	766	-	18.4	17.2	12.1	5321
Cd	2.11	0.33	2.70	6.09	-	0.09	2.50	0.14	40
Tl	2.3	0.66	6.82	7.2	-	0.19	0.44	0.24	51

Aquesta taula correspon a alguns dels valors analitzats i recollits en l'article de Vidal et al.1999.

No hi ha valors per a la mostra QUEm.o., perquè encara no s'hi havia barrejat matèria orgànica en aquella àrea de la zona de Vado del Quema.

El número 1 davant el nom de la zona indica que era el primer mostreig, realitzat tan sols un mes després de l'accident, (es retiraven els fangs en el moment d'aquest mostreig), mentre que 2, indica la segona recollida de mostres a finals de juliol de 1998, quan ja s'havien retirat els fangs. En les taules anteriors hi ha el nombre 3, indicant el tercer mostreig, realitzat el mes de gener del 2000, però pels quals encara no tenim l'anàlisi de metalls realitzat, (sols per algunes mostres hi ha els valors per a l'arsènic, Taula 2.2).

## 2.D. Discussió :

Les mostres de sòl recollides per a dur a terme el SCGE en lumbrícid, s'agafaren un any i mig després del vessament. Malgrat tots els esforços per netejar l'àrea contaminada, amb les extraccions del fang i part del sòl, i altres tipus de mesures preses durant aquest període, la contaminació en aquesta zona continua essent elevada, i costarà molts anys i esforços per aconseguir uns valors de menor contaminació o efecte per les espècies de la zona.

Si comparem els valors recollits l'any 98 després de retirar els fangs (Taula 1.2), en el cas de l'arsènic, amb les mostres recollides el 2000 (Taula 1.3), es poden veure que són bastant similars, així doncs a falta de les darreres anàlisis químiques de les mostres recollides a l'any 2000 (que s'estan duent a terme en aquest moment), ens basarem en la comparació per als resultats obtinguts amb el comet test, amb aquestes dades publicades per Vidal et al.(1999), pensant que, tot i que poden i haurien d'haver variat durant aquest període (pot haver hagut una disminució de la quantitat de metalls pesants deguda a les mesures preses per a pal·liar el problema), poden ser valors bastant similars (ja que els mostrejors són relativament propers en el temps, període molt curt en quan a solventar un tipus de contaminació com aquest, llavors les variacions es considera que serien petites).

Els carbonats i el pH són variables relacionades i implicades en la mobilitat dels elements traça estudiats, així com també el tipus de sòl i les seves característiques. D'aquesta manera són importants els valors de Ca, Mg i de la matèria orgànica en el sòl, ja que els carbonats actuen de tampó de les aigües àcides. Tot i això, hi ha uns valors de pH àcids en moltes de les zones mostrejades, les mostres de la zona RIB per exemple, zona de la ribera del riu, degut a les seves característiques i la baixa quantitat de carbonats abans de la contaminació, fa que el pH sigui més àcid després d'aquesta,(Vidal et al.1999). Però una contaminació d'aquestes dimensions, seria de tota manera difícil de compensar per les propietats del sòl només.

Segons els resultats de les anàlisis de metalls pesants en aquestes zones, obtinguts en l'article de Vidal et al.(1999), totes les mostres amb elevada contaminació, que es mostren a la Taula 2.3, tenen valors de 10 a 15 vegades més elevats de concentració d'elements traça, i eren superiors als valors permesos per regulacions Europees, a excepció del Cd, amb quantitats que no sobrepassaven aquests límits. Però en les mostres de referència estudiades, també hi ha uns valors majors que els considerats normals o comparant-los amb altres zones sense contaminar (amb excepció del Cd), això ens indicaria l'efecte de la gran activitat minera contínua de la zona des de fa molts anys, un efecte de contaminació degut a la deposició de metalls per l'extracció minera (Van Geen et al.,1999; Palanques et al.,1999; Vidal et al.,1999), com també degut a la pròpia naturalesa geològica de la zona. Així també podem observar valors d'IC elevats en les mostres de referència, i fins i tot superior als valors de la mateixa zona en la part contaminada, com seria en el cas de 3QUE, i 3QUEref., que es podrien explicar, per una banda degut a aquesta explotació minera de fa anys (el nom del riu Agrio, indicaria valors àcids degut a la quantitat de metalls que conté ja antigament a causa d' aquestes explotacions, Prat et al. 1999 i Solà et al.2000), o per l'altra, pot haver algun problema pel pas de les màquines treballant en la retirada dels fangs, que amb les rodes trepitgen els fangs i es pot barrejar amb les terres dels voltants, o la

pols que pot ser escampada pel vent, però en l'anàlisi de les mostres 2QUEref hi ha valors menors de metalls que en les 2QUE, per tant es pot pensar que en les anàlisi químiques posteriors no realitzades encara sobre la mostra 3QUEref es podria trobar valors similars al del segon mostreig (2QUEref) i per tant, menors a 3QUE (mostra de la zona contaminada). Així doncs, l'explicació de l'elevat IC en la mostra de referència d'aquesta zona (3QUEref) respecte la zona contaminada 3QUE, s'hauria d'explicar per alguna altra característica de la terra que tingués algun factor limitant o perjudicial per a l'espècie de cuc utilitzada, o potser degut a algun altre tipus de contaminació, com pesticides o altres que poden haver afectat aquesta zona i que afectarien als cucs. Abans però d'entrar en especulacions, haguera esta bó tenir l'anàlisi químic de les mostres en aquest tercer mostreig, per a poder comparar amb els valors de metalls de la segona recollida de mostres, veure si són similars o no, i aleshores intentar veure si hi ha una correlació, i si es poguessin equiparar als valors d' IC (majors per la zona de referència que per la contaminada).

La zona 3RIB, seria la zona més propera a la mina, i la que tenia uns valors de pH més àcids, degut això s'ha diluït la terra al 50%, per això resulta difícil ara comparar amb el valor de referència de la mateixa zona (tot i que és elevat degut segurament a l'activitat de la mina), amb els control, i els de les altres zones contaminades. Es pot considerar però, un nivell de contaminació, i uns possibles efectes tòxic i genotòxic per als éssers vius de la zona. En la mostra 3PIL, s'obté valors més elevats d' IC que els de STD1, per la concentració de metalls mostrada en aquesta zona en un mostreig anterior (2PIL), ens indicaria doncs una relació entre el dany al DNA i aquesta elevada concentració de metalls pesants.

La mostra més contaminada seria la 3QUE en la que els valors de tots els metalls pesants mostrats, són els més elevats, (hi hauria hagut una concentració dels fangs i aigües en aquesta zona). Ens mostra al mateix temps un valor elevat també d' IC, tot i que no resulta letal per a l'espècie de lumbrícid estudiada en l'interval de temps estudiat, ja que han viscut sense necessitat de diluir la terra, i els valors obtinguts d'IC, són elevats però sorprenentment surten menors als esperats en relació a la gran contaminació que conté. Tot i ser un dels valors més elevats obtinguts en l'experiment (descartant la zona 3QUEref, en la que ja he comentat abans la possibilitat d'algun altre factor que intervé en els resultats d'IC, algun altre tipus de contaminació, o potser ens indica el que passa realment, podent ésser que no coincideixi amb el mateix lloc de la recollida de mostra del segon mostreig, i que sigui una zona afectada mentre que s'havia considerat que no ho era), és difícil la seva comparació amb els valors de les mostres diluïdes de les altres zones, ja que la dilució canvia les característiques i condicions del sòl i fa complicada la seva interpretació.

Les mostres anomenades DEP o CS i la DEPref. van ser recollides a prop d'Entremuros, la que seria l'àrea menys contaminada de les que s'han mostrejat en aquest estudi, la més allunyada de la mina, on només van arribar les aigües àcides i no el fang. És una zona argilosa propera a les maresmes, en la que es pot veure uns valors elevats de Na i Mg (Vidal et al.1999), que ens indicaria el caràcter salí d'aquesta, al estar a prop del mar. En aquestes zones tot i tenir valors no tan elevats de concentracions de metalls pesants, obtenim uns valors d'IC grans per a aquestes terres diluïdes un 75%, dilució que va caldre degut a la toxicitat que representava per aquesta espècie de lumbrícid. Així com també en un experiment (dades no presentades en cap taula) on es van posar 10 individus de la mateixa espècie en mostres d'aquesta zona sense diluir

---

amb una altra terra, es va observar que per a 3DEP van sobreviure al cap de cinc dies 6 individus, dels quals es va realitzar el comet test obtenint un valor de 78.33, mentre que per la zona de referència (3DEPref), dels 10 individus, a les 48 hores només en quedaven tres, que es van mantenir fins a quatre dies i llavors se'ls va realitzar el comet test, obtenint un valor de 81.91. Valors realment elevats, però tot això ens va fer pensar en algun altre factor que influiria en aquesta espècie a part de la quantitat de metalls pesants i la toxicitat d'aquests, potser hi té a veure la interacció entre tots aquests elements, però es va pensar més en que la salinitat podria ser un dels possibles factors que no permetria o afectaria la supervivència d'aquest lumbrícid; s'ha trobat *A.caliginosa* vivint a prop de zones salines, però generalment no suporta gaire els ambients amb elevades quantitats de sals (Álvarez Sánchez, 1971). Per evitar doncs, aquesta mortalitat elevada en aquestes mostres, es va fer les dilucions i es va veure que a 75% amb terra estàndard ja podien viure la majoria d'individus durant varis dies, d'aquesta manera es va poder realitzar el comet test per a individus exposats en aquesta terra diluïda durant 48 hores, i els valors que es van obtenir són similars als controls (3DEP:47.67; 3DEPref: 45.16; STD1: 42.72; control:46.27), encara que no es pot interpretar exactament els resultats, ja que hi ha un factor que interfereix en la mesura de la possible genotoxicitat causada pels metalls sobre els cucs, que es podria suposar degut a aquesta salinitat elevada, i tampoc es pot saber sense una anàlisi el contingut de metalls pesants ni la seva disponibilitat al haver fet aquesta dilució amb STD1 i variar les característiques. Cal però tenir en compte un altre factor diferent al d'aquest tipus de contaminació, i seria que durant anys a part de l'activitat minera de la zona, i de les característiques geològiques de l'àrea, hi ha hagut contaminacions de tipus urbà i de l'activitat agrícola (adobs, pesticides i oliasses; Alzaga et al. 1999; Prat et al.1999, i Solà et al.2000), que podria donar també uns efectes sobre els individus exposats a aquestes terres. Com, al mateix temps, en aquest treball ens hem centrat en l'efecte i estudi dels metalls ja que era la contaminació més evident en quantitat de tòxic, i no es va analitzar la possibilitat d'altres tipus de contaminants que hi pot haver en els fangs i en la riuada tòxica provinents de la mina, que podrien provocar efectes genotòxics, com algunes amines aromàtiques resultants del tractament per a l'extracció minera i que serien presents en aquest vessament (Alzaga et al.,1999, Querol et al.1999), es podia pensar doncs en una interferència degut a altres tòxics i que podrien estar relacionats també en aquest cas amb els valors elevats d'IC obtinguts en aquestes mostres.

Si comparem però els valors obtinguts de les mostres en que no ha calgut fer cap dilució(3QUE, 3QUEref, 3PIL, 3RIBref.), ens trobem al fer un test de comparació múltiple (Tukey-Kramer), que sols en el cas de la mostra 3QUE i 3QUEref són significativament diferents de la mostra STD1. Tot i això, es pot observar que els valors de totes aquestes mostres (3QUE, 3QUEref, 3PIL, 3RIBref.) encara que hi hagi valors de referència entre aquests, són més elevats que el valor control de STD1. Cosa que ens indicaria doncs, el que s'esperava, un valor més elevat de dany (relacionat en aquest cas amb la concentració de metalls pesants) en les zones afectades pel vessament, (i també en els valors de les mostres de referència ja que com ja he comentat diverses vegades hi podria haver una acumulació degut a l'activitat minera de molts anys o altres tipus de contaminacions), que en els controls fets al laboratori lliures de contaminació, i ens indicaria doncs algun efecte genotòxic sobre aquesta espècie. Els valors d' IC, com ja hem vist en capítols anteriors, sovint es mouen en un interval molt petit de variació, fent que moltes vegades no sigui significatives les diferències mentre es pot observar una tendència de valors diferents.

M'agradaria ressaltar en aquest experiment, que en l'observació i classificació de les categories de comet, hauria necessitat una altra categoria nova, ja que hi ha unes formes amb cues llarguíssimes, i núvols on només són cues. Segons les observacions fetes en un altre laboratori (Dr.R.Štětina), a l'exposar cultius cel·lulars a metalls pesants (Cd, Pb, Cr), obtenien també formes molt llargues de cues per als comets, potser doncs, aquests valors tan llargs de cues visualitzats en aquest experiment amb cues exposats també a metalls pesants, ens indicaria que els metalls causarien aquests tipus de formes, i s'hauria de considerar en aquest cas, la importància de la longitud de la cua (que ens podria indicar la mida dels fragments, al ser una cua tan llarga ens indicaria que són de petita mida, o la gran quantitat de trencaments s'haurien donat i que formarien uns *loops* molt llargs, els metalls podrien unir-se al DNA i desestabilitzar-lo d'alguna manera que causés trencaments de la cadena al ser una lesió alcalino-làbil o que realment causés de manera més directa els trencaments, o que fossin trencaments deguts a la reparació de les lesions, sigui com sigui, causaria una relaxació de la cadena i sortirien desplegats en forma de *loops* cap a la cua arrossegats pel corrent elèctric de l'electroforesi, causant la forma de cua del cometa, molt llarga en aquest cas), més que no pas la distribució del DNA en aquesta, encara que també seria important, i la quantitat que hi pugui haver de DNA a la cua. Molts autors troben que la longitud de la cua seria un paràmetre que és saturable a determinades concentracions dels agents que utilitzen (veient com pot augmentar el % de DNA a la cua, mesurat en un augment de la intensitat, mentre que no incrementa la longitud de la cua), en aquest cas nostre, veiem cues molt llargues en comparació amb el que es sol trobar normalment, però segurament també deuen ser saturables. Caldria veure amb els diferents autors que utilitzen metalls en els seus estudis amb comet test, si obtenen les mateixes formes tan llargues de cua, sobrepassant els valors trobats anteriorment de longituds al exposar les cèl·lules a altres tipus de substàncies, i en quins metalls es donen, si es pot establir alguna relació. Seria molt interessant continuar investigant en la realització d'estudis d'exposició de metalls pesants amb el SCGE.

Com ja he comentat doncs, en resum, és difícil la interpretació dels resultats al haver hagut de fer dilucions amb la terra per a permetre la supervivència de l'espècie, no ens interessava la citotoxicitat de les mostres sinó més, el possible efecte genotòxic, així doncs per solventar els problemes de pH tan àcids, i en altres mostres la salinitat, que podien ser les causants dels problemes per aquests individus, es van barrejar aquestes mostres amb la terra estàndard. Cal però tenir en compte, que no sols es dilueix la quantitat de metalls pesants, i per tant canvia el seu efecte tòxic degut a la concentració, sinó que a més, al afegir una terra amb altres característiques i components com la matèria orgànica o altres continguts, fa que aquests metalls puguin canviar el seu estat i biodisponibilitat per aquests individus, essent millors o pitjors els efectes. A més al regar amb aigua destil·lada també es canvia les condicions i la mobilitat d'aquests. Segons varis estudis realitzats (treballs de Rhee,1975 i Ma, 1982, recollits a Lee, 1985) aquesta espècie (igualment com altres cues de terra) pot acumular diversos tipus de metalls fins a unes determinades concentracions que poden o no afectar-lo; altres estudis estan realitzats sobre varis metalls a la vegada destacant els efectes sinèrgics o antagònics de varis dels metalls. En aquest punt, autors com Weltje 1998, indica que els metalls interactuen a tres nivells en l'ecosistema del sòl, a nivell de substrat, d'absorció i a nivell diana; hi ha una certa competència entre determinats metalls dins els teixits degut a les seves afinitats per dianes similars, així destaca el desplaçament de metalls essencials com el Cu i Zn pel Cd. A elevades

quantitats de Cu suprimeix l'absorció de Pb, etc... indicant doncs la interacció entre els diversos elements, que pot minvar o augmentar els efectes perjudicials. També comenta la diferent biodisponibilitat segons els tipus de sòl, espècies i elements, i la possible sobreestimació que es pot donar en laboratoris en sòls artificials de la biodisponibilitat dels metalls. Però, el cas de Doñana, on hi ha tants metalls i en unes condicions tan particulars, (en el que manca una informació de tant complexes característiques i efectes, ja que actuen diversos factors i concentracions d'una gran quantitat de metalls pesants, entre d'altres contaminants, i on tot alhora pot donar unes característiques diferents de toxicitat, i/o genotoxicitat, letalitat, etc...), fa que sigui un cas diferent dels estudis analitzats per parts com en els estudis separant l'efecte de cada metall en el laboratori. Així com també es va veure que segons el tipus de sòl, aquesta espècie pot acumular més metalls pesants o menys (treballs de Ma,1983 i els de Rhee i Ma recollits en Lee, 1985; Mariño et al.1992,94,95,96; Weltje 1998; etc...), igualment com altres espècies estudiades (Bengtsson et al.1986; Beyer & Cromartie,1987; Mariño et al.94,95,96; Weltje 1998; Spurgeon & Hopkin, 1995,96,99; etc...). Al mateix temps per a cada espècie d'animal i de planta, els efectes seran diferents, inclús hi haurà una variabilitat individual, sobretot quan hi ha valors sub-letals de toxicitat. Un altre punt a considerar és la possibilitat que els cucs no processin la terra quan noten que no els agrada o esquiven aquestes "taques" de concentració de metalls al sòl, poden estar molt temps sense menjar, i en el medi ambient podrien evitar aquestes zones contaminades (Yearley et al.1996, Depta et al.1999), tot i que aquí els obliguem a estar en un lloc molt limitat de terra, però demostraven moltes vegades que volien marxar. En els estudis de Trigo & Díaz (1992) amb *A.molleri*, indicaven que hi havia una selecció de partícules del sòl que ingeria, preferint les més fines, això ens podria mostrar, tot i ésser una altra espècie, que poden tenir un caràcter selectiu per a segons quines mides de fracció mineral que ingereixen, així com també tenen un caràcter selectiu en quan a les espècies de plantes o partícules orgàniques ingerides (Depta et al.,1999), que podria fer que evitessin unes plantes que estan més contaminades o que contenen un major valor de metalls pesants que d'altres, etc..., això si ho afegim al seu caràcter d'evitar les zones contaminades i, segurament, esquiven les boles de fang que hi havia en algunes de les mostres de Doñana, implica una complexitat gran a l'hora de la interpretació dels resultats. Les mostres de terra utilitzades per al comet test en cucs, no es van homogenitzar, ni es van desfer aquestes acumulacions de fang, en canvi per a fer les anàlisis químiques d'aquestes sí, per a veure la concentració total de metalls que contenen, mentre que pot estar en la realitat distribuïda de manera heterogènia en diferents punts de la mostra. Tot això fa que per a explicar els resultats en cucs de terra sigui difícil, ja que podrien doncs, haver esquivat aquestes acumulacions entre d'altres coses,(aquest va ser un dels motius per a no uniformar les mostres, ja que es volia veure com actuarien els cucs si estiguessin de manera real en aquella zona, però va quedar al final molt lluny d'aquesta realitat al haver diluït les terres). Hi ha doncs molts factors a tenir en compte

Així doncs, segons dades recollides en Lee 1985 (treballs de Rhee) dóna uns valors per *A.caliginosa* exposats durant vuit setmanes i mitja en un tipus de sòl contaminat per diversos metalls, obtenint les següents observacions: a concentracions de Cu de 110µg/g, es donava una reducció de la producció de capolls, però no disminuïa el pes corporal ni hi havia mortalitat. Pel Zn a concentracions de 1100µg/g, disminuïa el 50% del pes corporal, aturava la producció de capolls i el desenvolupament, a més d'una mortalitat del 22%. Donava valors també pel Hg i Co. Van avaluar al final tots els metalls alhora donant una disminució del pes corporal del 34%, una aturada de la maduració i la producció de capolls i un 22% de mortalitat. Van agafar les



concentracions que s'havien trobat en un determinat sòl com a referència per a les proves dels possibles efectes tòxics. Van marcar un límit letal a una concentració de 80µg/g de Cu. Al mateix llibre (de Lee 1985), un estudi de Ma, indicava que en terra sorrenc absorben més metalls que en marga. Altres autors marquen diferents valors de concentracions pels mateixos efectes per altres espècies de lumbrícids (*E.foetida*, i *E.andrei*, per exemple Van Gestel et al 1993; Spurgeon & Hopkin 1995, on buscaven concentracions que no els causessin efectes perjudicials en mostres de terra artificial, donant uns valors menors també de permissibilitat al sòl per no causar masses efectes negatius a les espècies i que té en compte també els depredadors, uns valors acceptables de seguretat, o uns valors normals, (molt similars als comentats pels anteriors autors), que els anomena Mariño et al. (1996, i que els he posat una mica més endavant en la disusió). Aquests valors estan per sota dels obtinguts en les mostres de Doñana, exceptuant les mostres de les zones de referència, que tot i ser una mica més alts per alguns metalls que aquests donats, com he comentat anteriorment, reflectirien l'activitat minera de la zona, però són valors petits comparats amb les mostres contaminades. Per altra banda, Beyer 1982 i Beyer & Cromartie 1987, donaven uns valors màxims trobats en cucs molt elevats (com 2100 ppm Pb, mentre que al sòl n'hi havia 9 ppm; o valors de 23ppm de Cd, o 1600 de Zn, o inclús en una zona no contaminada, trobaven valors de fins a 600ppm de Zn acumulat en cucs, mentre que no és recomanable més de 500 ppm en les dietes dels animals domèstics estudiats), així doncs pot existir alguna mena de regulació, o els depredadors deuen tenir algun sistema, o s'han sobreestimat els valors de toxicitat. Segons Spurgeon & Hopkin,1995, el Zn és un factor limitant en la presència del sòl per *E.foetida* en el seu estudi, i la presència de Cd i Pb a concentracions elevades, en redueixen també la seva presència. Segons Pizl & Josens (1995a), indiquen que semblaria que el Cu i Cd serien entre els més tòxics pels cucs, i el Pb entre els menys, tenint en compte molts factors que hi influïrien directa i indirectament. Per altra banda, sembla ser, com ja he comentat, que alguns cucs poden acumular quantitats majors de metalls que les trobades al sòl, (ex.el Cd per *A.caliginosa*, Mariño et al.1992).

Haguera sigut interessant, doncs, avaluar la quantitat de metalls pesants acumulats en els individus testats, tot i el curt període d'exposició, per a intentar veure si es podia establir alguna relació entre els valors dels metalls en la terra i en els cucs i els resultats del comet test. Tot i que la seva interpretació continuaria essent molt difícil tal i com ho demostren molts estudis realitzats en cucs exposats a metalls pesants, on hi ha uns resultats sorprenents en quan a la seva diferent acumulació, segons les espècies, edat, tipus de sòl, barreges de metalls, etc.. on intervenen també en exposicions llargues els mecanismes de destoxicació, des de l'acumulació en lisosomes de metalls com Cu, Fe, Pb, Zn i Ni en els celomòcits basòfils, fins a un increment de la seva excreció, la seva reduïda assimilació, etc... (Reinecke & Reinecke, 1999; Aziz et al. 1999). I on per exemple, moltes vegades no es troba una relació positiva entre la quantitat d'un determinat metall en el sòl i en el cuc (exemple, es pot trobar molt poc Cd al sòl, mentre que el lumbrícid pot acumular-ne molt, i en canvi quan hi ha elevades concentracions d'aquest en sòl, es pot donar molt baix en cucs, tal com mostren els estudis d'aquests mateixos autors, i altres com Beyer et al. 1982; Mariño et al. 1992-94-95-96; Neuhauser et al., 1995; Spurgeon et al.,1996; Chmielewská et al.,1998; o també en metalls com Cu, Zn i Se, ja que potser són essencials per aquests, Beyer & Cromartie,1987, serien capaços de regular-los o parcialment, i disminuiria la seva concentració quan incrementarien en el sòl). La concentració de metalls en cucs a nivell subletal, podria d'aquesta manera, causar problemes a nivell de la xarxa tròfica, ja que en poden quedar afectats tots els animals que els depreden, tot i que, tal com els cucs acumulen a vegades

concentracions elevades de metalls sense haver-ne tant al sòl, pot ser que els depredadors també tinguin uns sistemes per evitar aquestes concentracions de metalls (Walker et al., 1996, comenta que els animals, consumidors, dels primers nivells en l'escala tròfica, acumulen molt Cd. O sigui que hi deu haver alguna manera per regular-se en aquest nivell o en nivells superiors de la cadena alimentària), no deixa però de mostrar tot això una complexitat enorme en la interpretació dels resultats de l'ús dels cucs per com a indicadors del risc d'aquests elements, i per alguns autors hi ha dificultats en el seu ús per aquests estudis (Beyer & Cromartie, 1987; Pižl & Josens, 1995b, Spurgeon & Hopkin 1996; Edwards 1998). Així doncs és coneguda la toxicitat d'excessives concentracions de metalls pesants en cucs de terra, se n'han fet estudis a prop de centrals tèrmiques, prop de fundicions, mines, prop de carreteres, etc... on es troben diferents concentracions acumulades en els animals i diferents efectes o sensibilitats segons les espècies, on també hi té molt a veure les característiques, tipus i condicions del sòl, i on s'han obtingut diferents resultats pels diferents treballs i autors de les concentracions màximes i els efectes a les diferents espècies de cucs (Beyer et al. 1982; Ma et al. 1983, Beyer & Cromartie, 1987; Mariño et al., 1994-95; Spurgeon & Hopkin, 1996; Pižl & Josens, 1995a,b; Šalagovič et al., 1996; Chmielewská et al., 1998; entre d'altres) ja comentat anteriorment, per això resulta difícil intentar donar uns valors concrets de metalls que representin tòxics, sub-letals, a nivell dels lumbrícs, perquè en varia la seva acumulació segons el sòl, i els efectes.

Tot i aquesta diversitat de valors per a les diferents espècies en diferents tipus de sòl, i segons hi hagi un sol tipus o varis de contaminants o elements, puc donar-ne uns considerats de referència generals donats per Spurgeon & Hopkin, 1995-96 en que indiquen els valors de seguretat acceptables (HC5), serien les concentracions en el sòl en les quals el 5% de les espècies estan afectades adversament: Cd 2µg/g, Cu 2.7µg/g; Pb 7.7µg/g; o amb la mesura del risc, tenint en compte els nivells de contaminants al sòl, en la presa, i els efectes sub-letals en els depredadors, utilitzant la fórmula dels màxims permissibles de concentració de risc pel contaminant en sòl (MPCs), que seria: els valors del nivell de seguretat acceptables pel depredador (HC5)/pel factor de bioconcentració BCF, (BCF=concentració en cucs/concentració en sòl); i que els dona uns valors de : 0.017µg/g pel Cd; 18.9µg/g pel Cu; 30.04µg/g pel Pb; 36.1µg/g pel Zn. També comenten la relació de l'efecte de metalls en la dieta de depredadors de cucs (com talps i musaranyes) amb aquests, i veien que concentracions de 119µg/g de Cd i 120µg/g al ronyó (en pes sec), causaven disfuncions i canvis histopatològics. Podem posar els valors de referència del que es pot considerar valors normals en sòl (Mariño et al. 1996): Cd: 0.07-1.1ppm; Pb: 0-1-20ppm; Cu: 6-60 o 20-30ppm; Ni: 5-500 o 40ppm; Zn: valor mig de 90ppm. I considerant valors típics de sòl no contaminat (Beyer & Cromartie, 1987), que estarien entre aquests intervals, hi afegeixo els valors que donen per As: 5-6ppm; Se: 1-10ppm; Cr: 37ppm. (Sempre hi ha el problema de no posar-se d'acord entre els diferents investigadors per a donar les mesures de les quantitats, en aquest cas, estan donades segons els autors en ppm, o µg/g o mg/kg, que són equivalents).

Així ha resultat difícil la interpretació d'aquest estudi, amb la realització d'aquestes petites proves, i el sol ús d'una tècnica d'avaluació del dany al DNA concreta, a més del fet de totes les complicacions i la complexitat que s'ha presentat en tot l'experiment. Hauria estat interessant poder comparar els metalls de les mateixes mostres que es va dur a terme el comet test. En això voldria també comentar el fet, que hauria d'haver tingut en compte i no he fet. És el diferent nombre d'individus que tinc per mostra; per a cada prova es posava el mateix nombre d'animals,

al cap de les 48 h de l'exposició en la terra se'ls realitzava el comet test. No hi ha el mateix número per a cada mostra perquè es van descartar els que es partien al fer-los el massatge, per exemple (els he exclòs en tots els experiments, ja que podrien estar en males condicions de salut o en estrès i serien més susceptibles a partir-se, o el fet de partir-se podria alterar els resultats de la tècnica), o perquè s'havien escapat, o s'havien mort en alguna ocasió, tan en un cas com a l'altre seria important indicar-ho ja que aniria relacionat amb la toxicitat de la terra. Seria interessant doncs, tenir en compte aquests fets també, per a la interpretació dels resultats afegint una complicació més ja a tota la gran complexitat que comporta aquest estudi.

## **2.E. Conclusions :**

1. S'obtenen uns valors superiors d'IC en les zones contaminades i de referència pertanyents a Doñana, que en les mostres control (STD1 i control). Tot i que les mostres diluïdes mostren valors similars als control, cal tenir en compte que hi ha hagut un factor de dilució i de canvi de les condicions de la mostra de sòl (per a corregir o estabilitzar alguna característica limitant o perjudicial per a la supervivència dels individus d'aquesta espècie en aquest sòl, que resulta letal, i en la que no es podia valorar la genotoxicitat a aquest nivell, sense aquesta dilució amb una altra terra, que permetés al cuc viure en aquesta mostra). Així aquestes mostres diluïdes són difícils d'avaluar degut a la complexitat dels paràmetres, i difícil de comparar o establir un factor de correcció per aproximar a l'efecte real sense dilució.
  2. És un estudi complicat, complex i amb moltes dificultats per a l'avaluació de la genotoxicitat per aquest tipus de contaminació en aquesta espècie, i la seva interpretació.
-

## Capítol 3

---

### 3. AVALUACIÓ DE LA TÈCNICA

---

#### 3.A. Introducció :

Durant els últims vint anys varis mètodes han estat desenvolupats per avaluar trencaments produïts en cèl·lules individuals (Olive,1999), com una mesura del possible dany genotòxic. Al 1984 Östling & Johanson van presentar la idea d'utilitzar l'electroforesi (a pH neutre) en gel d'agarosa de cèl·lules individuals, per detectar dany al DNA (serien trencaments de cadena doble). Al 1988 Singh i col·laboradors descriuen la tècnica a pH alcalí com una tècnica simple per la quantificació de baixos nivells de dany al DNA en cèl·lules individuals, detectant SSB i ALS. Al 1989 Olive va introduir el nom de "Comet Assay" a aquesta test. (Més tard ha estat modificat per Klaude 1996, Hartmann 1998, entre d'altres, i es continua variant. Són interessants els *review* de Mckelvey-Martin et al.1993; Fairbain et al.1995; Olive,1999; Rojas et al.1999; Tice et al.2000). Es pot dir que no ha sigut fins a principis dels 90 que aquesta tècnica ha adquirit cada vegada més importància fins el punt de ser actualment una tècnica molt i, àmpliament, utilitzada en estudis de genotoxicitat i oncologia, biomonitoring humà, etc.. i en la que dia a dia es va millorant i aplicant a diferents camps i tipus d'estudis. Sobre el tema que ens ocupa són interessants els estudis que s'han començat a fer en ecotoxicologia (*reviews* de Cotelle & Ferard; 1999; Rojas et al.1999), sent ja utilitzat en invertebrats (mol·luscs; anèl·lids; Eyambe et al. 1991, Šalagovič et al. 1997, entre d'altres), amfibis (Ralph & Petras 1998), peixos (Kammann et al. 2000, Mitchelmore & Chipman 1998, Belpaeme et al 1998), mamífers (ratolins, rates, hámsters de laboratori; ratolins salvatges:DaSilva,2000a,bc i altres animals salvatges), en plantes (Koppen & Verschaeve 1996; Navarrete et al.1997; Gichner & Plewa1998;Stavreva et al 1998; Poli et al.1999; Gichner 1999; Angelis et al.1999), fongs (Hahn & Hock.1998; Bhanoori & Venkateswerlu 1998, etc..), en estudis de *biomonitoring* del medi ambient i l'avaluació del risc genètic dels pol·luents. Ha resultat ser una tècnica molt sensible per mesurar els trencaments de cadena del DNA, i al mateix temps és fàcil de dur a terme, en un període de temps molt curt i és una tècnica molt assequible econòmicament. Actualment, es van introduint canvis en la tècnica per donar-li diferents aplicacions i per aconseguir ampliar l'àmbit d'estudi com també la seva sensibilitat. Molts agents que danyen el DNA no indueixen directament trencaments de la cadena de DNA, i es poden detectar durant els processos de reparació de les lesions quan es produeix un trencament transitori per a la reparació d'aquesta. Amb la modificació de la tècnica utilitzant enzims específics de reparació, s'aconsegueix més sensibilitat i especificitat en el test; i es pot fer un seguiment de la cinètica de reparació de baixes dosis de dany oxidatiu, això fa que pugui ser aquesta tècnica molt útil en estudis d'epidemiologia molecular amb la mesura de biomarcadors de dany oxidatiu en poblacions humanes (Collins et al.1997a). Així doncs, la utilització dels enzims de reparació Endonucleasa III i FPG (formamidopirimidina glicosilasa), entre d'altres, augmentarà, com ja he comentat, la sensibilitat i especificitat del test permetent la detecció d'un

---

tipus de dany específic de dany al DNA (Rojas et al.1999). Aquests dos enzims concretament detectarien bases alterades (Collins ,2000), dany oxidatiu en molts casos, que es poden transformar en trencaments de cadena del DNA en condicions alcalines.

Però, al parlar d'una tècnica tan recent sorgeixen alguns problemes, com el fet de no conèixer exactament el mecanismes físico-químics de formació dels cometes, no està plenament entès encara i hi ha diferents opinions i discussions entre els diferents autors (Fairbairn et al.1995, Collins et al.1997a, entre d'altres).

Hi ha diverses variacions de la tècnica, com he comentat en capítols anteriors, en quan a la composició dels reactius, els períodes de temps, etc... entre laboratoris, però també s'han anat introduint modificacions de la tècnica segons les necessitats per a noves aplicacions. La utilització de la versió alcalina del comet test, potser és la més sensible, però depenent dels estudis que es volen realitzar, es fa servir la versió neutra de la tècnica (on el desenrotllament i/o l'electroforesi es fan a pH neutre 7-8, en el que es considera menys sensible, detectant DSB i *cross-links*, i el que seria utilitzat en altres tipus d'estudi on és més adient aquesta menor detecció del dany, Karel et al.1999; Olive et al.1999). Un pH:12.1 detecta DSB,SSB, llocs d'escissió per reparació; pH>13 detecta DSB, SSB, llocs d'escissió per reparació, *cross-links* i llocs alcalino-làbils ([1]).

Altres temes de discussió són els paràmetres de mesura, i el comptatge visual o amb anàlisi d'imatges en un programa informàtic. Pel que fa als dos tipus de comptatge, ja he comentat al primer capítol que estan ben correlacionats i els dos sistemes són vàlids. En quan als paràmetres de mesura ja s'aniran comentant en els capítols següents les problemàtiques. En quan a avaluar quin és el que reflecteix millor el dany, si la longitud de la cua,(*Tail Length*), el *Tail Moment*, o el %DNA in *Tail* (quantitat de DNA a la cua). El *Tail Length* (longitud de la cua), ens indicaria la mida dels fragments, seria esperable que fos proporcional al nivell de SSB i ALS i està ben correlacionat amb la dosi-resposta, augmenta ràpidament amb la dosi a baixos nivell de dany, però aviat arriba a un màxim,(Collins 2000, Fairbairn et al.1995), és saturable). El *Tail Moment* (que seria el producte del *Tail Length* amb la quantitat de DNA migrat, la fracció de DNA a la cua), semblaria molt adequat al combinar les dues mesures, però té alguns punts febles ja que pot donar valors iguals per a resultats diferents. El %DNA in *Tail* (quantitat de DNA a la cua), es mesura per la intensitat del DNA a la cua; actualment semblaria que és el que presenta millors avantatges i seria el més utilitzat; està correlacionat linealment amb la freqüència de trencaments o relaxacions, *loops*, en un ampli interval de dany, i proporciona uns valors que són escala-independents, i és útil quan hi ha diferents tipus o condicions cel·lulars comparades, (Collins et al.1997a). Però, hi ha hagut, i encara hi ha, discrepàncies i discussions en com mesurar les imatges i quin paràmetre utilitzar, (Mckelvey-Martin et al. 1993; Fairbairn et al. 1995; Ashby et al. 1995; Collins et al. 1997a,b; Rojas et al. 1999; Tice ,2000, etc...); i es van introduir altres mesures com el *Tail Inertia* (Hellman et al. 1995), *Olive Moment*, etc..., però de moment les més utilitzades són les tres anomenades anteriorment, i seria potser millor comparar els resultats fent servir varis dels paràmetres o tots alhora.

Hi ha una sèrie de temes i discussions que es mantenen des de fa temps per intentar comprendre quins són els mecanismes de la tècnica, i que avui dia encara són un tema per aclarir, com per exemple, què són realment les imatges de cometa. En principi, es va pensar en

que la cua eren fragments de DNA, però després s'ha considerat que també podrien ser *loops* de DNA deguts a un trencament en la cadena i que causen una relaxació d'aquesta formant el *loop*, que al ser també de menys pes molecular, correria en direcció a l'electroforesi i donaria doncs la forma de cua del cometa. (Angelis et al.,1999; Dusinská & Collins, 1996; Collins et al.1997a; Karel et al.1999). Hi ha hagut autors com Klaude et al. 1996, que van fer proves amb el comet test en versió alcalina i neutre, on indicava que semblava ser que en versió neutre s'obtidrien *loops* a la cua, mentre que en l'alcalina la cua seria deguda a fragments del DNA. Però, així com continua la discussió de que segurament són les dues coses que es detecten, hi ha altres preocupacions en l'ús de la tècnica com seria la influència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test, ja que les forques de replicació es comporten com a SSB en àlcali en cèl·lules en fase S (Fairbairn 1995; Olive,1999). Es van fer proves per veure la influència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test (influència que ja comentaven Mckelvey-Martin et al.1993, Rojas et al.1999, entre altres), com són els estudis de Šalagovič et al.1997, tema que també es va començar a investigar en aquesta tesi, així també com la possible lectura errònia de falsos positius degut a l'apoptosi, tema en el que hi ha encara discrepància entre diversos autors, sobre aquesta interferència, sobre les imatges de comet que adopten les cèl·lules en aquest estat, si es poden veure o no, donant una forma concreta, en cas que sigui afirmatiu, si es poden comptar o no, o si es pot utilitzar el test per a mesurar aquest estadi cel·lular, la detecció d'aquestes formes apoptòtiques per al comet test; i si es podrien diferenciar amb les imatges d'una necrosi. Aquest tipus de mort cel·lular representaria una DSB i una fragmentació de DNA més accentuada a mesura que està en estadis més avançats d'apoptosi (Fairbairn et al.1995, 1996; Olive 1999; Tebbs et al. 1999; Tice et al.2000, etc...), aquest punt també es va voler tractar en la recerca.

Així doncs, en la realització d'aquesta tècnica ens van sorgir tots aquests interrogants, que van fer derivar l'estudi inicial més d'ecotoxicologia, a un estudi en paral·lel al mateix temps, en que s'experimentés en aquests punts febles o encara no massa coneguts, i encara discutits pels diferents autors. Aquest capítol doncs, presenta una varietat de proves, (entre moltes d'altres que no es comenten en aquesta memòria), que s'han dut a terme en el que es pretenia fer un petit avançament en quan a la coneixença més profunda del funcionament i la mesura de la tècnica.

Així aquest capítol es dividirà doncs, en tres parts diferents:

- 3.1. Divisió cel·lular
  - 3.2. Apoptosi – Necrosi
  - 3.3. Fragments - *Loops* de DNA
-

### • 3.1. Divisió Cel·lular :

#### 3.1.A. Introducció general:

Durant les proves i els experiments realitzats en el capítols anteriors d'aquesta memòria es va poder anar intuïnt una possible influència, interferència, de la divisió cel·lular en els resultats del SCGE (com també altres autors ja havien comentat, Mckelvey-Martin et al.1993; Olive & Banáth 1993; Fairbairn et al.1995; Šalagovič et al. 1997; Villani et al.2000). Especialment en el cas dels treballs realitzats en lumbrícids, els resultats eren sovint molt variables. A partir de les nostres observacions es va pensar que aquesta variació podria ser deguda al seu estat de creixement o reproducció, a més de les condicions diferents que poguessin tenir en aquell moment.

Si la divisió cel·lular afectés d'alguna manera als resultats del SCGE, això ens podria conduir a una interpretació errònia d'aquests, detectant danys al DNA quan realment no n'hi ha, i comportaria el fet d'haver de seleccionar els tipus cel·lulars utilitzats per la tècnica del SCGE, que es quedarien limitats a cèl·lules en estat quiescent, acotant d'aquesta manera l'ús del test. Per això es va voler investigar una mica més en aquesta direcció, i es van fer un seguit de proves que exposaré en aquest capítol.

Des dels primers *reviews* sobre la tècnica del Comet test (Mckelvey-Martin et al.1993; Fairbairn et al.1995), fins els més recents (Rojas et al.1999), es parla de la possible influència de la posició en el cicle cel·lular als resultats que dona el SCGE. Les estructures que estan en replicació es poden interpretar com a trencaments de cadena simple (SSB) quan hi ha la desnaturalització en condicions alcalines, augmentant la migració del DNA, i, interpretant així, un dany addicional al que es pugui voler detectar a l'exposar unes cèl·lules a un determinat genotòxic, reduint la sensibilitat per a detectar el dany produït a baixes dosis de l'agent testat (Olive, 1999). En condicions de SCGE neutre els llocs de replicació activa, poden reduir la migració (Olive et al.1991; Olive & Banáth 1993). Així la presència de forques de replicació pot augmentar o retardar la migració del DNA. Conseqüentment, les diferències cicle-dependents en el dany inicial, basal, poden influenciar en la sensibilitat del test a baixes dosis. (Fairbairn 1995; Olive & Banáth 1993; Šalagovič et al. 1997; Villani et al.2000).

Segons Olive & Banáth (1993) i Šalagovič et al. (1997) no seria sorprenent pensar en que la sensibilitat del comet test en detectar SSB pot augmentar en cèl·lules en fase S del cicle, quan hi ha més de  $10^4$  replicons per cèl·lula i totes les estructures de replicació són interpretades com a trencaments de cadena. Segons els primers autors, si cada un d'aquests complexos actius de replicació és responsable de dos SSB quan el DNA es desnaturalitza en medi alcalí, es pot esperar veure uns 500 o més trencaments de cadena addicionals per cèl·lula en els inicis de la fase S. En el mateix experiment (Olive & Banáth, 1993), van poder trobar un augment de *Tail Moment* (TM) de l'ordre de 1-2 (de diferència de TM entre la fase  $G_1$  i la S), equivalent a 0.5-1Gy, o a 500-1000 trencaments addicionals per cèl·lula en fase S; assumint 1000SSBs/cèl·lula/Gy. En els experiments realitzats per Šalagovič et al. (1997) podien concloure que les diferències cicle-dependents en la migració inicial de DNA en limfòcits estimulats per

mitosi, podien influenciar la sensibilitat del SCGE a baixes dosis; com ja he comentat anteriorment, altres autors han observat el mateix en els seves proves en altres tipus cel·lulars. Sigui com sigui, la discussió no està acabada encara, tot i que tothom fa servir tot tipus cel·lular actualment, s'ha de tenir en compte la interpretació dels resultats, sobretot en poblacions cel·lulars que no estan sincronitzades (tal com recomana Šalagovič et al. ,1997).

Per altra banda, és també un tema important perquè les cèl·lules en proliferació, poden variar la seva capacitat de reparació en comparació amb les cèl·lules en repòs (Olive & Banáth, 1993; Villani et al.2000), així doncs també podria fer variar els resultats de l'exposició a un genotòxic, per la variació en la reparació del dany, que pot estar incrementada o retardada segons l'estadi del cicle cel·lular i per tant no donant uns valors homogenis.

Tice et al.(2000) al seu últim *review* comenten que en els estudis *in vitro* amb el SCGE, es pot utilitzar, teòricament, qualsevol tipus de cèl·lula eucariòtica, no hi ha preferències entre les cèl·lules en proliferació i les que no, però aquestes últimes poden ser menys propenses a respostes de falsos positius potencialment associades amb agents que interfereixen en la síntesis de DNA afectant el metabolisme cel·lular. Aquesta qüestió no ha estat resolta encara adequadament.

En aquest capítol doncs, es va intentar diverses proves per a poder aclarir una mica aquest punt:

Es van sincronitzar cultius, per tenir les cèl·lules en totes les fases del cicle cel·lular de forma més controlada, fer la corba de creixement d'aquestes cèl·lules, i comparar les quantitats de cèl·lules en fase de síntesi de DNA (fase S), amb el valor dels paràmetres de mesura del SCGE, per intentar veure si es podien correlacionar aquests valors, i així poder establir, o no, una relació amb el fet que la divisió cel·lular interfereix en els resultats del comet test indicant falsos positius. De tal manera que hauríem de veure en el pic de síntesi de DNA, un valor major dels paràmetres de mesura del comet test, interpretant erròniament com un dany al DNA més elevat, quan realment seria un moment en que hi ha *loops* de divisió i trencaments de la cadena durant la replicació. Per aquest mateix fet es va pensar en un altre tipus de comprovació *in vivo*, amb intestins de rata, comparant els valors del SCGE en cèl·lules epitelials de la mucosa del colon i de l'intestí prim, esperant trobar més intensitat de fluorescència com a mesura de la major quantitat de DNA al nucli, i un valor major d'IC, %*Tail DNA*, i TM en l'intestí prim que al colon, ja que hi hauria més divisió cel·lular en el primer; i una altra prova en lumbrícs, que s'estarien regenerant a partir d'una lesió provocada, i en els que se suposa, estarien en una elevada activitat mitòtica. Així doncs, el pla de treball quedaria de la següent manera:

---



Pla de treball:

Per tal d'investigar una mica en aquesta problemàtica de la tècnica, es van dissenyar quatre tipus diferents d'experiments, *in vitro*, i *in vivo*:

- **3.1.1. Sincronització de cèl·lules FAO.** Una sèrie d'experiments *in vitro* de sincronització d'aquest tipus cel·lular (cèl·lules FAO), comparació de la quantitat de cèl·lules en fase s (fase en la qual el DNA s'està replicant, sintetitzant), amb la quantitat de cometes en les mateixes mostres (mesurats en IC), i veure així si durant el cicle cel·lular, a mesura que va augmentant el nombre de cèl·lules en aquesta fase, augmenta el nombre de cometes (el valor d'IC).
- **3.1.2. Intestí prim- Intestí gruixut.** Un altre experiment va consistir en la realització del comet test en mostres d'intestí gruixut i prim de ratolí per a comparar si les mostres d'intestí prim (part del jejunum, en la mucosa del qual representa que hi ha moltes mitosi), tenien més nombre d'imatges de cometes que les mostres d'intestí gruixut (colon en aquest cas) en la mucosa del qual s'hi produeix molt recanvi cel·lular també, però la taxa no és tan elevada com en la del budell prim.
- **3.1.3. Fibroblasts.** Es va realitzar un altre experiment *in vitro* amb Fibroblasts HEL, on es pretenia comparar per intensitat de comet, el que podrien ser cèl·lules en creixement, amb les possibles formes de comet amb major quantitat de DNA a la cua, i intentar establir d'aquesta manera, la influència que hi pugui haver de la divisió cel·lular en els resultats del Comet test.
- **3.1.4. Lumbrícids.** Es va realitzar un estudi *in vivo* amb *Allolobophora caliginosa*. Per a la comparació entre cucs que s'estan regenerant i altres sencers i sans, així poder observar si el nombre de cometes era superior en els primers.

### 3.1.1.Divisió cel·lular: Sincronització de cèl·lules FAO:

#### 3.1.1.a. Introducció:

Es volia sincronitzar un cultiu de cèl·lules per a comparar l'estadi de divisió cel·lular, mesurat per citometria de flux, amb els resultats del comet test per a establir si hi ha una relació o interferència de la divisió cel·lular en els resultats per al Comet test.

#### 3.1.1.b.Material i Mètodes:

Les cèl·lules FAO procedeixen d'un hepatoma de rata. El seu creixement és en forma de monocapa, adherides a la placa de cultiu. Són unes cèl·lules que no estan modificades del tot encara, no són del tot tumorals, guarden característiques de cèl·lules normals, per això es poden sincronitzar, (sinó no es podria perquè no tindrien un cicle cel·lular controlat, es dividirien sense

---

parar, sense poder sincronitzar per factors de creixement). Això pot fer tenir objeccions a la utilització d'aquest tipus de cèl·lules que pertanyen a una línia tumoral per a la realització del Comet test. Es van dur a terme unes primeres proves per veure que el dany basal que hi pogués haver no fos massa elevat com per emmascarar els resultats. Va resultar un tipus cel·lular que es podia utilitzar per aquest tipus d'estudi ja que no era elevat el dany basal, i no caldria fer una correcció dels resultats amb un blanc. De tota manera, en moltes ocasions han estat utilitzats cultius cel·lulars a partir d'una línia tumoral per a les proves amb el comet test, entre els molts tipus de cèl·lules que es poden utilitzar (per alguns exemples, Rojas et al.1999, *review*; Piperakis et al.1999).

Es va fer una prova de viabilitat de les cèl·lules. Es volia comprovar si es podien mantenir a la nevera en PBS durant 24 h.

Es van realitzar quatre experiments per comparar els resultats del comet test amb els de citometria de flux i veure si hi havia alguna relació:

- Experiment 1:  
Comet test en cèl·lules sincronitzades, en els intervals de 0,3,6,9,12 hores, i comparació amb resultats de citometria de flux establerts per aquesta línia cel·lular,(resultats obtinguts en experiments anteriors pel grup de bioquímica amb els que col·laboràvem). Aquests valors de citometria, un cop establerts per la línia cel·lular no solen variar gaire i són molt similars, ja que cada línia cel·lular té una corba específica de creixement, i sols van ser usats per tenir una primera idea de com aniria l'experiment, ja que estaven fets per un altre estoc de cèl·lules, i no pel mateix en que es va fer el comet test. Podria haver alguna petita variació entre els grups de cèl·lules, llavors al següent experiment, es van dur a terme les dues tècniques (comet test i citometria de flux) al mateix temps amb el mateix estoc de cèl·lules.
  - Experiment 2:  
Es va repetir l'experiment fent al mateix temps la citometria de flux per a comparar amb les mateixes plaques de cèl·lules, ja que tot i ser la mateixa línia cel·lular pot sofrir variacions, segons l'estoc, condicions en el moment del cultiu, entre d'altres.
  - Experiment 3:  
Es va dur a terme el comet test en mostres de cèl·lules sincronitzades , però aquest cop suplementant el medi amb un 10% de sèrum en comptes de l'1% com als dos experiments anteriors per fer que hi hagués un creixement més ràpid i es veiés més la diferència d'estat de divisió entre els diferents intervals de temps. Es va utilitzar els mateixos intervals que als dos experiments anteriors i es va tornar a fer les mesures per a citometria de flux.
  - Experiment 4:  
Es torna a repetir el comet test en les mateixes condicions i protocol que el tercer experiment, comparant amb els valors de citometria de flux obtinguts en aquell moment.
-

Per explicar el procés dels experiments, es descriu el protocol pel segon experiment, ja que totes les proves es van fer de la mateixa manera, sols amb alguna petita variació que ja es comentarà en el seu moment.

#### Protocol cèl·lules FAO:

- Descongelació de les cèl·lules: les cèl·lules guardades en nitrogen líquid a  $-170^{\circ}\text{C}$ , es descongelen ràpid fins a  $37^{\circ}\text{C}$  i es centrifuguen durant 5 minuts a 1000 rpm; s'aspira el medi de congelació (medi amb DMSO), i es posen en medi normal (Medi COON's F12 (sigma) 500ml, sèrum fetal 25ml, estreptomicina+penicilina+ fungisona (SPF) 5ml). Per mantenir les cèl·lules s'ha de canviar el medi cada dos dies.
- Es tripsinitzen les cèl·lules (per separar-les bé): Succionar el medi, posar PBS durant uns minuts i escampar bé, per netejar del medi anterior. Aspirar el PBS i posar 1ml de tripsina a cada placa i escampar bé. Treure la tripsina i posar a la incubadora durant 2 o 3 minuts perquè actuï la tripsina separant les cèl·lules. Treure de la incubadora i donar algun copet amb la mà al flascó per acabar de desenganxar les cèl·lules del fons del flascó, es pot veure directament que s'han desenganxat o al microscopi. Posar PBS, fer pujar i baixar amb cura el líquid per separar bé les cèl·lules.
- Sembrar les plaques amb 10 ml de medi normal perquè creixin i arribin a un 80% de confluència desant-los a l'incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  durant un o dos dies.
- Per sincronitzar les cèl·lules cal aspirar el medi normal i afegir 10ml de medi BSA en cada placa, és un medi que no porta factors de creixement i aturarà en fase  $G_0$  o  $G_1$  les cèl·lules. (Medi COON's F12 500ml, Antibiòtic SPF 25ml, i medi BSA al 0,2% 10ml). Mantenir a la incubadora durant 48 hores a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Per realitzar la sincronització a les hores 0,3,6,9,12: Canviar el medi i posar medi normal, 10 ml, perquè comencin el creixement i treure les cèl·lules cada tres hores (per tenir les cèl·lules en totes les fases del cicle cel·lular) tripsinitzant i posant-les en 8 ml de PBS (8ml per aconseguir una quantitat adequada de cèl·lules per fer el comet, entre  $5 \times 10^5$  i  $1 \times 10^6$ ) i guardar en fred fins a la realització del comet test tan aviat com sigui possible, perquè tot i que es va comprovar que la viabilitat per citometria de flux al cap de 24 hores era del 90% , les cèl·lules a vegades es tornaven a enganxar unes a les altres i no va bé per fer el comet test, ja que es necessiten cèl·lules aïllades, a més poden patir alteracions, etc...
- Es va fer un control negatiu deixant les cèl·lules en medi BSA, (es va renovar a la hora 0 per evitar la mort cel·lular per esgotament del medi), per fer una comparació de nivell basal de fases del cicle cel·lular.
- Es va fer un control positiu, per veure que les cèl·lules creïessin sense problemes. És una placa on es deixa en medi normal amb sèrum, i llavors hi ha tots els estadis de creixement perquè no es sincronitza.

Tant la tripsinització com el raspat (*screaping*) per obtenir les cèl·lules, separar-les, produeixen dany al DNA. La tripsinització, però, és preferible perquè causa el mínim dany (Mckelvey-Martin et al., 1993). Per això també és important el control.

---

És va dur a terme de la mateixa manera el protocol en els altres tres experiments, ja que tot són repeticions de la prova. Amb el canvi tan sols en que en el tercer i quart experiments es van suplementar amb 10% de sèrum el medi en comptes de l'1% (com el cas del primer i segon) per veure si era més marcada la diferència d'estat de divisió entre els intervals de temps.

#### Procediment del Comet Test:

- En portaobjectes rugosos es fa una primera capa de 110µl d'agarosa de punt de fusió normal a l'1% en PBS, i posar el cobreobjectes de 24x60mm i deixar en gel que es polimeritzi l'agarosa durant uns cinc minuts.
- Barrejar bé les cèl·lules per separar-les bé.
- Posar en un tub Eppendorf 80 µl d'agarosa de baix punt de fusió a 0.9% amb PBS, mantinguda a 37-40 °C. per no danyar les cèl·lules.
- Afegir-hi 10µl de la suspensió cel·lular.
- Barrejar bé, i d'aquí es treu 80µl per fer la segona capa d'agarosa.
- Es posa un cobreobjectes i es deixa solidificar la capa durant 10 minuts en gel.
- Es fa una tercera capa de 80µl d'agarosa de baix punt de fusió (0.7% amb PBS).
- Posar els portaobjectes en una cubeta amb 200 ml de líquid de lisi fred ( NaCl 2,5M, EDTA disòdic 100mM, Tris 10mM, NaOH 8 grams per ajustar el pH a 10) i a on just abans de posar les mostres s'hi afegeix el 10% de DMSO i l'1% de Triton. La lisi es dona durant 1.5 hores a la nevera i en fosc, per evitar algun dany addicional al DNA.

(A partir d'aquí tots els passos són en la foscor, i en fred):

- Assecar una mica els portaobjectes i posar-los en la cubeta d'electroforesi amb el tampó d'electroforesi (Na<sub>2</sub>Edta 1mM, Na OH 300mM), preparat el mateix dia i mantingut a 4°C, a un pH de 13, durant 20 minuts per provocar el “desenrotllament”, separació de les dues cadenes de DNA. Es manté la cubeta d'electroforesi en fred a 4°C, (posant-la en una cubeta amb gel).
- Electroforesi a 25 volts i 300 mA, durant 20 minuts mantinguda en fred.
- Assecar els portaobjectes i posar-los en un placa amb forats, i passar a fer tres rentats(els dos primers de 5 minuts i l'últim de 10) amb tampó Tris (0.4M)a pH 7.5 per neutralitzar i eliminar l'àlcali i la resta de detergents, també en fred.
- Assecar una mica els portaobjectes i fer la tinció amb 65µl de DAPI, posar els cobreobjectes i esperar uns 6 minuts, llavors treure l'excés de colorant espolsant una mica el porta i guardar-los en una caixa per portaobjectes amb una paper humitejat amb PBS , ben tapada i a la nevera. Es guarden bé una setmana, més temps comencen a fer-se malbé (contaminacions , pèrdua de fluorescència , etc..)

Protocol: Citometria de flux, per veure les fases del cicle cel·lular:

(Protocol extret de: Currents Protocols in Cytometry, 1997; 7.5.1-7.5.24).

· Fixació de les cèl·lules amb etanol:

- Es necessita una suspensió cel·lular de  $10^6$  a  $10^7$  cèl·lules en 5ml PBS (1%) en un tub de centrífuga.
- Es centrifuga les cèl·lules durant 6 minuts a unes 200g (~1000 rpm)
- Es resuspenen les cèl·lules en 0,5ml de PBS intentant de barrejar-les bé perquè estiguin ben separades, sinó al fixar-les quedaran els agregats i ja no es podrà fer bé la mesura de les diferents fases del DNA.
- Es posen en un tub que conté 4.5ml d'etanol de 70°C fred.

· Tinció amb el iodur de propidi:

- Centrifugar els tubs durant 5 minuts a unes 200 x g. Decantar l'etanol a poc a poc i amb cura.
- Posar 5ml de PBS (1%) per resuspendre el sediment de cèl·lules, esperar 60segons i centrifugar 5 minuts a 200 x g.
- Resuspendre les cèl·lules en 1 ml de la solució de tinció:
  - o En 10ml de Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS afegir 2mg de RNasaA lliure de DNasa (\*), i 200 µl de 1mg/ml de Iodur de Propidi (preparat dissolent 1 mg de Iodur de propidi en 1ml d'aigua).
  - o (\*): si la RNasa no és lliure de DNasa, bullir la solució de 2 mg de RNasa A en 1ml d'aigua durant 5 minuts.
- Mantenir les cèl·lules en la solució de tinció 30 minuts a temperatura ambient, o incubar-les 15 minuts a 37°C, abans de la seva observació pel citòmetre de flux.

· Passar a l'observació amb el citòmetre.

Incís:

No es va poder dur a terme el comet test i l'extracció de cèl·lules cada dues-tres hores al mateix temps. Degut a això es van fer un seguit de proves per intentar guardar les mostres i processar-les quan abans millor pel comet test.

- a. Es va provar de fer les capes d'agarosa amb les cèl·lules i guardar-les a la nevera unes 24 hores. Però es va poder comprovar que tot el resultat eren cometes, per tant no és vàlid aquest sistema, les cèl·lules es feien malbé i es contaminaven també.
  - 
  - b. Es va intentar guardar les cèl·lules en PBS (1%) durant 24 h. a la nevera, per això va caler fer una prova de viabilitat de les cèl·lules per citometria de flux.
-

Així doncs, per veure la viabilitat de les cèl·lules FAO:

Amb una mostra de solució de cèl·lules en PBS(1%) acabades de tripsinitzar en una quantitat de  $10^5$  cèl·l/ml es va dur a terme la tinció amb iodur de propidi per a l'observació amb el citòmetre de flux i la comptabilització de la viabilitat cel·lular. Al cap de 24 hores es va agafar una altra mostra de la mateixa solució cel·lular mantinguda a la nevera a 4°C durant les 24 hores i es va tornar a realitzar la mesura.

El iodur de propidi és una molècula gran, si la cèl·lula està viva i bé, no pot passar la seva membrana i no es detecta fluorescència vermella dins la cèl·lula, però en canvi, si la cèl·lula no està bé, s'està morint o està morta, pot penetrar la membrana i llavors es detecta la fluorescència dins la cèl·lula.

Es va poder observar que la viabilitat d'una mostra de cèl·lules sincronitzades i extretes a les nou hores en una suspensió de PBS és de 96.2% (una mortalitat de 3.8%), i la viabilitat d'una mostra de cèl·lules extreta de la mateixa suspensió cel·lular però mantinguda a 4°C a la nevera durant 24h. és de 95.8% (mortalitat de 4.2%). Així doncs es va considerar que la viabilitat era la mateixa i es podien mantenir les cèl·lules a 4°C a la nevera un dia, això ens va servir per poder guardar les cèl·lules i fer agrupar mostres per a la realització del comet test i no haver-lo de fer cada tres hores d'extracció, ja que hagués coincidit amb el temps de la següent extracció i no s'hagués pogut dur a terme les dues coses al mateix temps en departaments diferents.

### **3.1.1.c.Resultats i discussió:**

En el cas que les diferents proves haguessin coincidit en l'obtenció dels resultats, n'hauria pogut extreure una mitjana i una explicació conjunta, però això no és el que s'ha donat en aquests experiments, així presentaré els resultats per a les diferents proves, amb un petit comentari, i després, les comentaré conjuntament en una discussió general:

#### Experiment 1:

A partir dels valors de citometria de flux per aquesta línia cel·lular (valors obtinguts de diverses proves realitzades anteriorment), en els intervals de temps 0,2,5,8,12,15,18 hores, es va fer una línia de regressió per a extrapolar els valors en els intervals de 0,3,6,9,12 hores, que són els que vam utilitzar per al comet test, i es va observar si es podia establir alguna primera relació entre els valors de divisió cel·lular, concretament del percentatge de cèl·lules en fase S i la quantitat de comets; tot i ser però, les mostres de la mateixa línia cel·lular, van ser de diferents estocs per aquestes tècniques. (En següents experiments es repetirà amb cèl·lules del mateix estoc, i al mateix moment per a la comprovació de la prova un altre cop).

---

Segons aquests resultats es pot obtenir la taula següent:

**Taula 3.1.1:** Resultats de citometria de flux.

Interval (h.)	% Fase S	IC
0	15.45	38.00
3	5.18	39.50
6	20.68	43.75
9	36.19	49.37
12	53.65	49.50

Exceptuant el valor en el temps 0, és el control negatiu, on no puc explicar perquè hi ha un valor tan elevat de fase S en comparació al temps 3 quan hauria de ser menor o igual, i que no correspon amb un valor més elevat també d'IC en aquest interval que al de 3; tots els altres temps es correspondria molt bé la quantitat de cèl·lules en divisió i el valor d'IC obtingut en la tècnica del cometa. Això ens podria indicar doncs, una influència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test. Però no es pot assegurar del tot aquesta relació degut a la poca correlació en el temps 0, i a que són cèl·lules de diferents estocs en el que s'ha dut a terme les diferents tècniques.

Per això es va realitzar un segon experiment:

Experiment 2:

On es va obtenir els valors següents per a la citometria de flux:

**Taula 3.1.2:** Valors obtinguts per citometria de flux.

Mostra	% G1	% S	% G2
Control +	91.80	1.90	6.25
0	85.95	11.60	2.40
3	85.40	12.00	2.60
6	76.70	15.10	8.20
9	69.10	26.30	4.60
12	58.25	33.30	8.40

**Taula 3.1.3:** Comparació resultats de de SCGE i Citometria de flux.

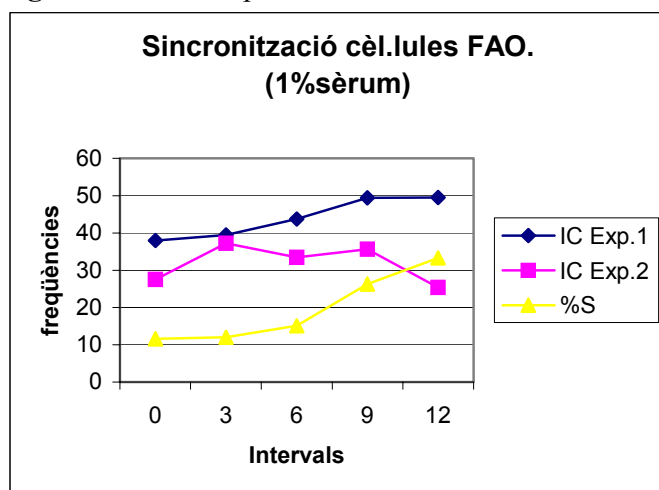
Interval	IC	% Fase S
0	27.50	11.60
3	37.25	12.00
6	33.50	15.10
9	35.62	26.30
12	25.37	33.30

En la taula 3.1.2: Es pot observar uns valors de divisió cel·lular (interpretats en el percentatge de fase S, i la disminució de la fase G1) en augment des de les zero hores a les dotze, essent el creixement més elevat en l'interval de les 6 a 9 hores. El control positiu no va estar sincronitzat, de manera que hi pot haver cèl·lules en tots els estats, i en aquest cas es veu poc creixement, segurament perquè pot haver arribat al màxim de confluència i parar el creixement degut al contacte entre les cèl·lules.

Taula 3.1.3: Si volem comparar els resultats de les dues tècniques (els valors de la fase S d'aquest segon experiment amb els valors de Comet obtinguts en el mateix experiment); s'observa que no hi ha una correlació gaire bona, amb un coeficient de:  $r = 0.38$ ;  $SD = 10.12$ .

Al ser els principis de la realització de la tècnica, van problemes en la realització del test diverses vegades, com també n'hi podia haver per la falta d'experiència, llavors aquesta prova del comet test no era massa fiable. Tot i així es va voler comparar els valors per al comet test (IC) del primer experiment amb els resultats de la citometria de flux d'aquest segon experiment, ja que tot i no ésser les mateixes plaques de cèl·lules, sí eren de la mateixa línia cel·lular i estoc. Obtenint llavors una correlació molt bona amb un coeficient de  $r = 0.93$ ,  $SD = 10.3$ . Com es pot observar en la taula i figura següents:

Fig.3.1.1. Valors representats en la taula 3.1.4.



Taula 3.1.4.

Dosi 1% sèrum			
Interval	IC Exp.1	IC Exp.2	%S
0	38.00	27.50	11.60
3	39.50	37.25	12.00
6	43.75	33.50	15.10
9	49.37	35.62	26.30
12	49.50	25.37	33.30

En aquesta taula podem comparar els valors del primer experiment (Exp.1) i el segon (Exp.2) amb els percentatges de cèl·lules en fase S obtinguts en aquest segon experiment.

Podem veure que els valors d'IC en els dos experiments no són massa similars. S'ha de tenir en compte però, que en el segon experiment es va tardar més dies abans de poder fer les lectures al microscopi de fluorescència de les mostres per al comet test, tot i que no va ser mai més d'una setmana, i les mostres no s'havien fet malbé, ni contaminat, la fluorescència es perd una mica, i si les capes no surten del tot bé, queda un fons massa tenyit a vegades, i costa fer les lectures, en alguns casos potser no es veuen les cues quan n'hi ha o no es veu la seva allargada del tot bé. Eren els principis de fer la tècnica i les capes no quedaven massa bé.

O sigui que no es pot tenir massa em compte aquest experiment, i no es pot concloure, veient aquests resultats tant diferents, que hi hagi alguna relació entre la divisió cel·lular i els resultats del Comet Test.



Experiments 3 i 4:

Per aquests experiments es va suplementar el medi amb el 10% de sèrum per fer més ràpid el creixement i les diferències entre els diversos intervals per intentar poder correlacionar millor, fent més evident, més ràpid el moment de màxima proliferació, i relacionar l'activitat de divisió amb els valors d' IC.

Es van variar els intervals d'extracció de mostres, essent ara a les 0,2,5,7,9,12 per al comet test.

Obtenint una nova taula de valors per citometria de flux en aquest experiment amb suplement de 10% de sèrum:

**Taula 3.1.5:**

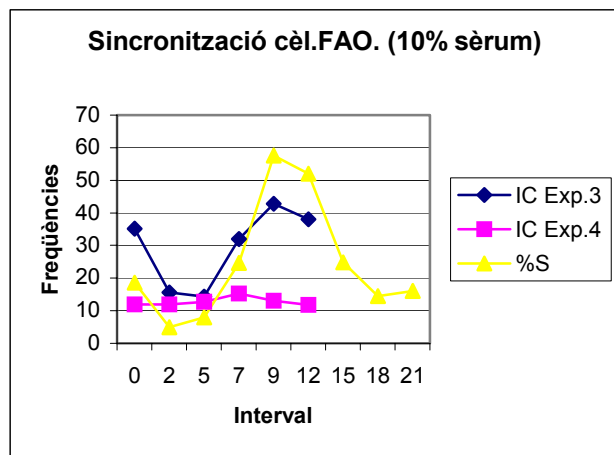
<b>Mostra</b>	<b>% G1</b>	<b>% S</b>	<b>% G2</b>
<b>Contol +</b>	65.80	24.90	9.35
<b>0</b>	78.65	18.60	2.75
<b>2</b>	91.05	4.95	4.00
<b>5</b>	87.85	7.95	4.25
<b>7</b>	70.55	24.65	14.35
<b>9</b>	37.70	57.60	4.75
<b>12</b>	40.60	52.05	7.35
<b>15</b>	49.00	24.80	26.20
<b>18</b>	74.50	14.55	11.00
<b>21</b>	75.15	16.00	8.80

Una vegada més torna a sortir un valor molt elevat en el temps zero per la fase S de síntesi.

Però es pot veure que el creixement major es dona a l'interval entre les 7 i 9 hores i s'estabilitza fins a les 12, començant la davallada de la síntesi en les següents hores. Igualment com passava en els experiments anteriors on el creixement més acusat es donava entre les 5 i 8 hores i entre les 6 i 9 hores, tot i tenir una aportació menor al medi de sèrum que per aquests dos últims experiments, el creixement es donava en els mateixos intervals de temps, encara que no tan marcadament. Però cal veure per això que les línies cel·lulars tenen sempre una corba específica de creixement.

Si es compara aquests valors de la fase S amb els valors de la mitja d'IC obtinguts en el tercer experiment (Exp.3) i el quart (Exp.4) s'obtindria la següent taula i gràfic:

Fig.3.1.2.



Taula 3.1.6.

Dosi 10%Sèrum			
Interval	IC		%S
	Exp.3	Exp.4	
0	35.20	12.00	18.60
2	15.60	12.00	4.95
5	14.25	12.75	7.95
7	32.00	15.25	24.65
9	42.87	13.00	57.60
12	38.00	11.75	52.05

En aquest cas es correlaciona molt bé els valors d'IC amb el percentatge de fase S en l'experiment 3 amb un coeficient de  $r = 0.872$ . On també es pot veure un valor més elevat d'IC en l'interval zero com el cas del percentatge de fase S. Però en canvi fallaria el valor del comet de l'interval 2h., ja que es més gran que pel 5h., a diferència del que passa amb els valors de % S.

Però no es correlaciona IC (obtingut pel SCGE en el quart experiment; Exp.4) amb % de cèl·lules en fase S (de l'experiment 3; Exp.3), amb un coeficient de correlació negatiu i molt petit ( $r = - 0.0041$ ). També podem dir que aquest quart experiment té valors molt més baixos i diferents que l'experiment 3, potser va tenir algun problema de creixement aquest cultiu en la prova 4, si és que realment l'IC està relacionat amb la divisió cel·lular. Però també hi ha el problema que en el cas de l'experiment 3 hi va haver poc nombre de cèl·lules en els intervals 0,2, van costar molt els comptatges, i aquests valors són extrapolats en % perquè no arribaven a les 100 cèl·lules comptades, llavors no es poden considerar del tot fiables o representatius, encara que era un valor de 86 cèl·lules comptades i seria ja suficient per a comparar, però n'he volgut fer el percentatge per a poder comparar.

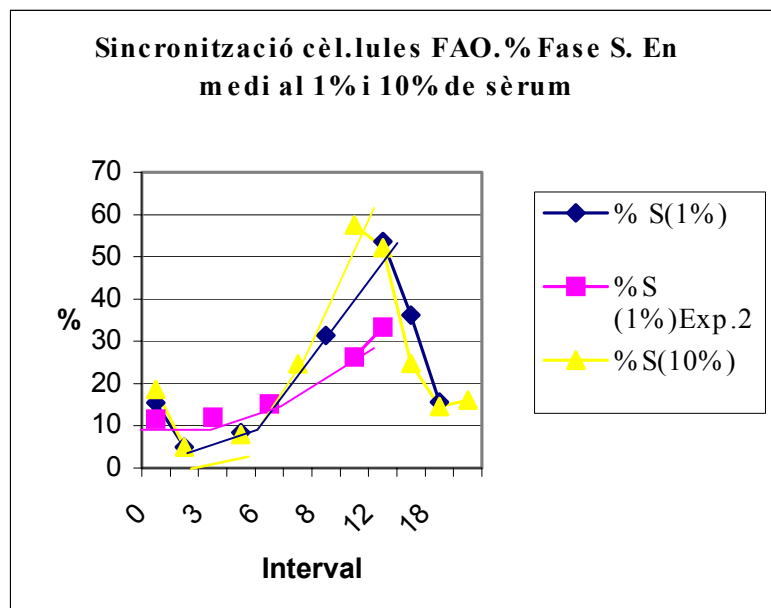
Un altre punt a considerar va ser que el test del cometa realitzat en les cèl·lules dels experiments 3,i 4, aquestes no coincideixen amb les mateixes cèl·lules en que es va fer la citometria de flux, que en aquest cas es va realitzar en un dia diferent amb unes altres plaques, però com ja he dit, no pot variar massa aquest fet ja que tota línia cel·lular té una mateixa corba de creixement, però ja se sap que pot haver algun factor que faci créixer de manera diferent, menor o malament el cultiu en un determinat moment i no sortir els resultats esperats. Així doncs si s'hagués fet la citometria de flux per a les mateixes plaques de l'experiment 4, es podria dir al comparar amb l'IC pel mateix experiment si aquests valors tan baixos d'IC, eren deguts a un creixement reduït d'aquestes cèl·lules.

Per tant d'aquí tampoc es pot concloure de manera ferma si realment la divisió cel·lular interfereix o influeix en els resultats del Comet Test. Un cop més semblaria que lleugerament, però realment no d'una manera molt accentuada ja que els resultats no han estat gaire clars, pot ser per dificultats en els cultius o en la tècnica, o perquè realment sigui així.

Cal dir però, que en tots quatre experiments es veu un creixement, un augment de nombre de cèl·lules en fase S, (de síntesi de DNA) entre les 5 i 9 hores que coincidiria en els diferents experiments amb valors més elevats d'IC també. Així doncs, en una comparació de totes les proves alhora obtindrem els gràfics següents:

En el següent gràfic es comparen les corbes de creixement, segons la fase S d'aquesta línia cel·lular feta per citometria de flux en aquests experiments. On (-■-) correspon als valors de l'experiment 2, on hi havia el medi suplementat amb tan sols 1% de sèrum, i on (-◆-) indica els primers valors utilitzats per a comparar en l'experiment 1, però que no han estat realitzats en el mateix moment que el SCGE, ni amb les mateixes plaques sinó un temps abans. I finalment el cas que es va fer amb el medi enriquit amb un suplement del 10% de sèrum, (-▲-), valors utilitzats per a comparar amb els de SCGE en els experiments 3 i 4. Aquest gràfic ens indicarà que la corba de creixement en un tipus cel·lular, sol ésser similar en tots els casos, excepte si hi hagués algun problema de creixement.

Fig.3.1.3.

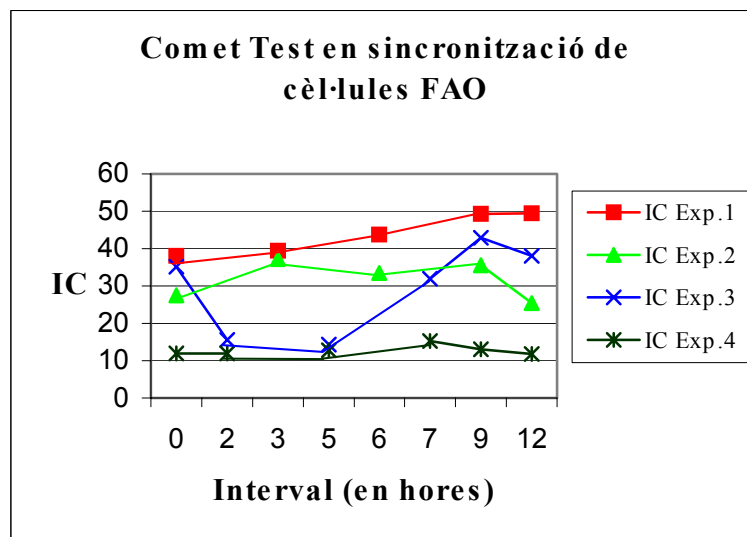


Així doncs es pot veure unes corbes i valors similars en els diferents intervals. Mentre que pels IC obtinguts en el Comet Test en els quatre experiments (Fig.3.1.4) veiem una variació més gran de valors. S'ha de tenir amb compte però, com ja he comentat anteriorment, que eren de les primeres proves fetes amb la tècnica i que no es pot confiar plenament amb els valors.

Cal recordar també en l'observació del gràfic, que pels experiments 1 i 2 es va utilitzar 1% de sèrum en el medi, mentre que en el 3 i 4, va ser el suplement de 10% de sèrum, es pretenia d'aquesta manera, un creixement més ràpid i accentuat en un medi més enriquit amb sèrum. De fet, es pot observar la pendent una mica més suau en l'interval de major creixement (entre les 5 i 9 hores), per a les cèl·lules amb 1% de sèrum al medi, respecte les que creixen en medi enriquit al 10%, cosa que reflexaria el creixement més pronunciat en aquest últim cas.

És interessant doncs, fixar-nos en l'interval de creixement de les 5 a les 9 hores per a comparar amb els resultats del comet test. Així si observem el gràfic següent (Fig.3.1.4.) on comparem els valors d'IC de tots els quatre experiments alhora, veurem un lleuger augment d'aquest índex en aquest interval, malgrat haver hagut problemes tècnics, i que es va veure problemes de creixement per l'experiment 4, amb valors molt baixos.

Fig.3.1.4.



Discussió general:

En els quatre experiments s'ha pogut trobar una variació considerable en els valors d'IC, no seguint gaire els dels percentatges de cèl·lules en fase S. No es pretenia obtenir uns resultats en els que es pogués observar una correlació perfecte entre els dos experiments, i en el que es contemplés clarament que el valor d'IC anés augmentant a mesura que el % en fase S fos superior, cosa que ens faria dir que realment el Comet test variaria segons la posició del cicle cel·lular ja que es veuria afectat per l'estadi de síntesi, que es podria detectar com a possible dany, i faria augmentar el valor basal de dany mesurat pel SCGE, mentre que en realitat seria un fals positiu que donaria aquest augment afegit del valor d'IC.

Olive & Banáth (1993); Šalagovič et al. (1997); Villani et al.(2000), van trobar valors de *Tail Moment* superiors en les cèl·lules en fase S, que en les altres fases ( $G_1$  i  $G_2$ ), segurament degut a la presència de llocs de replicació, que es traduirien en SSB durant el tractament alcalí, i

avaluarien les diferències sotmeses a diverses dosis d'un agent genotòxic, indicant que hi pot haver una variació en la detecció del dany al DNA depenent del cicle cel·lular a baixes dosis de l'agent provat, mentre que en dosis més elevades s'obtidrien valors similars pels diferents estadis del cicle. Malgrat que en aquests treballs van utilitzar un sistema d'anàlisi d'imatges amb un programa determinat per al comptatge dels comets, nosaltres vam fer servir un sistema diferent (sistema visual, *by eye*), varis autors, com ja he comentat anteriorment, van trobar una correlació bona entre els dos sistemes de mesura (Collins et al.1997b; Piperakis et al.1999 entre d'altres), considerant doncs el sistema visual totalment vàlid. Encara que no presenti els histogrames de freqüències de grups de % de *Tail Moment*, com els autors anteriors, els quals van trobar més nombre de les categories de valor més elevat de *Tail Moment* en les cèl·lules estimulades per a la divisió; el nostre valor d'IC, també hauria de presentar un augment en els intervals de temps on hi ha més quantitat de cèl·lules en fase S. Aquest augment existeix en els intervals de 5 a 9 hores per a tots els experiments realitzats, però és un petit augment (exceptuant l'experiment 3 on és més evident), i es pot correspondre amb el moment que també hi ha valors elevats de cèl·lules en fase S. Però la correlació en general pels diferents intervals de temps, no és gaire bona. Podria donar diverses explicacions per això, com el fet que els autors citats anteriorment, utilitzen altres tipus cel·lulars, com CHO (cèl·lules d'ovari de hámster xinès), V79 (fibroblasts de pulmó d'hámsters xinesos), TK6 (fibroblasts humans); *Murine fibroblasts C3H10T1/2*; limfòcits respectivament. En tots els casos en aquests treballs, hi ha duplicació de DNA, i forques de replicació, llavors, en principi no hauria de variar per a diferents tipus cel·lulars i s'hauria de detectar més o menys de la mateixa manera per a tots, encara que pugui variar la corba de creixement per a diferents tipus cel·lulars. No ho es pot atribuir tampoc a la diferent forma de mesura (pel sistema informatitzat d'anàlisi d'imatges, utilitzant el paràmetre del TM, i el visual, amb l'índex IC).

El primer i segon experiments van ser realitzats molt al principi de l'ús de la tècnica del SCGE, i els resultats poden ser no massa representatius, ja que la metodologia s'ha anat perfeccionant paulativament.

Aquest tipus cel·lular, del mateix estoc, va ser utilitzat al mateix temps en altres experiments, trobant també algun problema en les cèl·lules que no responien com calia als tractaments, així doncs, s'han de valorar adequadament els resultats, i seria bo incrementar el número de proves, que ens podrien indicar una mica més el que passa.

En quan al tipus cel·lular escollit, no es creu que sigui el problema, i pot ser vàlid com altres tipus de cèl·lula.

Una altra qüestió a discutir és el fet de no dur a terme el Comet Test de seguida que es treien les mostres, ja que encara que s'hagués fet la prova de viabilitat, això no ens diu pas que les cèl·lules no puguin tenir una alteració o que encara que en el medi en què estan no hi hagi factors de creixement, i siguin mantingudes en fred, cosa que faria en principi, que la seva activitat s'aturés, durant el trasllat i la manipulació. Però podria ser que en aquest període d'espera, d'alguna manera, la seva activitat continués, i llavors no sé realment què està passant amb la divisió cel·lular o l'estat de la cèl·lula. Des del moment en què s'observa que es tornen a ajuntar les cèl·lules després de la separació per tripsinització mentre estan en la solució de PBS fred a la nevera, no sé fins a quin punt pot ser cosa de la seva activitat, o no, o com pot variar el

seu estat. Podrien haver entrat en un estadi d'apoptosi, tot i fer el test de viabilitat, podria ser que no es detectés ja que en les primeres fases de l'apoptosi la membrana no canvia la permeabilitat, però en canvi ja ha començat la fragmentació del DNA, això també podria fer-nos augmentar el nombre de cometes, tot i que llavors ens trobaríem en la nova discussió de les formes de comet que s'atribueix en aquests estadis. Sempre és millor processar les mostres de seguida i no guardar-les. En cas que no es pugui com en aquest, s'ha de buscar els moments en que es pot "aturar" el procediment sense que introdueixi alteracions als resultats, i en aquest cas, el millor hagués estat segurament, posar les cèl·lules en agarosa, i mantenir-les en la solució de lisi a 4°C a la foscor durant unes hores. Tal com ja s'ha comentat per varis autors es pot tenir fins a una nit sense que hi hagi canvis (McKelvey-Martin et al.1993, entre d'altres), encara que trobo més recomanable no tenir-lo més de tres hores,(Piperakis et al.1999, indica que fins a 3 hores no altera l'expressió del dany al DNA de les cèl·lules significativament), o 6 hores, tal com vàrem poder comprovar en alguns experiments posteriors en que no es van trobar diferències en aquest major temps en líquid en comparació amb el temps utilitzat normalment (1 hora, o fins a 2 segons els casos).

Així, tot i que els resultats són una mica confusos o difícils d'interpretar en el nostre cas, no el podem considerar un tema menys important, seria interessant continuar amb aquest tipus d'estudis, i tenir en compte aquesta influència de la divisió cel·lular, que malgrat tot, es pot veure d'alguna manera en aquestes proves. En aquest cas, les explicacions de la variació en els diversos experiments i dels resultats pocs clars poden ser més deguts a la falta d'experiència, i errors en el procediment, que no pas degut al diferent tipus cel·lular utilitzat i diferent tipus de mesura utilitzat per al comet test respecte als autors citats.

Es continua fent servir tot tipus cel·lular pels experiments amb el comet test, això també ens podria indicar que la interferència no seria tan gran, si considerem, però, els resultats dels autors anteriorment citats, (Olive & Banáth,1993; Šalagovič et al.,1997; Villani et al.,2000 entre d'altres), que indiquen la possible interferència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test a baixes dosis, i, com ja havia comentat abans, Olive et al.(1991); Olive & Banáth(1993) i Olive (1999); Villani et al.(2000), indiquen la influència de l'estat del cicle cel·lular en la reparació durant l'exposició a una determinada dosi d'un agent genotòxic, es veu la importància d'aquest punt, i s'hauria de tenir en compte. Més recentment encara, Choucroun et al.(2001), indiquen que en estudis realitzats han vist que la fase del cicle cel·lular influeix en els paràmetres de *comet tail*, però no prou per distorsionar la interpretació dels resultats.

### 3.1.1.d.Conclusions:

1. Malgrat tots els problemes de les diferents proves, i al que es podria considerar com una petita manca de consistència dels resultats, es pot observar que en un moment donat (temps entre 5-9 hores) on hi ha un augment de la síntesis de DNA degut a la divisió cel·lular, (mesurat mitjançant la citometria de flux) es pot relacionar amb un valor una mica més alt d'IC per al Comet Test en el mateix interval de temps. Això ens podria indicar doncs, d'alguna manera, la influència d'aquesta al SCGE.
-

### 3.1.2.Divisió cel·lular: Intestí Prim- Intestí Gruixut

#### 3.1.2.a.Introducció:

És conegut que l'activitat de l'intestí prim i la del budell gruixut són una mica diferents; si ho considerem a nivell de divisió cel·lular, tenim que en els dos casos hi ha una renovació cel·lular important de l'epiteli. Degut a aquesta activitat i al fet que hi ha aquesta possibilitat de la influència de la divisió cel·lular sobre els resultats del comet test, es va voler fer una prova comparant els dos tipus d'intestí, ja que, en l'epiteli de la mucosa del jejú es dona el ritme més ràpid de renovació cel·lular de tots els teixits del cos (Fawcett, 1995). Trobaríem així, una taxa de divisió cel·lular més elevada en les mostres de la mucosa de l'intestí prim que a les del colon.

D'aquesta manera, es va dur a terme el SCGE a partir de mostres de l'epiteli de l'intestí prim, (del jejú), i del colon, esperant trobar una quantitat més elevada de cometes en el primer relacionada amb aquesta activitat més elevada de renovació cel·lular. Cal tenir en compte però, que en els dos casos podia sortir un nombre alt d'imatges de cometa degut a l'elevada activitat de divisió, si és que aquesta hi influïa d'alguna manera clara.

Al mateix temps es va realitzar un comptatge de mitosis en els dos intestins a partir de mostres histològiques d'aquests, per a comprovar que en la part de l'intestí prim recollida es donaven un recanvi cel·lular major que al colon, i llavors hi veuríem més mitosi.

#### 3.1.2.b.Material i Mètodes:

Es va utilitzar 10 rates joves, control, ja que pertanyien a un experiment en el que es mirava l'efecte de les dietes amb o sense colesterol, i l'efecte de les vitamines (com a protectors del dany oxidatiu, antioxidants; Anderson et al.1994; Hartmann et al.1995; Konopacka et al. 1998; entre molts d'altres) en el dany al DNA a diferents teixits, i es va aprofitar per fer paral·lelament aquesta prova, utilitzant però, com ja he anomenat, els control per no tenir cap alteració dels resultats degut a altres factors que podrien influir en els resultats.

Es va extreure una mostra d'intestí prim, i de colon. Una part de les mostres es van preparar per a la histologia, amb les altres es va realitzar el comet test, amb algunes variacions respecte al comentat en els capítols anteriors, degut a la necessitat de la preparació d'una suspensió cel·lular a partir d'un teixit, i altres variacions més en el procediment del SCGE, degut a que es va realitzar l'experiment en un altre laboratori; com ja havia comentat diverses vegades, el protocol per al SCGE no està estandarditzat encara, i varia entre els diferents laboratoris.

---

Protocol per al procediment histològic:

. De cada rata es va agafar també una part del colon i una part de l'inici de l'intestí prim que es fixaren en formalin al 10%, pel posterior tractament per a la histologia:

. Inclusió en parafina:

Es deixaren les mostres en aigua de l'aixeta, una hora amb l'aigua corrent. Cinc canvis en etanol de 96° cada mitja hora, o una hora, i es deixaren tota una nit en l'últim canvi. Dos banys d'acetona de 30 minuts. Tres rentats amb xilol de 2h cada un. Primer bany de parafina a 56°C durant 2 hores. Segon bany de parafina, tota la nit. Un tercer bany de parafina, i es passaren a fer els blocs.

Es tallaren els blocs amb el micròtom, talls de 5µm.

. Tinció: Hematoxilina-Eosina:

- Xilol ..... 10 minuts
- Alcohol de 96° ..... 5 minuts
- Alcohol-Formol\* ..... 10 minuts
- Hematoxilina de Mayer ..... 6 minuts
- Aigua bàsica (pH:9) ..... 10 minuts
- Eosina ..... 5 minuts
- Alcohol absolut 1 ..... 1 minut
- Alcohol absolut 2 ..... 5 minuts
- Alcohol absolut 3 ..... 10 minuts
- Eucaliptol ..... 10 minuts
- Muntatge en DPX.

(\*Alcohol-Formol: alcohol de 70°, 9 parts – formol comercial, 1 part).

. Es comptaren les mitosi existents en tres camps d'observació a 400x per a cada mostra, es va fer la mitjana pels valors de mitosi en colon i en intestí prim per als 10 individus .

Comet Test per a mostres d'intestí:

Preparació de mostres de colon i intestí prim(rata):

- Treure un tros d'intestí (colon i budell prim en aquest cas) aproximadament d'un centímetre de llarg, posar-lo en PBS (1%) i guardar-lo en gel a 4°C.
  - Tallar l'intestí longitudinalment.
  - Fer un raspat amb una espàtula per treure les cèl·lules de la mucosa.
  - Posar les cèl·lules en un tub amb 2 ml de tripsina.
  - Incubació a 37°C durant 10 minuts (al bany).
  - Barrejar bé amb la pipeta, per ajudar a la tripsina a separar les cèl·lules.
-



- Posar 3ml de PBS + sèrum (90% de PBS a l'1% + 10% sèrum). Es barreja bé i es deixa en gel uns entre uns 5 i 10 minuts perquè precipitin els trossos grossos.
- Treure el sobrenedant i posar-lo en un tub de centrífuga . El sediment es llença.
- Es centrifuga el sobrenedant a 1000rpm. durant uns 5 minuts.
- Es treu el sobrenedant i es llença.
- Es posa el sediment en un tub amb 0,5ml de PBS + sèrum (90% de PBS a l'1% + 10% sèrum) i es barreja bé.
- D'aquí se'n treuen 35µl, que es posen en un tub Eppendorf, on s'afegeixen 85µl d'agarosa LMP per fer la 2<sup>a</sup> capa d'agarosa

#### Procediment del comet test:

En portaobjectes normals (no rugosos) amb una banda esmerilada, prèviament preparats de la següent manera: bullits amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , deixar-los refredar i assecar, se'ls fa una capa d'agarosa que es deixa assecar a l'estufa, i així poder fer de base d'adherència per a les següents capes (protocol explicat a l'apartat 1.2.b del capítol 1):

- Es fa una primera capa de 85µl d'agarosa de punt de fusió normal a l'1%. Es posa un cobreobjectes de 20x20mm i es deixa refredar en una placa amb gel durant 5 minuts. Es treuen els cobreobjectes.
- Segona capa amb 85µl de la barreja de 85µl d'agarosa LMP a l'1% amb els 35µl de la suspensió cel·lular. Es posa el cobreobjectes per estendre i deixar la capa plana i homogènia. Deixar solidificar durant cinc minuts en una placa metàl·lica sobre gel. Treure els cobreobjectes.
- Es posen els portaobjectes amb les mostres en una cubeta de tinció que conté la solució de lisi freda (NaCl 2.5M; EDTA 0.1M, Tris 10mM, NaOH fins a aconseguir el pH=10; i just abans el seu ús afegir 1% de Triton X-100 ) durant una hora a la nevera, a les fosques a 4°C.
- Passar els portaobjectes al tanc d'electroforesi on hi ha la solució d'electroforesi freda (NaOH 0.3M, EDTA 1M) i preparada tan sols unes hores abans del seu ús. Es deixen a la nevera a 4°C , a les fosques durant 40 minuts perquè es doni el desenrotllament de les cadenes.
- Electroforesi durant 30 minuts a 25 V i 300 mA.
- Tres rentats de 5 minuts amb tampó Tris (0.4M) de neutralització, fred. (Es posen en cubetes de tinció a la nevera a les fosques per a fer els rentats).
- Tinció amb 20µl de bromur d'etidi, i es guarden a la nevera en una caixa amb un paper humit amb aigua destil·lada, i a les fosques.
- Comptatge amb el micròscopi de fluorescència connectat al programa específic l'anàlisi d'imatges del sistema Komet 3 .Kinetic Imaging Liverpool.
- Es comptaven 25 cèl·lules per porta. Dos portaobjectes per a mostra.

#### Discussió de la tècnica del comet test:

En aquest cas, aquests experiments es van realitzar en un altre laboratori.(Dr.R.Štětina). Com ja havia comentat anteriorment, cada laboratori fa servir el seu propi protocol ja que encara no està establert un model exacte i estàndard de protocol, encara que tots els passos són els mateixos per a tots els diferents autors, varien els temps de lisi, desenrotllament, electroforesi, les condicions

---

de l'electroforesi, i composició dels reactius, el colorant utilitzat, i altres petits detalls en el procediment, són però, de moment, vàlids tots els sistemes. Mentre algunes de les variacions són conduïdes o adaptades al que es vulgui detectar, moltes d'altres no, això fa que hi hagi uns intervals dels valors de temps d'alguns passos de la tècnica, per exemple, o altres tipus de canvis que no farien variar o no afectarien massa els resultats, de tota manera, cal sempre anomenar-los per a poder comparar entre els diferents autors. Un recull de diverses de les variacions estan en els *reviews* de McKelvey-Martin et al. 1993, Fairbairn et al.(1995), Rojas et al.(1999); Piperakis et al.(1999); Tice et al.(2000).

Es pot comprovar que el procediment de la tècnica del SCGE en aquest cas, té unes petites variacions tan sols respecte el procediment presentat en els capítols anteriors:

- Com la concentració de l'agarosa LMP, en aquest cas de l'1% (cal indicar que era una altra marca d'agarosa, en aquest cas Sigma).
- La quantitat d'agarosa en cada capa, en aquest cas és de 85µl per a la primera i segona capes, en comptes de 110 i 80 µl respectivament, com havia fet anteriorment en el capítol 1.
- La quantitat de suspensió cel·lular en aquest cas és de 35µl, en comptes de 10 o 20µl.
- La utilització de cobreobjectes més petits, de 20x20mm.
- L'ús alternatiu de porteobjectes normals, no rugosos, preparats prèviament per a poder fer de base de les capes d'agarosa. Essent més còmode, no sols pel preu més econòmic, sinó perquè es veuen millor les imatges, més netes, sense tan soroll de fons, són reciclables, etc..
- En el cas del líquid de lisi, la seva preparació és igual excepte que no posen DMSO. Hi ha diversos protocols ara en que ja no l'utilitzen. És més còmode manejar i preparar aquesta solució sense el DMSO, ja que és tòxic, tot i que està en concentració baixa, seria més recomanable no usar-lo. S'ha pogut veure que els resultats no varien tan si es posa com si no en la solució de lisi. I com ja s'havia comentat anteriorment, segons Tice et al.(2000), el fet de posar DMSO era per prevenir el dany al DNA per la inducció de radicals, associat al ferro que s'allibera durant la lisi dels eritròcits presents en les mostres de sang o de teixits. D'aquesta manera no seria necessari en molts casos.
- El temps de desenrotllament és en aquest cas de 40 minuts, i no de 20 (tot i que segons Tice et al.2000, els 20 minuts són suficients pel desenrotllament), i es dona lloc a la nevera en comptes de posar el tanc sobre una safata amb gel.
- El temps d'electroforesi és de 30 minuts i no de 20, a la nevera a 4°C també.

En quan a la variació entre els temps de desenrotllament i de durada de l'electroforesi: No totes les classes de danys al DNA *alkalino-làbils* són susceptibles a l'escissió dins els 20 minuts d'exposició a l'alcalinitat, i per tant un augment de duració en el temps del tractament alcalí pot augmentar l'expressió de les lesions alcalino-làbils. La longitud de la migració del DNA és directament dependent de la duració de l'electroforesi. Així si incrementem la duració dels dos passos, ha de facilitar la detecció d'un augment del nivell de dany a baixes dosis d'irradiació per exemple tal com proposa Vijayalaxmi et al.(1992). D'aquesta manera hi ha variacions entre els diferents laboratoris, en els que van de temps de durada pel desenrotllament entre un mínim de 20 minuts fins a 60', i per l'electroforesi d'entre 5 i 40 minuts dependent del tipus de cèl·lula i el propòsit de l'experiment (Tice et al.2000). Així doncs, són vàlids tots els temps i segons els diferents experiments o el que es vol aconseguir, poden variar, llavors, com ja s'ha comentat

anteriorment, és necessari explicar la metodologia emprada amb detall per a la comparació dels resultats en els treballs dels diferents laboratoris (Speit & Hartmann, 1999).

- La tinció és amb bromur d'etidi, i no amb DAPI, es poden utilitzar varis tipus de colorants per a la tinció del DNA, més o menys igualment eficients, com també seria el Hoetch, iodur de propidi, YOYO-1, SYBR Green, etc.(Tice et al.2000).
- Sistema de comptatge amb un programa d'anàlisi d'imatges específic per al comet test.(Komet 3.0). Objectiu de 20x. Filtre G2A del microscopi de fluorescència. Es comptaven 25 cèl·lules per porta i es feien dos portaobjectes per mostra. Els dos sistemes de comptatge, visual i d'anàlisi d'imatges són vàlids, com ja s'ha comentat en diverses ocasions.

### 3.1.2.c.Resultats:

**Taula 3.1.7.**Paràmetres en forma de mitjana dels valors:

	Cell Area	Head DNA	Tail DNA	L/H	Tail Moment	Tail Lengh	Comet Mode	Comet Mean	Comet std.Dev.
I.Prim	1314.048	56.77	43.22	3.27	41.68	58.84	80.750	86.22	16.43
Colon	2129.635	60.43	39.56	2.95	39.84	56.20	89.019	94.48	16.92

Aquests paràmetres els dóna aquest programa informàtic específic per al comet test, en aquest cas ens interessava fixar-nos en la quantitat de DNA a la cua (*Tail DNA*).

**Taula 3.1.8.**Comparació del *Tail DNA* sobre les mostres d'intestí prim i colon:

Mitjanes	Tail DNA	SD
Budell Prim	43.22	9.8
Colon	39.55	12.9

No és estadísticament significativa la diferència, test de la t-student:  $t=0.7109$ ;  $SD=0.48$ .

Els valors aproximats de mitosis obtinguts en el comptatge de les mostres histològiques, ens indiquen un major nombre d'aquestes en intestí prim que en colon, de l'ordre del doble. (Mitjana de mitosis per a I.Prim=18.8; mitjana per al colon=8.5).

### 3.1.2.d.Discussió:

Per a la comparació, es poden fer servir diversos valors dels que quantifica el sistema d'anàlisi. De fet, és encara avui dia que hi ha discussió entre quins dels valors és el més adequat per a fer les comparacions; per alguns autors és millor utilitzar el *Tail Moment*, i per altres, el % DNA a la cua. Cada cop s'intenta aconseguir un paràmetre més bo per a l'anàlisi de les dades, i se'n treuen de nous, com *Olive Moment*, etc... En aquest cas es va utilitzar el percentatge de DNA a la cua

(*Tail DNA*); és un dels paràmetres més utilitzats últimament i es va creure en aquest moment que era el més adequat. En aquest cas, es pot observar però, que els valors d'aquests dos paràmetres (*Tail Moment* i *Tail DNA*) no són gaire diferents.

Es pot veure una lleugera diferència de valors de *Tail DNA*, més elevats en el cas de l'intestí prim, però no és estadísticament significativa la diferència (amb uns valors de 43.2 i 39.5 per al budell prim i el colon respectivament). Cal tenir en compte, però, que en el comet test sovint ens movem amb valors petits de diferències, però bé, volíem veure si es podia observar més nombre de cometes en les mostres on hi ha més divisió cel·lular, i aquí es pot intuir malgrat que les diferències són petites. Tan sols amb aquests resultats no ho podem confirmar. Si observem els valors pel *Tail Moment*(TM) són més petits encara i la diferència és gairebé nul·la (41.6 per al budell prim i 39.8 per al colon), es podrien considerar que no són diferents. Però si tenim en compte els experiments d'altres autors, (tot i que utilitzen altres tipus cel·lulars i altres maneres de mesura), per exemple, Villani et al.(1999) que indiquen que els resultats obtinguts pel comet test en seu cas, mostren una freqüència basal similar de trencaments de cadena i ALS tant en cèl·lules en fase exponencial de creixement com en la fase d'estabilització. Mentre que Olive & Banáth (1993) indicaven que en les cèl·lules que utilitzen per la prova, en les que no s'havien sotmès a radiació, trobaven diferències cicle-dependents., en el que el *Tail Moment* (TM) resultava entre 1 i 2 unitats superiors en les cèl·lules en fase S respecte les G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub>, on podríem veure que aquestes diferències tampoc són gaire grans. En el nostre experiment no mesuràvem directament els valors de TM en les diferents fases, sinó que ho fèiem de manera global, en dues poblacions cel·lulars que tindrien barrejades cèl·lules en tot tipus d'estat, d'un teixit on el recanvi cel·lular és molt gran, i en el que trobaríem moltes mitosis, i també cèl·lules en exfoliació, però on la majoria serien cèl·lules en repòs. Tot i això, hi hauria un nivell elevat de divisions, per tant de síntesis de DNA, i esperàriem trobar valors elevats d'aquests paràmetres en relació a aquesta activitat; potser hauríem d'haver comparat altres tipus cel·lulars més diferents en quan a taxa de divisió. Taxa que tampoc coneixem en aquest cas exactament al no haver realitzat la mesura amb una altra tècnica específica per avaluar la quantitat de cèl·lules en divisió i en una fase o una altra. A partir de la histologia, en valors aproximats de comptatges en els talls, podem tenir la idea de que en un cas hi hauria una quantitat més elevada de mitosis (intestí prim) que en l'altre (colon). Malgrat que la tinció utilitzada (Hematoxilina-Eosina) no ens permet veure totes les fases de la mitosi, com la profase, que és la de més durada, i podríem estar subestimant el nombre de mitosis que hi ha al fer els comptatges; però al fer-los de la mateixa manera pels dos tipus d'intestins, és comparable la mesura pels dos alhora, i ens indicaria la diferència que hi ha entre els dos, mentre que la relació amb el comet test, seria ja diferent, no podent establir valors comparables, sinó més aviat només ens serviria (la histologia) com a un indicador de la major divisió, i llavors poder intentar establir o no, una relació amb els resultats del test del cometa, que en aquest cas es mostren una mica superiors en intestí prim que en colon, com ja he comentat, i que es podria, d'alguna manera, relacionar amb aquesta major activitat de divisió en aquesta part de l'intestí prim. Queda, però lluny d'una afirmació clara, caldria abans fer diverses proves més.

Amb les observacions directes de les imatges del comet test al microscopi, es van veure moltes imatges de cometa, però semblaven molt similars els dos tipus de mostres d'intestí, sense poder apreciar cap diferència a primer cop d'ull de la quantitat major en un cas que en l'altre de figures amb cua.

Potser el tipus cel·lular no va ser el més adequat per demostrar això, ni la comparació entre els dos intestins va ser prou encertada per trobar diferències suficientment evidents, potser realment no es veuen diferències gaire accentuades en els dos casos perquè no hi són. De tota manera continua essent un tema una mica confús, ja no sols pels nostres resultats sinó pels dels altres autors també.

S'hauria pogut establir un sistema de mesura amb el SCGE per saber en quin estat del cicle cel·lular estaven les cèl·lules, com el que utilitzen Olive & Banáth (1993) i Villani et al.(1999), en el que mesurant el contingut de DNA (en forma d'intensitat de fluorescència total en unitats arbitràries), van establir uns valors per separar les diferents fases: on si la mitja del contingut de DNA era  $\leq 5$  era G1; si era  $\geq 9$  seria la població en G2; i per les cèl·lules en fase S són valors entre 6 i 8, trobant que es corresponia amb el que trobaven per citometria de flux; i llavors els comparaven amb els valors de *Tail Moment*, per avaluar les diferències en la sensibilitat de dany al DNA i la capacitat de reparació en les cèl·lules en diferents estadis de proliferació i del cicle cel·lular. Tot i que és una mica confús, (com ja havia comentat anteriorment, Villani et al.1999 indiquen que els resultats obtinguts per al comet mostra una freqüència basal similar de trencaments de cadena i ALS tant en cèl·lules en fase exponencial de creixement com en la fase d'estabilització, però troben variables respostes al tractament amb un genotòxic. Olive & Banáth,1993 i Šalagovič et al.1997, troben diferències cicle-dependents en el *Tail Moment*, i diferències en la inducció o reparació dels SSB deguts a radiació segons la posició del cicle, parlant de baixes dosis) , sembla que la relació seria prou bona, així que es podia haver fet aquest tipus de prova, i comparar-ho amb la citometria de flux.

De tota manera, l'avaluació en aquest teixit, que hauríem utilitzat per a mesurar la possible interferència en els resultats per al comet test, presentaria alguns problemes: per una part, el que pot ser degut a l'obtenció de les cèl·lules, ja que es fa un raspap de l'epiteli intestinal, d'on es recull les cèl·lules de la mucosa. Tot i fer un raspap de diverses passades, les cèl·lules en mitosi es concentren a la base de les criptes de Lieberkühn, són les cèl·lules regeneratives que tenen una activitat de divisió elevada i que es van desplaçant cap a la part més externa de la cripta a mesura que es van diferenciant en els diferents tipus cel·lulars de la mucosa. Potser el raspap no arribaria prou a la base, prou a prop de la submucosa que és a on dona la major concentració d'aquestes cèl·lules en divisió, i potser per això, no podríem trobar un nombre elevat de cèl·lules en mitosi en les mostres per al SCGE. De tota manera, aquí no hem pogut avaluar (mitjançant una metodologia específica pel comptatge de mitosi) la quantitat que n'hi hauria en la mostra de la mucosa utilitzada per aquesta tècnica. En els dos intestins hi hauria una gran activitat de divisió, i potser hauria estat millor comparar el valor basal per al SCGE de l'intestí prim amb un altre tipus cel·lular de menor activitat de renovació, però tampoc el podríem atribuir, en cas que fos més elevat el valor basal per al SCGE, a aquesta major proliferació d'una manera ferma. Un altre punt a tenir en compte però, és el fet que en els intestins, aquesta elevada divisió és degut al recanvi tant ràpid, per tant, hi ha una descamació important de cèl·lules, una renovació elevada, i això fa que potser moltes de les cèl·lules que podem trobar en la mucosa, siguin en estat moribund, i podríem trobar moltes figures en apoptosi, o un dany major que en altres teixits, i que potser ens faria també augmentar els valors de mesura de dany per al comet test. De tota manera, això no voldria indicar que el comet test no es pogués dur a terme en aquest tipus de teixit degut a aquests factors que farien augmentar el

*background*; en molts casos han estat utilitzats mostres de cèl·lules procedents dels intestins, per a valorar els efectes de determinats genotòxics (per alguns exemples, *review* Rojas et al.1999).

Així doncs, aquesta petita diferència de valors obtinguts pel SCGE en els dos tipus de mostra, que es podrien considerar deguts a la divisió cel·lular, i causarien una interferència en els resultats del comet test, no són valors prou clars per a afirmar que la divisió cel·lular afecti els resultats del SCGE, i si fos així, no afectaria massa. No és la prova més adequada per avaluar el que ens proposàvem, si es repetissin els experiments, seria millor en altres tipus de teixits, ja que potser la diferència en quan a divisió cel·lular entre els dos intestins no és prou gran com perquè pugui reflectir-se d'una manera més clara la seva influència en el comet test. Hagués calgut utilitzar paral·lelament altres tècniques per a mesurar l'estat de divisió de les cèl·lules, i la quantitat.

### 3.1.2.e.Conclusions:

1. A partir de la histologia s'ha pogut veure un major nombre de mitosis en el budell prim que en el colon, com ja esperàvem.
  2. Amb els resultats obtinguts per al SCGE, trobem que no hi ha diferències significatives estadísticament entre l'intestí prim el colon, però els valors són una mica diferents, essent més elevats en el cas del l'intestí prim. Cosa que ens podria indicar, o ho podríem interpretar, com: malgrat que aquesta diferència sigui de valor petit, concordaria amb la hipòtesi de que trobaríem més elevada la detecció de dany al DNA, mesurat amb el Comet Test, en l'epiteli de la mucosa de l'intestí prim que en el del colon degut al major ritme de recanvi cel·lular que es dona al primer respecte al segon (comprovat amb la histologia), que es traduiria erròniament en un dany addicional de DNA, i ens faria incrementar el dany basal cel·lular del que partim, no essent un veritable dany. No es pot afirmar, però, a partir d'aquest petit experiment, que potser no és el més adequat per a veure el nostre propòsit, que la divisió cel·lular interfereix en els resultats del SCGE.
  3. De tota manera les diferències trobades són petites corresponent amb les d'altres autors, com ja s'ha comentat anteriorment, els quals consideren que tan sols poden interferir en mostres tractades a petites dosis de l'agent genotòxic. Estic però, d'acord amb Šalagovič et al.(1997), quan diu que els resultats de cometes en cèl·lules que no estan sincronitzades, s'han d'interpretar amb cura.
-

### 3.1.3.Divisió cel·lular: Fibroblasts

#### 3.1.3.a.Introducció:

Un cop més per intentar veure la relació divisió cel·lular amb la quantitat de comets es va voler sincronitzar un tipus cel·lular, en aquest cas HEL Fibroblasts (*Human Embryo Lung Fibroblasts*). Igualment com les cèl·lules FAO, aquestes també creixen en monocapa adherides a la placa, però en diferència, aquestes no provenen d'una línia tumoral, així doncs el dany basal que es pot trobar seria més baix.

Cada tipus cel·lular té una corba concreta de creixement, amb uns màxims de divisió en diferents hores segons el tipus cel·lular, i també depenent de la quantitat de factors de creixement afegits al medi.

En aquest cas, per comparar la divisió, es van sembrar plaques a diferents intervals de temps; en unes plaques es va dur a terme l'electroforesi i es va fer tot el procés del SCGE, mentre que en paral·lel, altres plaques dels mateixos intervals de temps, es mantindrien en tampó de neutralització després de la lisi sense fer l'electroforesi, per poder comparar les intensitats d'unes, i altres mostres, i relacionar-ho amb les imatges del comet test. Es va pensar en la possibilitat que es pogués detectar més intensitat si hi havia més quantitat de DNA al nucli en les imatges on no hauria corregut l'electroforesi, estarien en estat de replicació, de síntesi de DNA, i la intensitat seria més elevada. A partir d'aquí es volia comparar amb els resultats obtinguts amb les altres mostres en les que es va fer el comet test, on s'esperaria trobar valors més elevats de comets en relació a les intensitats més elevades en determinats intervals de temps, indicant-nos d'alguna manera la relació entre la divisió cel·lular i el major valor de comets.

Es van dur a terme dos experiments, en el segon dels quals es va augmentar el nombre d'intervals de temps en què s'extreien les mostres :

- 3.1.3.1. Primer Experiment.
- 3.1.3.2. Segon Experiment.

#### 3.1.3.1.Primer Experiment

##### 3.1.3.1.a. Introducció:

Es va fer una prova en HEL fibroblast en unes determinades condicions per a sincronitzar-les, per intentar veure un cop més la relació de l'estat de divisió de les cèl·lules amb els valors del SCGE. Es va pensar en que es podria relacionar les intensitats de la tinció de les cèl·lules (en estat de nucleoid després de la lisi, però sense fer electroforesi) en cada interval de temps, amb la quantitat de DNA al nucli, i comparar amb els paràmetres del comet test, per intentar trobar si hi ha una relació entre els valors més elevats d'aquests en els intervals que es consideren que hauria d'haver més creixement cel·lular i les intensitats més elevades, en el cas que es donés aquesta possibilitat.

---

3.1.3.1.b. Material i Mètodes:

- Es van fer créixer els cultius per sembrar diverses plaques.
- Es manteniren els cultius en medi pobre amb sèrum a l'1% durant tres dies, per permetre que totes les cèl·lules poguessin estar més o menys en el mateix estat de creixement i llavors canviar a un medi (MEM) enriquit amb un 10% de sèrum perquè comencessin el creixement. Es van treure a les diferents hores: 0h (control); 17 i 24 h.
- Es va dur a terme el comet test seguint el mateix protocol que està explicat en l'apartat anterior (3.1.2.b) pel que fa al procediment de la tècnica, no a la preparació de les mostres, ja que aquí al ser un cultiu cel·lular podem disposar molt fàcilment de la suspensió cel·lular i no cal fer tots els passos indicats per al teixit. Molt breument: realització de dues capes d'agarosa sobre portaobjectes prèviament preparats amb una capa d'agarosa assecada a l'estufa que en facilita l'adhesió. La suspensió cel·lular, s'obté per tripsinització, i suspensió en 100µl de PBS i sèrum en cada placa per aconseguir la dilució adequada pel comet test; de la que es treu una mostra de 35µl per a barrejar amb l'agarosa LMP i fer la segona capa.
- A partir d'aquí, tot el procés és el mateix que en l'apartat anterior d'aquest capítol (pel que fa a les plaques on es realitza el comet test complet, ja que en les altres plaques es mantenen les mostres en tampó de neutralització fins a les lectures, després d'estar una hora en líquid de lisi), exceptuant el sistema d'anàlisi d'imatges que es va utilitzar un sistema més nou aquest cop, el Programa: *Damage Analysis Lucia 4.51 Modul Comet Assay. Laboratory Imaging, Prague.*
- Es van comptar 25 cèl·lules per porta.

3.1.3.1.c. Resultats:

**Taula 3.1.9.** Són els valors de les mitjanes obtingudes per el SCGE en cèl·lules HEL:

Temps en medi ric (h.)	% Head	% Tail	Integral Intensity	Tail Length	Tail Moment	Olive Moment
0	81.47	18.52	208.08	121.40	46.80	29.12
17	90.84	9.16	261.27	81.02	11.31	5.42
24	81.11	18.88	356.36	91.72	27.04	16.62

**Taula 3.1.10.** Comparació dels paràmetres escollits per a l'avaluació de l'experiment, resultat del SCGE amb electroforesi (comptatge amb anàlisi d'imatges i visual), i resultats del SCGE sense electroforesi.

Temps en medi ric	IC	% Tail	Tail Moment	Intensitat (Si electroforesi)	Intensitat (No electroforesi)
0	18.12	18.52	48.80	208.08	152.55
17	11.32	9.16	21.51	261.27	117.18
24	15.75	18.88	44.62	356.36	269.00

IC: *Comet Index*, comptatge visual;



Paràmetres comptatge per anàlisi d'imatges: % *Tail*: percentatge de DNA a la cua; *Tail Moment* (TM: producte de la longitud de la cua (*tail length*), i la quantitat de DNA a la cua); Intensitats obtingudes per al comet realitzat amb i sense electroforesi.

La interpretació d'aquesta taula és una mica complicada, segurament els intervals escollits van ser massa espaiats, i potser ens haguera interessat més els intervals entre les 0 i 17 hores, on realment es déu donar el creixement i haguéssim pogut trobar diferències. Ja que és possible que en els intervals de 17 i 24 hores hi hagi l'estabilització de la població cel·lular i a les 24 hagi començat a haver morts cel·lulars en més quantitat, això últim podria explicar els valors d' IC, %*Tail* i TM més elevats que a les 17 hores, però llavors no s'explicaria amb els valors per a les intensitats, que també augmenten a les 24h. respecte a les 17h., i no indicaria segons la nostra suposició que hi ha mort cel·lular, sinó que hi ha més quantitat de DNA. Es podria explicar per una banda en que sí hi ha el creixement, i detectem amb les intensitats (sense electrof.) més quantitat de DNA, que faria també augmentar els valors dels paràmetres per al SCGE, o hi ha mort cel·lular, però no té res a veure la intensitat amb la quantitat de DNA de la manera que havíem pensat (en les mostres sense electroforesi). Si mirem les intensitats (sense electroforesi) del control, respecte les altres hores, és difícil explicar-ho segons el que havíem suposat, i és difícil relacionar-ho amb els paràmetres de mesura del Comet test. Tot plegat resulta una mica confús i potser no va ser el millor sistema per avaluar el que preteníem.

Si es compara amb una recta de regressió lineal la lectura visual i la lectura feta amb el sistema d'anàlisi d'imatges (Lucia 4.51), s'obtenen les correlacions pels dos valors de comparació més utilitzats, com són la quantitat de DNA a la cua (%*Tail*) i el *Tail Moment*, de:

Correlació IC/ %*Tail*:  $r = 0.927$ ;  $SD = 2.19$  ;  $p = 0.244$

Correlació IC / *Tail Moment*:  $r = 0.96$ ;  $SD = 5.3$  ;  $p = 0.17$

En els dos casos la correlació és molt bona. (Cal indicar, però, que el comptatge visual es va fer a partir de les imatges obtingudes per l'ordinador al mateix temps que aquest en feia les mesures dels paràmetres, i no a partir de les imatges visualitzades directament del microscopi en una repetició en paral·lel de les mesures de les mostres. I que els comptatges es van realitzar amb l'objectiu de 20x , a diferència del que utilitzo normalment al meu laboratori, el de 40x, que resulta millor pel comptatge visual). Però tot i així, la comparació és molt bona. Com s'ha comentat diverses vegades, en treballs realitzats per altres autors com Collins et al.(1997b), van mirar la correlació entre els dos sistemes de comptatge , veient que la correlació és molt bona també.

#### 3.1.3.1.d.Discussió:

Aquest va ser un primer experiment prova, no es pot tenir del tot en compte, primer perquè va ser tan sols un primer assaig i també perquè hagués calgut fer més intervals de temps i tenir una mesura de la divisió cel·lular per alguna altra mesura ben coneguda i establerta per a aquest tipus d'anàlisi (com la citometria de flux), per poder comparar amb els resultats del comet test d'una manera més adequada, encertada, i treure'n conclusions més fiables. Es va creure a més que hi va haver un problema amb les plaques controls (temps 0), es va observar una mortalitat elevada i

això explicaria que els valors de mesura de dany al DNA com el %DNA a la cua, TM i IC tenen valors alts perquè possiblement hi ha moltes cèl·lules en estat moribund, hagués calgut potser, canviar el medi un dia abans; és habitual també, trobar algun problema en alguna placa, possibles contaminacions, etc...

Aquest fet, però, pot tenir dos tipus d'interpretacions; els valors de comet són més elevats en els dos tipus de comptatges, visual (IC) i per anàlisi d'imatges informatitzat (els paràmetres de %Tail i Tail Moment) en el temps zero que a les 17 i 24 hores. Representaria que els valors haurien de ser majors en aquests últims intervals si és que hi ha més cèl·lules en estat de divisió segons la nostra hipòtesi, o en altre cas, si hi ha hagut ja més mortalitat cel·lular que es pogués detectar com a fragments de DNA pel comet test. O per altra banda és també possible que vertaderament hi hagués més divisió cel·lular en el temps zero que en els altres dos intervals degut a que el creixement ja hauria arribat al seu màxim i en aquests períodes podria estar en regressió essent el valor inferior al temps zero, valor basal, on es podria veure llavors clarament que hagués calgut fer més intervals intermedis entre aquests, per això es va voler repetir l'experiment en una segona prova. Tot i que segurament, totes les possibilitats comentades actuen alhora. Realment va haver un problema amb els controls (es va poder confirmar amb els resultats del segon experiment on els valors eren inferiors per aquests), com també es va veure que els intervals de 17 i 24 hores serien intervals de temps massa llunyans per observar el pic del creixement de les cèl·lules, el pic de creixement estaria en intervals inferiors a aquestes hores, cap a les 12 h. i no tant tard, a partir d'aquí hauria començat l'estabilització i la davallada, i augmentaria la mortalitat de les cèl·lules, que també podria interferir d'alguna manera en els valors obtinguts per l'assaig del cometa. Podria ser que els valors de les 17 hores fossin menors al de les 0h, perquè hi ha hagut estabilització de la població, i a les 24 hores més elevat degut, no a la major quantitat de divisions cel·lulars sinó a la mortalitat cel·lular, que com ja s'ha explicat en la introducció del capítol 3, podria també, d'alguna manera, influenciar en els resultats del Comet test.

Si comparem els valors obtinguts pel Comet Test i les intensitats dels nuclis on no s'ha dut a terme l'electroforesi, es podria veure una correlació (taula 3.1.10). Segons la nostra suposició, encara que les intensitats puguin variar de mostra a mostra degut a la tinció i a la preparació d'aquesta, i ser per tant les lectures de les intensitats diferents, aquí parlem del valor mig entre 50 cèl·lules per interval; hi hauria d'haver una intensitat més elevada en els intervals on hi hagués més divisió cel·lular perquè hi hauria més DNA i per tant augmentaria la intensitat. Obtenim uns valors superiors al control que a les 17 hores, igualment com pels resultats del comet, ens indicaria un augment de la quantitat de DNA al nucli, hi hauria llavors, més divisió cel·lular en el control que a les 17 hores; els valors d'aquests dos intervals són d'intensitat inferior al de les 24 hores, i ens indicaria en aquest cas, que hi hauria la major divisió a les 24 hores, cosa que no es correlacionaria amb els valors obtinguts per al Comet test, on és inferior per a les 24 h que per a les 0h (pels paràmetres d'IC, i TM, però no amb % Tail; tot i que es poden considerar els valors a les zero hores i a les 24 molt similars). Això ens indicaria doncs no una correlació perfecte amb la divisió cel·lular, i un cop més ens confirmaria els problemes d'una possible mortalitat en els valors control (0h.). Però cal dir que tot això són especulacions, el valor d'intensitat no es considera un valor de mesura fiable per a l'avaluació de la divisió cel·lular, i depèn molt de la mesura feta pel sistema informàtic, la tinció i preparació de la mostra, caldria comparar-ho amb valors obtinguts per una altra tècnica més fiable.

Com ja s'ha comentat anteriorment, hi ha la possibilitat que el comet pugui detectar o visualitzar d'alguna manera les imatges necròtiques o apoptòtiques. Aquesta podria ser una explicació pel valor tan elevat d'aquests paràmetres per al SCGE. Però en canvi, no tindrien gaire relació amb la intensitat mesurada en les cèl·lules sense electroforesi. No es correspondria dir que sí hi ha més mort cel·lular al haver aquests valors més elevats del SCGE quan la intensitat, (que havíem considerat que ens donaria la quantitat de DNA), també té valors alts, això és contradictori. I, en cas que fos cert el que hem suposat que ens mostraria la intensitat, hauríem de dir que els valors alts de SCGE serien deguts, més probablement, a la divisió cel·lular que no a la mort cel·lular, cosa que no queda gens clara. S'hauria d'haver comprovat amb una altra tècnica que mesurés la divisió cel·lular, i no intentar utilitzar aquests paràmetres. De tota manera, es va voler repetir l'experiment.

#### 3.1.3.1.e.Conclusions:

1. Aquest experiment no ha estat vàlid per a l'observació d'una possible correlació entre la divisió cel·lular i la quantitat de formes de cometa. Caldria repetir-lo i comparar amb altres tècniques com la citometria de flux, que avaluarà aquests estadis.
2. La correlació entre els comptatges mitjançant un sistema visual i arbitrari, i un sistema informatitzat d'anàlisi d'imatges és molt bona.

#### 3.1.3.2. Segon Experiment:

##### 3.1.3.2.a.Introducció:

Es va voler repetir l'experiment amb la utilització del mateix tipus cel·lular, però aquest cop es treuen les mostres d'un major nombre d'interval per a la millor comparació amb la corba de creixement d'aquest tipus cel·lular. Es pretenia observar si hi havia alguna diferència entre els valors del comet durant els diferents intervals de temps, que es poguessin relacionar amb l'augment o disminució de divisió cel·lular.

##### 3.1.3.2.b.Material i Mètodes:

En aquest experiment també es fan dues plaques per interval, i se'n treuen quatre portaobjectes, en dos es farà tot el protocol del comet amb l'electroforesi i en els altres dos no es farà l'electroforesi i es mantindran, a diferència del primer experiment, en líquid de lisi i no en tampó de neutralització fins a les lectures, que es van realitzar poques hores més tard. Es comparen també les intensitats.

El procés és el mateix de l'experiment anterior. Però es van fer més intervals: a les 0,3,6,9,12,15,18,21,24 hores.

I aquest cop es compten també 25 cèl·lules per portaobjectes, es fan dos portaobjectes per placa i dues plaques per interval.

---

3.1.3.2.c.Resultats:

**Taula 3.1.11.** Valors de les mitjanes dels paràmetres de mesura per al SCGE en HEL:

Intervals	% Head	% Tail	I.Intensity	Tail Lengh	Tail Moment	Olive Moment
0	97.19	2.80	199.19	15.14	4.74	3.25
3	98.77	1.22	229.72	11.38	0.44	0.38
6	99.23	0.76	197.31	9.85	0.62	0.29
9	90.47	9.52	176.22	33.60	18.48	13.57
12	93.96	6.04	203.25	29.51	10.19	7.01
15	92.10	7.89	189.47	28.39	11.92	8.79
18	86.91	13.09	165.51	40.05	19.93	13.85
21	88.25	11.75	183.05	45.64	17.68	11.77
24	91.53	8.46	182.92	31.70	13.31	9.37

**Taula 3.1.12.** Mitjana dels valors d'intensitat de les mostres sense electroforesi, dels resultats del comptatge visual de les mostres del SCGE i d'alguns paràmetres del comptatge pel sistema d'anàlisi d'imatges. Comparació:

Intervals	IC	% Tail	Tail Moment	Intensitat (No electroforesi)
0	5.75	2.80	4.74	351.42
3	3.25	1.22	0.44	336.24
6	3.00	0.76	0.62	340.57
9	13.00	9.52	18.48	156.13
12	11.25	6.04	10.19	253.90
15	12.00	7.89	11.92	335.48
18	20.00	13.09	19.93	325.02
21	21.00	11.75	17.68	294.83
24	12.75	8.46	13.31	348.84

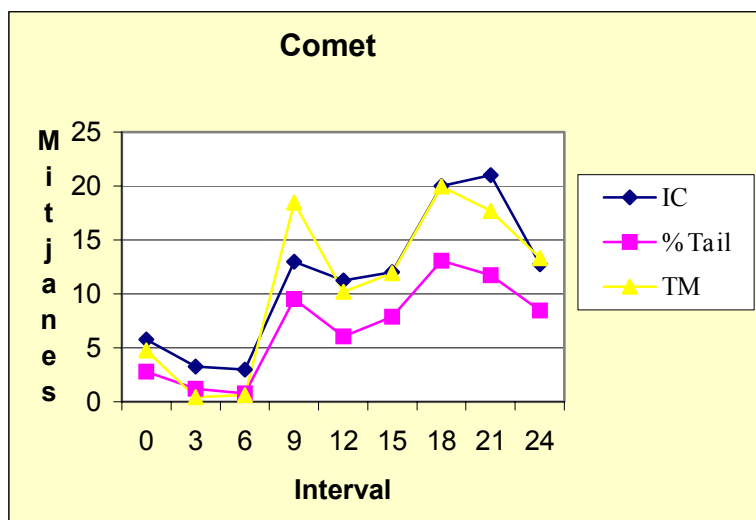
Es pot observar un augment dels valors de %Tail, Tail Moment (TM) i IC de les 9 hores fins a les 21. En quan a les intensitats es una mica confús, i sembla no ser gaire bona mesura pel que vam considerar que ens mostraria, la quantitat de DNA al nucli, en el cas del SCGE sense electroforesi.

Comparació valors de lectures amb el sistema visual (IC) i alguns dels paràmetres de mesura del sistema de comptatge informàtic:

Si es fa una recta de regressió lineal entre els valors d'IC (comptatge visual) i el percentatge de DNA a la cua (% Tail), s'obté un coeficient de correlació ( $r=0.95$ ;  $SD=0.98$ ; i una  $p<0.0001$ ).

I al comparar IC amb el Tail Moment : ( $r = 0.88$ ;  $SD=2.74$ ,  $p<0.0002$ ).

**Fig.3.1.5.** Comparació dels comptatges: Visual (en IC) i per anàlisi d'imatges (en TM i %DNA Tail):



Un cop més aconseguim una correlació bastant bona, però com he comentat abans, no es van fer les mesures visual i amb ordinador en diferents ocasions, sinó que es va fer al mateix moment i de les mateixes imatges de les cèl·lules vistes per la pantalla de l'ordinador i no directament pel microscopi, que és com s'haguessin hagut de fer els comptatges visualment (*by eye*), en una repetició d'aquests a 400x.

### 3.1.3.2.d. Discussió:

Per a les mostres en que no s'ha dut a terme l'electroforesi, aquestes s'han sotmès a una lisi alcalina (com en les mostres on sí s'ha fet l'electroforesi, prèviament a aquesta), en la que degut als detergents i l'alt contingut de sals es trenquen les membranes i la majoria de proteïnes cel·lulars, quedant una estructura de nucleoids, on el DNA està en forma de *loops* molt fortament super-enrotllats dins el nucli residual, (Mckelvey-Martin et al.1993; Dušinská & Collins 1996; Olive, 1999; Collins 2000), però no hi ha una migració del DNA. Es va pensar doncs que el valor d'intensitat mesurat en aquestes cèl·lules ens indicaria quan hi ha més DNA al nucli perquè augmentaria amb la síntesis de DNA durant en la divisió cel·lular. Però, aquesta mesura no ha quedat gaire clara en aquests dos experiments i també pot variar segons la tinció, (si ha quedat més o menys tenyida la mostra perquè hagin quedat millor o pitjor les capes, o estiguin més netes o no, etc... comptant també les variacions que hi pugui haver en el comptatge pel sistema informàtic degut a tot això). Llavors fa que aquesta possibilitat d'establir una corba de

creixement a partir d'aquestes intensitats dels nuclis que no han sofert electroforesis no sigui gaire vàlida, ni massa fiable en aquests dos experiments, tal i com demostren també la variació de resultats i el fet de no trobar-hi alguna correlació, ni semblança tampoc entre els dos experiments, tot i que al principi es va pensar que sí que aniria bé, com a indicatiu de la quantitat de DNA indirectament, que es relacionaria amb la divisió cel·lular, en alternativa a la mesura per citometria de flux, que no es va poder dur a terme tal com s'havia planejat, i amb la que es volia poder establir relacions amb els resultats del comet test.

Tant si observem els valors d'IC, com de % *Tail DNA*, o el TM (taula 3.1.11, 3.1.12 i Fig.3.1.5), es pot veure valors similars, i baixos, en les hores 0,3,6, i un augment en les 9 hores que va més o menys incrementant fins a estabilitzar-se cap a les 21 hores, llavors comença la baixada. Es necessitaria fer una comparació amb la corba de creixement d'aquest tipus cel·lular feta per exemple per citometria de flux per correlacionar aquesta possible variació dels valors del comet (que en principi semblaria que segueixen l'evolució normal d'una corba de creixement) amb l'estat de divisió de les cèl·lules. Ja que per les intensitats de les mostres que no han passat una electroforesi no es pot veure d'una manera clara l'estat de divisió cel·lular en aquest cas; segons el que havíem pensat, aquesta intensitat ens podria indicar la quantitat de DNA a la zona del cap del cometa, essent major en més quantitat de DNA que seria degut a la divisió; en aquest cas, però, ens mostraria una mica el contrari al que esperaríem de l'evolució d'un creixement cel·lular (un augment elevat de la divisió cel·lular en un determinat interval de temps, una estabilització i petita una disminució), aquí veiem que es va mantenint un valor més o menys similar i elevat fins a les 6 hores, llavors disminueix a les 9 hores i torna a augmentar fins a les 15 i mantenir-se més o menys, amb una petita disminució a les 21 hores, més que una variació en el temps, semblaria un valor més o menys constant en que ha tingut algun problema en els intervals de les 9 i 15 hores que fa baixar la intensitat, d'aquesta manera podríem pensar que no serveix aquest sistema de mesura per mostrar l'estat cel·lular, o que realment no es correlaciona, no afecta als resultats per al comet. Així doncs no considero que sigui un bon sistema d'avaluació dels estats de creixement, la intensitat en les cèl·lules on no s'ha dut a terme l'electroforesi, i per tant no podem establir-ne una corba de creixement a partir d'ella. Hauria calgut un altre sistema per a mesurar l'estadi del cicle cel·lular, com ja he comentat abans, hagués anat molt bé, la citometria de flux.

Així, com ja he comentat també, pels resultats del comet test, es podria intuir aquesta corba de creixement, tot i que caldria comprovar-ho (pels valors del comet, es pot veure, si és que està afectat, tant per la divisió cel·lular com per la mortalitat, que el cicle cel·lular es podria interpretar com: un creixement entre les 6 i 9 hores, una estabilització entre les 12 i 18 hores i a partir de les 18 hores un augment d'estadis de mortalitat cel·lular que es notaria amb un altre augment del comet, interpretat aquest cop com a possible mortalitat i no com a divisió cel·lular per la corba normal de creixement de les cèl·lules (on en aquest punt, un cop arribat estabilitzat el creixement, hi hauria una disminució), amb una nova disminució entre les 21 i 24 hores degut a una mortalitat cel·lular, que ja no es detectaria amb el comet test degut a la gran fragmentació dels nuclis que faria que els petits fragments es perdessin en l'electroforesi i no es veiessin. Tot això pot ser una especulació sobre els resultats obtinguts, que es podrien interpretar com la corba de creixement cel·lular.

## 3.1.3.2.e. Conclusions:

1. Un cop més no es pot establir una correlació entre els valors de les intensitats de fluorescència de les cèl·lules sense dur a terme l'electroforesi i els valors dels comets.
2. No es considera un bon sistema de mesura per als estadis cel·lulars la mesura de la intensitat.
3. Hauria calgut un sistema d'avaluació de l'estat de la fase cel·lular, per una tècnica adequada, d'aquesta manera poder comparar amb el comet test i intentar establir alguna relació, si és que hi és.
4. Hi ha correlació entre els comptatges del comet test pel sistema visual i el d'anàlisi d'imatges.

**3.1.3.b Discussió dels dos experiments:**

En la comparació dels dos experiments, pels resultats de les intensitats i dels paràmetres que mesuren els comets. Si descartem el valor zero del primer experiment, podem veure pels altres dos intervals que es correspondrien aproximadament amb els resultats dels intervals del segon experiment (taules 3.1.9, 3.1.10, 3.1.11, 3.1.12). Cal tenir en compte però, que hi va haver algun problema en els cultius del primer experiment.

En els dos experiments es pot veure la bona correlació entre els valors dels diferents tipus de comptatge (visual i mitjançant un sistema informatitzat d'anàlisi d'imatges). Com també, en els dos casos semblaria que el valor de les intensitats de les cèl·lules on no s'ha realitzat l'electroforesi no servirien per perfilar una corba de creixement o una relació amb la major quantitat de DNA degut a la divisió cel·lular. De tal manera tampoc s'ha trobat una correlació entre aquests valors i els obtinguts per el comet test. Però en els dos experiments, tenint en compte que en el primer va haver un problema amb els controls, semblaria com si seguissin una mena de possible corba de creixement que caldria comprovar si coincideix realment els valors més elevats amb l'augment de divisió cel·lular obtinguts per una altra tècnica de mesura de l'estat de divisió com podria ser la citometria de flux.

En aquest cas haguera sigut interessant fer els histogrames per a les intensitats de les cèl·lules per poder establir categories i amb un altre sistema de mesura comptar la quantitat de cèl·lules en cada fase, i comparar realment si ens indicaria l'estat cel·lular. Una altra possibilitat haguera estat establir una relació similar al que van fer Olive & Banáth (1993) amb les mesures que donava el comet test, (a partir del TM per exemple), i l'estadi cel·lular. Ja que, pels resultats d'aquests experiments, no es va considerar un sistema adequat ni bo de mesura de la quantitat de DNA a partir de les intensitats de les mostres en que no s'ha dut a terme l'electroforesi.

---

### 3.1.3.c. Conclusions:

1. Amb aquestes proves no es pot concloure que la comparació amb la intensitat (en mostres que no s'ha dut a terme l'electroforesi) sigui vàlida per veure la possible correlació de la divisió cel·lular amb els valors de mesura del comet, ja que la mesura d'aquest paràmetre d'intensitat no està molt clara en aquests experiments, i podria dependre en part, de factors no relacionats amb la quantitat de DNA sinó del sistema de lectura i la preparació de les mostres. Llavors sembla que no és el paràmetre adequat per mesurar la quantitat de DNA al nucli ("cap" del cometa) en relació amb l'augment de divisió cel·lular.
2. Però, es pot observar amb els paràmetres de mesura del comet test, en aquest cas amb l'observació concreta del %DNA a la cua, *Tail Moment* i índex de dany (IC), en els diferents intervals, el que es podria assimilar a una corba de creixement cel·lular, caldria però una comparació amb una corba de creixement ben establerta pels mètodes més correntment utilitzats, i adequats, per a veure els diferents estats de creixement d'una línia cel·lular.
3. Així pot semblar doncs, que d'alguna manera hi ha influència de l'estadi cel·lular amb els resultats del comet test, però, no és una conclusió suficientment sòlida a partir d'aquests experiments.
4. Es pot veure una bona correlació entre els dos sistemes de comptatge del Comet test, el visual, i l'utilitzat amb el sistema d'anàlisi d'imatges.

### 3.1.4. Divisió cel·lular: Lumbrícids

#### 3.1.4.a. Introducció:

Durant la realització de proves amb cucs, per a la valoració de l'efecte de la possible contaminació del medi ambient en aquests organismes, (capítols 1 i 2), es va detectar que l'estat del cuc podia influir en els resultats del comet. Concretament en el cas en que hi hagués un creixement ràpid d'aquests. Es va associar doncs, amb la possible interferència que causaria el fet d'una intensa activitat de proliferació cel·lular, ja comentada en els apartats anteriors com també per altres autors.

Seguint la línia d'aquest capítol, es pretenia investigar una mica més, el fet que la divisió cel·lular pugui influir en els resultats del comet test, fent-los variar una mica, o havent de tenir cura en la seva interpretació.

Si continuem amb la sèrie d'experiments anteriors, en que s'han realitzat diversos assajos en cultius cel·lulars, i algun a partir de mostres de teixit, es volia fer una altra prova *in vivo* sobre aquesta possible interferència.

---



Els lumbrícid són capaços de sofrir un creixement molt ràpid en poc temps, si es troben en condicions favorables (una quantitat de matèria orgànica, humitat i temperatura adequades, entre d'altres paràmetres). En el cas dels lumbrícid s que tenia al laboratori, alimentats un cop per setmana amb farines de cereals per a infants (Eyambe, 1991), passaven a tenir un creixement ràpid si venien d'un sòl més pobre, així com si se'ls posava en una mostra de terra molt favorable, més rica en nutrients del que provenien. En un futur, es podria aprofitar aquest moment de creixement més intens per a fer la prova del SCGE i veure si els valors de comet basals, eren més elevats que en els cas de cucs en creixement més estable, no tan accentuat. En aquest cas, però, es va voler aprofitar la capacitat de regeneració d'*Allolobophora caliginosa* (capacitat que es va fer evident quan va haver algun accident i es van partir o ferir, o quan degut a un estrès, si se'ls tocava deixaven anar la part posterior, es partien, i llavors eren capaços de tornar-la a regenerar), per a la comprovació de si la taxa de creixement cel·lular més elevada (s'ha vist una activitat mitòtica en els amebòcits durant la regeneració d'un teixit i durant la defensa de l'organisme, Parry 1976), podia augmentar els valors de comet. Diverses espècies de cucs de terra tenen la capacitat de regenerar-se (és coneguda la capacitat partenogenètica i regeneradora d'algunes espècies de cucs de terra; Edwards & Bohlem, 1996), capacitat que varia segons les diferents espècies. Són capaços de regenerar les parts anteriors i les posteriors, fins a cert punt, i la velocitat en què ho fan pot variar segons les condicions de l'animal, l'edat, les espècies i la temperatura, (Edwards & Bohlem, 1996).

Per dur a terme aquest experiment es van escollir 10 exemplars aproximadament de la mateixa mida, que no haguessin entrat en època de reproducció, i en bones condicions (es reflexa en el seu aspecte). Encara que el sistema pot semblar molt agressiu, i de fet ho és, es va aplicar una amputació de la quarta part final del cos, i les dues parts es van guardar per a esperar la seva regeneració; la part més petita, tot i la seva mida, és a vegades capaç de regenerar el cuc sencer, segons els casos i situacions. La regeneració implicaria una taxa de divisió cel·lular elevada, i aquest moment és el que ens interessaria. La regeneració començaria al cap d'uns dies i es va pensar en esperar també un cert temps per evitar detectar l'estrès causat pel tall.

Es van dur a terme dos experiments, que es diferenciaven segons el temps transcorregut després de l'amputació:

- 3.1.4.1. Primer Experiment.

- 3.1.4.2. Segon Experiment.

#### 3.1.4.1. Primer Experiment:

##### 3.1.4.1.a. Introducció:

Consisteix en una primera prova per realitzar el SCGE en el moment que es creu que hi pugui haver una regeneració activa sense influències d'un possible estrès causat per la lesió. Comparar els resultats dels cucs tallats, mesurats amb l'índex IC, amb els controls, esperant que fos major en el cas dels cucs amputats degut a la taxa de divisió elevada d'aquests

---

respecte els controls, que ens podria fer pensar en la influència de la divisió en els resultats del test del cometa.

#### 3.1.4.1.b. Material i Mètodes:

- Es van posar durant quinze dies 10 *Allolobophora caliginosa* (sense haver entrat en fase reproductora) en un preparat de terra estàndard 1 (STD1:barreja de terra argilosa amb escorça de pi fermentada, relació 3:2 respectivament) per habitar-se a aquest tipus de terra. (Eyambe 1991, els tenia 2 setmanes en aclimatació, mentre que altres autors com Diògene et al.1997 els tenen durant un mes).  
(No es van utilitzar cucs que en anteriors experiments s'havien autotomitzat, es partien ells mateixos tan sols en un petit contacte quan se'ls volia fer el massatge per a expulsar el contingut del tub digestiu. Perquè haguera pogut introduir un altre paràmetre d'estrès o de mala salut dels individus. Així que es van escollir cucs sencers amb bon aspecte i que no haguessin estat partits anteriorment, tant per als controls com per a els que amputaríem).
- Es va tallar una quarta part final del cos de l'animal, i es van mantenir durant un mes en la terra estàndard preparada. Es va dur a terme el comet test per a veure la possibilitat d'una divisió accentuada degut a la regeneració de les parts tallades.
- Per a la realització del Comet test, es va fer servir el mateix protocol que l'explicat en l'apartat 1.2.b del capítol 1).
- Pel sistema de comptatge, es va fer servir el sistema visual, igualment com està explicat en els capítols 1 i 2, avaluant un nombre de 100 cèl·lules per individu i calculant l'IC, fent una mitjana per tots els individus de cada mostra (els amputats i els que no).

#### 3.1.4.1.c. Resultats:

**Taula 3.1.13:** Comet test: valors d'IC de la mitjana de tots els individus de cada mostra:

<i>A.caliginosa</i>	IC $\pm$ SD	n
Tallats 1 mes	47.20 $\pm$ 7.20	8
Sencers	32.94 $\pm$ 8.03	9

n: nº individus

IC: Comet Index.

SD: desviació estàndard

Es pot veure un augment del valor del comet (IC) en els cucs tallats, que podria interpretar-se com una elevada activitat de divisió deguda a la regeneració.

Al fer una comparació amb el test de la t-student s'obté que la diferència és molt significativa. Amb un valor de  $P = 0.0016$ .

## 3.1.4.1.d.Discussió:

Amb l'observació de l'aspecte dels lumbrícid es podia veure que: Amb tan sols dos dies ja no es veia quasi la lesió en els cucs, suposo que perquè va ser una amputació d'una part molt petita, i la posterior, que sol ser menys traumàtica i no tan costosa de regenerar. Al cap d'un mes ja no es veia gens la lesió, i les parts tallades (els petits trossos posteriors) havien començat la regeneració. Potser vaig esperar massa temps a fer el comet test en els cucs. Tot i així es pot veure un valor més elevat d'IC (índex de comet) en els que vam tallar. El sistema de quantificació de la tècnica del SCGE, l'IC, que seria o es podria interpretar com un índex de dany, en aquest cas no es trobaria del tot correcte anomenar-lo així si és que vertaderament està detectant la divisió i no el dany.

Malgrat que en l'observació visual es veia un aspecte ja regenerat dels cucs, es va fer la prova també de les parts que encara estaven aparentment en regeneració, les parts més petites, les parts posteriors amputades, que triguen més a regenerar ja que han de refer tot el cuc sencer, (cosa que a vegades és possible segons l'espècie i segons la quantitat que s'hagi tallat, si queda teixit nerviós, etc...), s'han sumat els valors d'aquests amb els dels cucs ja sencers després del tall i sense aspecte de regeneració, i se n'ha fet la mitjana que és la que surt a la taula 3.1.13. Si és correcte que una taxa elevada de divisió cel·lular fa augmentar el valor (IC) del comet, això podria explicar aquest IC més elevat trobat en les mostres de cucs tallats respecte els cucs sencers mai tallats (controls). Es pot dir que en la comparació dels valors per individu, es va observar valors més elevats de comet en les mostres on es va posar les parts posteriors de cuc regenerant-se que els que es va posar el cuc sencer que havia regenerat la part posterior que se li havia tallat (valors no mostrats a la taula 3.1.13), i això es podria interpretar com que aquestes parts posteriors s'estaven regenerant (o de manera més activa) i donarien valors més elevats, que ajudarien a augmentar la mitjana d'IC respecte els sencers (control). Tot i que també podria ser que indiquessin un valor de dany per un estat crític de l'individu (al ser una part tallada).

Així caldria fer una prova per veure realment si estan en una més elevada taxa de divisió els cucs que han estat amputats respecte els cucs controls, que serien els cucs sencers. No sols per saber si després d'un mes encara hi ha elevada activitat de divisió, sinó també per saber, si en cas que no fos així, si podríem descartar altres factors, com l'estrès o el trauma provocat per tal acció, i les cèl·lules estiguessin danyades.

Per ser una primera prova els resultats semblaven prou interessants per a fer una altra prova amb intervals de temps intermedis.

## 3.1.4.1.e. Conclusions:

1. S'ha vist una diferència significativa entre els valors de comet dels cucs tallats i els sencers (controls), essent més elevat en els primers. Es pot interpretar com que aquests sofreixen una regeneració i per tant tenen una taxa més elevada de divisió cel·lular, segons la nostra hipòtesi, i aquesta influiria en els valors de mesura del comet test.  
Tot i així caldria fer més proves per assegurar-se realment d'aquesta relació o interferència per part de la divisió cel·lular en els resultats del SCGE.
2. Seria necessari realitzar més proves per veure si realment aquests cucs tallats estan en regeneració activa i tenen una taxa de divisió més alta que els controls.

3.1.4.2. Segon Experiment:

## 3.1.4.2.a. Introducció:

Degut a l'observació visual de la lesió en el primer experiment, on semblava que al cap d'un mes molts dels cucs no estiguessin en regeneració ja que aquesta no era evident visualment, tot i que caldria comprovar-ho d'una manera que no sigui per la sola observació sinó amb tècniques per mesurar si hi ha una elevada divisió cel·lular, es va voler repetir l'experiment en un interval més curt de temps, com seria de 5 i 10 dies, per aconseguir que comencessin ja el procés de divisió activament.

Quan hi ha regeneració de la part amputada, es pot observar visualment com evoluciona la lesió. Van augmentant els anells del cuc, fins aconseguir els mateixos que tenia (quan l'amputació no és exagerada, com en aquest cas), però la part nova té un gruix i color diferents, més prim i clar, i poc a poc recupera la mida i el color normals, fins a no ser reconeguda la part nova. (Edwards & Bohlem, 1996).

## 3.1.4.2.b. Material i Mètodes:

- Es va repetir l'experiment, en *Allolobophora caliginosa*, de la mateixa mida i amb aspecte bo i saludable, tant per als controls com per als que tallàrem.
  - Es van deixar els mateixos dies per a l'habitució en la terra estàndard preparada que en l'experiment anterior. Però, en aquest cas no es va utilitzar la mateixa terra estàndard del primer experiment, la barreja va consistir en terra argilosa i escorça de suro fermentada, en substitució i, en la mateixa proporció que l'escorça de pi que es va utilitzar en el primer experiment, (relació 3:2, terra argilosa: escorça de suro; es va anomenar terra STD2; terra estàndard 2).
  - Es va tallar la quarta part posterior del cos de l'animal en 9 cucs.
  - Comet test en aquests cucs tallats al cap de 5 i 10 dies; i en cucs control, seguint el mateix protocol, sistema de mesura i comptatge que en l'experiment anterior, explicats en l'apartat (3.1.4.1.b).
-

3.1.4.2.c.Resultats i Discussió:

**Taula 3.1.14:** Resultat del *Comet Assay*: Valors de la mitjana d' IC :

<i>A.caliginosa</i>	IC ± SD	n
Tallats 5-10d.	53.83 ± 11.21	9
Sencers STD2	41.31 ± 9.00	8

IC: Comet Index; SD: desviació estàndard; n: n° d'individus.

Tot i els valors molt alts d'aquest control (comparats amb els obtinguts en el primer experiment), es pot veure més elevat el valor dels cucs tallats, essent també estadísticament significatiu amb un valor de t-student de 2.516 i una P=0.0234.

Es pot observar, però, una tendència diferent de valors si separem les mostres de cucs que se'ls ha realitzat el comet test tan sols cinc dies després de l'amputació, dels que se'ls ha realitzat als 10 dies d'haver-los tallat, essent més elevat en els primers que als segons, resultats que es mostren en la taula següent:

**Taula 3.1.15:** Resultats del SCGE en cucs regenerats durant 5 i 10 dies:

Mostra	IC	Mitjana IC ± SD	Temps Regeneració
A1	62.75	63.19 ± 1.12	5 dies
A2	64.00		
A3	65.00		
A4	46.25	48.79 ± 10.44	10 dies
A5	44.50		
A6	48.25		
A7	33.50		
A8	56.25		
A9*	64.00		

(\*són les parts posteriors de varis individus).

El que anomeno com a temps de regeneració a la taula, correspondria al temps en que s'ha dut a terme el comet test després de tallar els cucs, seria millor expressar-ho d'aquesta manera, ja que no es pot assegurar que comenci de seguida aquesta activitat regenerativa.

Es pot veure uns valors significativament més elevats (considerats estadísticament significatius amb el test de la t-student, t=2.41; P=0.046) en els que suposadament haurien començat una regeneració més activa, als cinc dies de l'amputació de la quarta part posterior del cos, respecte els que han estat 10 dies en regeneració activa, segurament perquè tot i que la divisió cel·lular ha de ser alta, es deuria frenar ja una mica ja que es regeneren relativament

ràpid al haver amputat tan sols una part tan petita del cos, o es podria pensar en una aturada, potser momentània de l'elevada activitat de divisió. Cal posar atenció en el valor de la mostra A9 en la que són dues parts posteriors de dos cucs tallats, a la que per diferenciar en el gràfic dels valors dels cucs tallats en que els falta només la quarta part posterior hi ha el símbol (\*). Aquest valor és elevat i similar als de les mostres A1, A2, A3 (corresponents als 5 dies després del tall), per tant es podria interpretar com que als 10 dies, aquestes parts posteriors tenen una regeneració molt activa (segurament a l'esforç que comporta l'haver de regenerar tot l'individu a partir d'un tall tant petit), d'aquí aquests valors tan similars i alts respecte els altres. De tota manera pot haver altres factors també que influeixin en aquests resultats, i pot haver un dany cel·lular causat per la lesió i que ens podria fer augmentar aquests valors, sense ser degut a la divisió cel·lular.

Però, així com els valors d'aquests de cinc dies són també superiors als dels controls (cucs sencers), amb IC de 63.19 i 41.31 respectivament, i és estadísticament significativa la diferència; pels valors dels tallats als 10 dies no surt una diferència significativa amb els sencers, tot i que es pot veure un valor de mitjana diferent (48.79; controls=41.31).

Malgrat no seria del tot correcte comparar els dos experiments, ja que haurien d'haver estat fets utilitzant la mateixa terra preparada STD1 i no utilitzar diferents tipus de terra, cosa que podria portar alguna variació o influir d'alguna manera els resultats, és interessant presentar la comparació en les taules següents:

**Taula 3.1.16:** Comparació dels resultats de l'experiment 1 i 2:

Experiment		IC ± SD	n
2	Tallats 5d.	63.91 ± 1.12	3
	Tallats 10d.	48.79 ± 10.44	6
	Sencers STD2	41.31 ± 9.00	8
1	Tallats 30d.	47.20 ± 7.20	8
	Sencers STD1	32.94 ± 8.04	9

IC: Comet Index

SD: desviació estàndard

n: n° d'individus

Taula 3.1.17: Test de comparació per als resultats de l'experiment 1 i 2:

Test de Comparació Múltiple de Tukey-Kramer			
Comparacions		Significació	Valor P
Tallats <b>5d.</b>	vs Tallats <b>10d.</b>	ns	P>0.05
Tallats <b>5d.</b>	vs Tallats <b>30d.</b>	*	P<0.05
Tallats <b>5d.</b>	vs Sencers <b>STD1</b>	***	P<0.001
Tallats <b>5d.</b>	vs Sencers <b>STD2</b>	**	P<0.01
Tallats <b>10d.</b>	vs Tallats <b>30d.</b>	ns	P>0.05
Tallats <b>10d.</b>	vs Sencers <b>STD1</b>	**	P<0.01
Tallats <b>10d.</b>	vs Sencers <b>STD2</b>	ns	P>0.05
Tallats <b>30d.</b>	vs Sencers <b>STD1</b>	*	P<0.05
Tallats <b>30d.</b>	vs Sencers <b>STD2</b>	ns	P>0.05
Sencers <b>STD1</b>	vs Sencers <b>STD2</b>	ns	P>0.05

Si mirem els números de les mitjanes (Taula 3.1.16), i no tinguéssim amb compte que els dos experiments s'han dut a terme en terres diferents, i que això pot fer que variïn els resultats entre un experiment i l'altre i no siguin del tot comparables, si descartéssim el control en terra STD2 (cucs sencers) tot i que no mostra diferències significatives amb el control en STD1, i de fet, malgrat ser tan elevat té un valor inferior als cucs tallats per als dos experiments encara que estadísticament no mostra diferències significatives entre els tallats al cap de 10 i 30 dies (taula 3.1.17); podríem observar que els valors de cucs que estarien en regeneració durant cinc dies són majors que els de 10, i ambdós tenen un valor superior als de 30 dies, i tots tres superiors als cucs sencers en STD1. Que podria justament correspondre als valors de major divisió cel·lular als cinc dies, i va minvant a mesura que avança el temps, a mesura que es va regenerant. Llavors això seria interpretable com una possible relació, i per tant també interferència, de la divisió cel·lular amb els resultats del comet, considerant que realment aquests cucs estiguessin en regeneració i per tant, en una taxa de divisió activa i superior a la dels cucs sencers (controls). Tot i que si mirem la correlació, trobaríem que estadísticament no hi ha diferències significatives entre els cucs tallats als 5-10 i 10-30 dies, però sí entre els de 5 i 30 dies.

El nombre d'individus utilitzat, potser és petit, sobretot pel cas de les mostres dels cinc dies després del tall, però tot i així, aquest experiment és útil per a tenir una idea de com ha anat i obrir possibilitats a següents experiments o comprovacions.

#### 3.1.4.2.d. Discussió general i comentaris:

En el primer experiment hi ha molta diferència en quan al valor de cucs tallats al cap de 30 dies i els control de cucs sencers ( $47.20-32.94=14.26$ ). Al segon experiment hi ha una diferència respecte als cucs tallats al cap de 10 dies i el control de cucs sencers en STD2 ( $48.79-41.31=7.48$ ). La diferència és significativa en el primer experiment però no al segon, entre els cucs tallats i els controls per a cada prova. Semblaria, però, que hauria de ser més elevada la diferència entre controls i els de 10 dies del tall que als 30, si es tracta de

regeneració, es podria pensar que al cap d'un mes els valors de divisió cel·lular deguts a la regeneració s'haurien d'assemblar més als dels cucs sencers que no pas als deu dies perquè als 10 dies haurien començat una regeneració més activa segurament, mentre que al cap d'un mes s'hauria pogut aturar, o disminuir; (en l'observació a simple vista, externament no mostra cap tipus de marca que indiqués que el tros regenerava encara al cap d'un mes). Però, pels resultats obtinguts, podríem pensar que als 10 dies pot no haver començat una regeneració molt activa encara, o que facin pauses de regeneració depenent de l'època o les condicions del cuc, o que tingui una divisió retardada en el cas dels deu dies, i que encara que visualment no es detecti, pugui encara als 30 dies continuar l'activitat de divisió cel·lular; o simplement que els controls en el segon experiment tinguessin una activitat de creixement elevada, i superior a la del primer experiment. De tota manera no podem comparar perquè estan en terres diferents i segurament l'activitat dels cucs pot estar influenciada pel diferent tipus de terra, en el sentit que pot haver més creixement, o divisió per regeneració depenent també de si els agrada més una terra que l'altra. Tanmateix, tots els valors d'IC dels cucs tallats són superiors als dels controls per a les dues terres, i són més elevats els dels tallats als 5 dies que als de 10 i aquests que als de 30. On podríem indicar doncs que al principi comença la regeneració més activament i es va aturant, però que al cap dels 30 dies, continua els valors elevats de la divisió respecte als controls, encara que exteriorment l'aspecte del cuc sigui com si ja hagi acabat la regeneració. Però tot això especulant un cop més sobre la possibilitat que el comet test detecti aquests augments de divisió, i que realment coincideixin amb els resultats del comet, i que aquests no siguin deguts al dany cel·lular que es pugui haver donat a causa de la lesió. Amb tots els experiments duts a terme fins ara en aquest capítol, tot i que s'insinua una possible interferència de la divisió cel·lular en les mesures del comet test, s'hauria de poder comprovar d'una manera més clara, caldrien altres tècniques que ens mesurin els valors de la divisió cel·lular en les mostres utilitzades per poder comparar amb els resultats del comet test.

De tota manera és difícil de dir exactament quan hi ha la regeneració activa i quan triga sense un estudi de seguiment d'aquesta que no sigui el visual, sinó del comptatge o avaluació de l'activitat de mitosis de les cèl·lules en l'individu. Com havia comentat anteriorment, tot i que visualment veiem un creixement de la part posterior, en diferent amplada i color, això pot trigar més o menys segons la temperatura, l'edat i estat de l'individu, quan més jove i més temperatura, més ràpid regenera, encara que també depèn de l'espècie, de la part amputada i la quantitat o longitud del segment perdut (sempre és millor la regeneració de la part posterior que l'anterior, i si perd molta part del cos, potser no es pot regenerar, o no pot regenerar tots els anells), igualment com la qualitat d'aquesta regeneració, depèn també de la part que es regenera i la quantitat (Edwards & Bohlem, 1996). En el mateix llibre es comenta que es perd la diferència de potencial que normalment hi ha entre la part anterior i posterior de l'individu al tenir un tall, i fins que no es recupera al cap d'unes tres setmanes, aquesta pèrdua inhibeix el creixement. (Això però, no ho interpretaria com que inhibeixi l'activitat de divisió cel·lular, ja que podria dur-se a terme una regeneració, o sí que passaria, però el temps d'inhibició podria ser diferent per a diverses espècies i casos). També hi pot haver contaminants al sòl que impedeixin la regeneració o que sigui correcta. És doncs, un tema complex, en el que intervenen molts factors per a definir un temps de regeneració per a aquesta espècie en aquestes condicions i en aquest tipus i quantitat de lesió, que fa encara



més evident la necessitat i la falta d'un altre estudi per a comprovar la taxa de divisió i regeneració i així comparar amb els resultats obtinguts pel Comet test.

La utilització de la terra estàndard la STD2, preparada amb escorça de suro enlloc d'escorça de pi (com en el primer experiment), potser no va ser molt apropiada ja que un cop vistos els resultats tan elevats en el grup control en aquesta terra es va pensar en algun tipus de problema. L'escorça de suro fermentada pot contenir algun tipus de substància que pot ser tòxica, producte de restes d'algun tractament que hagi rebut, o pot ser tòxic degut a algunes substàncies que pugui contenir, tanins, etc..., això ens podria afectar en els resultats. O, aquest alt IC als controls, podia ser degut a les diferents característiques de la terra que podien perjudicar, o no ser tan favorables pels cucs, o al contrari, i causessin un creixement més ràpid als cucs; nosaltres en tots aquests casos podríem detectar-ho com a major dany al DNA mesurat amb el comet test, si acceptem també que la divisió cel·lular interfereixi en els resultats d'aquesta tècnica.

Llavors, si és així el segon experiment realitzat amb els cucs en terra STD2, tant els sencers com tallats s'haurien de descartar o interpretar amb cura, si tenim en compte que aquesta terra pot tenir algun efecte tòxic o genotòxic sobre els animals, ja que podria fer més confús els resultats, podent detectar el dany genotòxic, quan el que ens interessa és poder veure si hi ha relació entre la divisió cel·lular i els valors més elevats del comet test.

Un altre fet que ens podria indicar que hi ha algun problema en l'ús d'aquesta terra és que es va fer dos experiments amb la utilització d'aquesta terra estàndard STD2, en que es van exposar els cucs durant 2 dies en un cas, donant un valor molt elevat, d'IC =  $52 \pm 10.37$ , (més elevat, inclús, que els cucs tallats als 10 dies, però sí menor que els tallats als 5 dies), i més elevat que el valor utilitzat com a control en aquest segon experiment en que es van exposar els cucs quinze dies a la terra STD2 ( $41.31 \pm 9$ ). Això ens podria indicar que pot haver hagut algun factor en aquesta terra que sigui tòxic o que influeixi d'alguna manera als cucs en el sentit que fa que augmenti el valor de l'índex de dany en l'exposició de dos dies tan sols i disminueixi en una exposició de 15 dies, sigui perquè els cucs hagin processat les possibles substàncies tòxiques, s'hagin recuperat o sigui perquè els costa més aclimatar-se a aquesta terra, i sofreixen un estrès els primers dies que queda superat als quinze dies o , un altre cas molt diferent seria que potser troben molta matèria orgànica que els fa créixer al principi en aquests dos dies i és el que detectem, un augment del comet per l'augment de la divisió cel·lular, i al cap dels quinze dies disminueix . O una altra possibilitat seria que, en els casos de cucs tallats a 5 i 10 dies, ens indicaria o que els cucs no estan en regeneració, i per tant en divisió cel·lular elevada degut a la regeneració, o que aquesta no afecta els resultats del comet, sinó que són altres factors com l'estrès o el dany degut a la lesió , o altres, que afectarien en aquest cas els resultats del comet i no la divisió cel·lular. Per altra banda podríem descartar les diferències degudes als diferents estats o situacions dels cucs en les diferents èpoques o moments en que es realitzen els dos experiments, ja que es van realitzar les dues proves en èpoques molt properes, i cap dels individus testats estava en època de reproducció.

Així doncs els controls en el segon experiment, per alguna raó tenen valors elevats de comet, comparat amb el primer experiment, sigui per divisió o dany, potser estan en estrès en la terra o hi ha algun factor que els afecta, com la composició de la terra, però si fos aquest últim, també estarien influenciats per això d'alguna manera els cucs amputats ja que han estat en el mateix tipus de terra, en temps similars. De tota manera, la utilització d'aquesta terra STD2, no explicaria la diferència que hi ha entre els valors dels tallats i els sencers, i ho podríem interpretar doncs, degut a l'efecte de la regeneració, major divisió cel·lular. Malgrat tot el comentat sobre els possibles problemes en els controls, l'IC d'aquests, tant del primer com del segon experiment és inferior que en cucs tallats.

Cal comentar però, que, per veure el factor d'influència del tipus de terra utilitzada, es va fer una altra prova més tard amb cucs sencers, un altre control, de repetició, amb mostres de preparat de la terra STD1, on es va mantenir els cucs tan sols dos dies en la terra preparada. En aquest cas, però, procedent l'escorça de pi d'un altre sac, encara que de la mateixa marca, i l'experiment es va realitzar a diferents èpoques que el cas anterior. Es va obtenir uns valors també diferents, un valor de  $42.72 \pm 5.57$ , valor també molt elevat, i superior al control del primer experiment al que referim en aquest capítol ( $32.94 \pm 8.04$ ; taula 3.1.13), i inclús més elevat i tot que el valor de STD2 amb quinze dies d'exposició en aquesta terra. Per tant, segurament influeix molt el fet que portin poc temps en una terra, cal una habituació al nou sòl, per les diferències en composició, característiques, entre d'altres. Com també pel fet que pot haver un estrès al canviar de terra i causar un dany, o haver un creixement degut a la matèria orgànica "nova" que pugui contenir, o al contingut bacterià, etc....Per tant considero important el fet d'habituar els cucs a la terra durant un temps abans de l'experiment. Encara que si el que ens interessa, tal com en els capítols 1 i 2, sigui detectar el dany genotòxic causat per alguna substància tòxica present al sòl, que és el que intentaríem detectar, hi hauria el problema del fet que, si es mantenen els cucs en aquesta terra poc temps, potser no s'habituarien prou, i que mostrin valors elevats d'IC podrien ser símptomes d'estrès, i no degut a algun possible tòxic. De tota manera si hi ha algun (geno)tòxic, segons les concentracions o la biodisponibilitat, pot ser que l'afecti de seguida, es mori, o sigui en dosis sub-letals i sobrevisqui, però si no li agrada la terra pot estar un temps sense processar-la; poden assimilar o no, i processar o no les possibles substàncies tòxiques i no detectar cap efecte a llarg termini, o sí, depenent de la substància, de l'espècie, les condicions, i poden recuperar-se de l'efecte de la substància nociva. Així si els tenim en més dies d'exposició també correm aquest risc de no detectar potser ja els efectes del tòxic. Llavors si es vol fer l'experiment amb poc temps d'exposició, com 48 hores utilitzat per varis autors (Hooghe et al. 1996; Šalagovič et al. 1996, tot i que aquest últim els exposa en unes terres contaminades en les que ha fet una dilució amb la terra en la que els havia aclimatat anteriorment els cucs durant dues setmanes), i jo mateixa en el capítol de Doñana, s'ha de tenir amb compte aquest factor d'estrès i d'habitució. O sigui que la interpretació pot ser complicada.

En resum d'aquest apartat, es pot veure alguna diferència o intuir una certa influència per part del que se suposa valors majors d'IC degut a la divisió cel·lular, i encetaria un camí per a posteriors comprovacions. Però amb la realització d'aquests dos experiments només, no es pot dir clarament (tot i que continua intuït-se) que hi hagi una relació entre la divisió cel·lular i el major nombre de comets. Hauria estat convenient realitzar més proves amb la utilització de tècniques per avaluar l'estat cel·lular de divisió (i fer un seguiment dels períodes de regeneració, per saber quan és actiu, quan hi ha una pausa, quan acaba, quan comença, etc..) per a una correcta comparació amb els valors del comet test, per intentar veure aquesta possible interferència de la divisió cel·lular amb els resultats del SCGE.

Algunes consideracions o comentaris:

- S'ha volgut fer un altre intent de comparació, aquest cop ja no estadísticament sinó sols mirant els valors de les mitjanes entre aquests valors d'IC de la taula 3.1.16 d'aquest capítol, i els valors de la taula 1.2.1 del capítol 1 (Cucs en terres de l'abocador) per veure si són molt allunyats, o no, tot i que són diferents terres i això fa que la comparació no sigui correcte, ja que el tipus de sòl i condicions poden influir molt en la situació i estat del cuc i per tant afectar el resultat del comet. Així doncs, si es poguessin comparar els experiments sense tenir en compte que han estat exposats a diferents tipus de terres amb diferents continguts de matèria orgànica i en diferents condicions, en diferents èpoques, i on hi ha la possibilitat d'estar exposats a tòxics en el cas de l'abocador. Llavors tindriem que:

En les zones considerades més contaminades de l'abocador els valors de la mitjana d'IC són de 55,57.49 i 59, equivalents a un valor mig de 55 entre els quatre, valors elevats respecte la zona control de Garraf i respecte els cucs exposats en terra estàndard STD1 (amb valors de 36). Aquí tindriem que els valors podrien ser una mica inferiors en els cucs tallats als 10 i 30 dies (amb valors de 48 i 47 respectivament, taula 3.1.16) que en les mostres de les zones afectades per l'abocador. Mentre que el valor per a cucs tallats als cinc dies donaria molt més alt que les zones contaminades inclús. Cal però dir dues coses al respecte: primer, que l'IC de la terra estàndard STD2 on estaven en el segon experiment, els tallats a 5 i 10 dies i controls de STD2, va donar ja un valor major que els controls de Garraf i els de STD1, partim doncs de la base alta de nivell basal d'IC, a més de tenir en compte que el nombre d'individus és molt petit. Tanmateix hem de tenir en compte el que he comentat abans, hi ha diferents condicions, èpoques, terres, etc..., que ens poden fer variar justament aquests valors i fa que no siguin massa comparables. Però realment tampoc tenim clar que la divisió cel·lular pugui influenciar tant en els resultats del comet, pels resultats i comentaris d'altres autors (Olive & Banáth, 1993; Šalagovič et al. 1997; Villani et al.2000), encara que en aquest apartat i els anteriors semblaria que hi ha influència, però tampoc molt clara o evident, ni molt marcada, caldria fer més proves i repeticions, de tota manera sembla ser que sí fa augmentar el valor basal d'IC, així doncs, caldria tenir-ho en compte en la interpretació dels resultats.

Encara que sigui un test molt sensible, no sabem fins a quin punt detecta en l'ambient la quantitat de (geno)tòxic, ni en la concentració, semblaria que al mirar la contaminació en el medi ambient causada per un abocador, no pot ser massa elevada segons com, degut a factors de dilució, però sí fins al punt de ser detectada com sembla amb els resultats obtinguts en el capítol 1, però llavors, aquest valor pot superar a la possible interferència per la divisió cel·lular?. Depèn de la concentració, de com afecti, i de la divisió cel·lular a quin nivell interfereixi també. Però tot això són només especulacions del que podria ser. Caldria estudis més profunds del tema, és molt complex, i hi ha molts factors que hi influeixen i intervenen. Només he volgut fer una hipotètica comparació per veure el que pot influenciar o no en les mostres avaluades per aquesta tècnica.

#### 3.1.4.2.e. Conclusions:

1. En el segon experiment obtenim majors valors de comet per als cucs tallats al cap de cinc i deu dies que per als controls.
2. Si comparem amb els resultats del primer experiment, malgrat estar en diferents mostres de sòl, podem observar que els valors del comet test van de major a menor en: tallats al cap de 5 dies > 10 dies > 30 dies > control en STD2 > control en STD1. Podríem doncs atribuir aquests valors a la divisió cel·lular durant la regeneració, així el comet test podria detectar superiors valors basals d'IC que caldria tenir en compte en la interpretació dels resultats.
3. Haguera estat necessari o interessant, utilitzar alguna tècnica de mesura de l'estat de divisió cel·lular en aquests individus en que suposàvem que estaven en regeneració, per a poder comparar amb els resultats del comet test.

#### 3.1.4.b. Conclusions generals per als dos experiments:

Aquests petits experiments, podrien, com els anteriors realitzats, indicar-nos d'alguna manera la possibilitat de que la divisió cel·lular influeixi en els resultats del comet test, donant un valor afegit basal, que es podria interpretar com a fals positiu de dany al DNA, fent d'aquesta manera que s'hagi de tenir en compte a l'hora d'interpretar els resultats quan s'utilitza aquesta tècnica en tipus cel·lulars que no siguin quiescents.

---

### 3.1.B. Conclusions generals de tot l'apartat de divisió cel·lular.

1. En els diversos experiments i proves realitzats en aquest capítol, tan *in vivo* com *in vitro*, malgrat els problemes que hi ha hagut en les proves, i ser només petits experiments en els que en molts casos hauria estat d'interès reforçar-los amb altres tècniques per a l'avaluació de l'estat cel·lular, es pot intuir d'alguna manera una possible interferència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test. Continua, però, essent un tema no aclarit del tot avui dia, i faltaria encara dedicar-hi alguns estudis.
  2. Així doncs, malgrat tota aquesta possible influència, es continua utilitzant el Comet test en diferents tipus cel·lulars, per diferents tipus d'avaluacions del dany al DNA causat per diverses substàncies, en estudis de reparació, etc...indicant que no afectaria d'una manera molt acusada i que llavors, tan sols cal tenir-la en compte en la interpretació dels resultats, i ens segons quins casos.
-

### • 3.2. Apoptosi- Necrosi- Comet Test

Estudi de la possible interferència en la mesura pel comet test, de les formes de cèl·lules en apoptosi, i/o necrosi. I avaluació de les possibles imatges que podrien donar aquestes fases en el procés del SCGE.

#### 3.2.A. Introducció:

Durant el procés de mort cel·lular, sigui per apoptosi o necrosi, es dona una fragmentació del DNA en algun moment. Pel que es coneix del mecanisme del Comet test, es podria relacionar un augment de la migració del DNA causat per la formació de DSB (*double strand breaks*, trencaments de cadena doble) durant la degradació del DNA per algun d'aquests dos tipus de mort cel·lular.(Tice et al.,2000).

Actualment encara és un tema en discussió les possibles imatges que poden donar les formes apoptòtiques en la realització del Comet test, ja que si es detecten aquestes formes per aquest mètode, això podria portar a una interpretació diferent dels resultats. Aquesta citotoxicitat, podria ser un factor d' interferència en estudis realitzats per aquesta tècnica per a determinar la genotoxicitat d'algunes substàncies. Així mateix però, també podria ser utilitzada per altres tipus d'anàlisi en el que s'utilitzés l'apoptosi com a centre de l'estudi, pel seguiment del tractament d'un tumor per exemple.

En la discussió de les formes considerades com a resultat de l'apoptosi o necrosi: mentre que per alguns autors no compten les imatges que s'anomenen com a núvol (*clouds*; Pitarque et al. 1999b, DaSilva 2000) on només és observable la cua, no el cap, tot el DNA està a la cua i es veu una imatge com a pols, o les imatge d'eriçó (*hedgehogs* com comenten altres, Tice, et al.,2000; o *ghosts cells* com en diu Choucroun et al.2001, entre d'altres), imatges amb un cap molt petit i una cua ampla i difuminada, separada del cap, considerant aquestes formes com a cèl·lules en apoptosi, o considerant totes aquestes imatges com a cèl·lules no viables, i no comptant-les ( hi ha una comparació feta per Bock et al.1999, on fa servir un sistema d'avaluació de la viabilitat cel·lular amb bromur d'etidi, on el percentatge de cèl·lules no viables es corresponia amb el percentatge d'aquestes imatges, que ell anomena *balloon shaped tail*, donades per al comet test, en una versió una mica modificada). Aquestes imatges podrien ser interpretades com a una interferència en els resultats dels estudis de valoració de genotoxicitat causada per alguna substància, altres autors però, sí les compten, considerant-les com a imatges d'apoptosi (Olive et al. 1993, Tebbs et al.1999). Així com per a la necrosi indicarien unes imatges de comets amb cues estretes de diverses longituds, difícils de diferenciar de les imatges de comet causades per una substància conegudament causant de dany genotòxic (Tice et al., 2000), tot i que no queda massa clara aquesta caracterització de les imatges, continua la discussió per varis autors. Tice et al.(2000) comenten que aquestes imatges típiques d'eriçó es troben també després d'elevades dosis de radiació gamma, on l'apoptosi no és possible, i les mostres eren processades immediatament després de la irradiació. Alguns autors consideren que les

imatges de cèl·lules apoptòtiques (en estadis avançats sobretot) i necròtiques, no es veurien perquè migraria el DNA fora del gel del portaobjectes, es perdrien en forma de petits fragments de baix pes molecular durant l'electroforesi i no es veurien, (Collins, comunicació personal, Tebbs et al.1999; Tice et al.2000) segons Marsteinstredet (1997), això podria fer baixar el nombre de comets que es detectarien, i per tant no seria el SCGE un assaig apropiat per a quantificar de manera acurada apoptosi (Tebbs, et al.1999). Mentre que Olive et al.(1993), (on utilitzen el comet per mesurar apoptosi), indiquen que això passaria als últims estadis de l'apoptosi, on, degut a la gran fragmentació del DNA, els comets apoptòtics serien difícils de diferenciar del *background* de petits fragments de DNA. Així, com ja s'ha dit, alguns científics fan servir el comet com a mesura de les apoptosi causades per substàncies inductores d'aquesta (Krown K.A. et al.,1996; Nelms et al.1997, Olive et al.1993 entre d'altres), acceptant aquestes imatges que podem descriure com de cap petit i cua ampla amb pols intensament tenyida (o amb un cap remanent en forma d'agulla desconnectat de la cua inflada com anomena Krown et al.1996, en que considera atribuïble aquesta forma, a trencaments de doble cadena típics en l'apoptosi, diferenciable de les formes de comet causades per necrosi o per un agent genotòxic, que induirien trencaments de cadena senzilla i s'observaria imatges de cues petites, amb la majoria de DNA no fragmentat que quedaria al nucli) com a les formes apoptòtiques. Si bé que, cal tenir en compte que hi ha varis estadis d'apoptosi, i és possible que es detectessin els primers estadis i no els últims, perquè la gran fragmentació faria perdre aquestes imatges al passar l'electroforesi. Però mai utilitzen aquest mètode sol de mesura de l'apoptosi, ja que com a tot procés biològic, és complicat, i cal fer mesures de diverses tècniques, mai és suficient, o prou indicada, una de sola.

Un altre tema discutible, és el paràmetre del comet per a mesurar aquestes possibles formes; ja he comentat durant tot el transcurs de la tesi, que hi ha discussions encara sobre quin seria el millor paràmetre de mesura per aquesta tècnica, i sembla ser que podria variar segons els cas, essent millor un que altre. D'entre els autors que utilitzen el SCGE per valorar el dany al DNA causat per substàncies que indueixin apoptosi, (Marsteinstredet et al.1997; Gopalakrishna & Khar,1995) observen la longitud de la cua i el *Tail Moment*, que els mostraria una disminució del nombre de comets per la pèrdua de les imatges de cua al augmentar la fragmentació del DNA deguda a les formes apoptòtiques. Alguns utilitzen el *Tail Length*(longitud de la cua) sol, (Delaney et al.,1997), ja que és un sistema senzill on la quantitat de DNA que migra depèn del nombre de trencaments i de la mida d'aquests. Tot i que com comenten Fairbairn & O'Neill,1995; Fairbairn et al.1996, Nelms et al.(1997) i Krown et al.(1996) , encara que el *Tail Length* sol podria ser un indicador suficient del dany al DNA, no és el millor factor ja que arriba un moment en que no augmenta més la longitud, mentre pot haver encara un moviment del DNA en la cua, per això proposen millor utilitzar la mesura del *Tail Moment* que combina dos valors, (seria el producte del *Tail Length*, longitud de la cua, per la quantitat de DNA a la cua mesurat per la intensitat de fluorescència), mentre altres autors consideren insuficient la mesura del *Tail Moment* sol, i recomanen acompanyar-la de la longitud de la cua i la quantitat de DNA migrat (Tice et al.2000). Tots aquests autors fan servir altres tècniques per a mesurar les apoptosi i comparar-les amb els resultats del comet test. En alguns casos però, n'hi ha que utilitzen aquest mètode per quantificar apoptosi directament, utilitzant el *Tail Moment* per identificar aquestes formes i diferenciar-les de les necrosi (Krown et al.,1996, que utilitza una versió modificada del Comet Test, Fairbairn et al.1996) mentre altres utilitzen la longitud de la cua (*Tail length*, Fairbairn.& O'Neill 1995, però no és fàcil discriminar entre cèl·lules en apoptosi i en necrosi

(Fairbairn & O'Neill,1995;Sgonc & Gruber,1998), i les conformacions del DNA afectarien la seva migració, cosa que complicaria l'anàlisi; per la mesura de la longitud de la cua, troben que pot ser confós, i es prefereix el TM, que pot caracteritzar millor les diferents cèl·lules (Fairbairn & O'Neill, 1995; Fairbairn et al.1996). Varis dels que utilitzen doncs, el TM per aquest propòsit, estableixen intervals de dany per aquest, en relació a altres sistemes de mesura per a identificar les formes apoptòtiques, i les altres imatges de cometes. Per altra banda, així com alguns d'aquests autors la consideren bona tècnica per aquesta mesura per a la detecció en primers estadis d'apoptosi els quals no són detectats per diverses tècniques com la citofluorometria de flux, altres creuen que hi ha molts altres tipus de metodologies més adequades, i específiques per a la detecció de les formes apoptòtiques i necròtiques, en que a més, no cal ser sistemes d'anàlisi quantitativs com el SCGE que comporta un sistema d'anàlisi d'imatges i es requereix molt temps.

Seguint amb la discussió, Speit & Hartmann(1999), indiquen que el comet test no ha estat encara suficientment validat i pot ser sensible a la mort cel·lular no genotòxica. Comenten que les dades suggereixen que les cèl·lules apoptòtiques o les necròtiques poden tenir una certa imatge al microscopi, com per exemple, la ja comentada, en la que no hi ha caps i tot el DNA està a la cua. I així, diuen que per l'avaluació dels efectes genotòxics, és recomanable tenir en compte aquestes cèl·lules però excloure-les de l'avaluació sota el principi que representen cèl·lules mortes. En un estudi més recent Hartmann et al. (2001b), anomena a aquestes formes NDCN (*non-detectable cell nuclei*) i les utilitza per a tenir informació de la citotoxicitat,(ja que ha considerat que pel comet test es pot detectar les cèl·lules mortes o que s'estan morint per aquesta morfologia, comptant-les no pel sistema informàtic d'anàlisi d'imatges pel SCGE que no és prou sensible, sinó de manera visual, igualment com fa Turner et al.,(2001), seria la forma de DNA fragmentat sense nucli, i les descarta pels comptatges en quan a l'avaluació de la genotoxicitat dels productes testats), però indica que no s'ha d'utilitzar sols aquesta mesura de NDCN, ja que la fragmentació de la cromatina pot ser deguda a mort cel·lular o a una acció genotòxica. I en el seu estudi considera que el SCGE no és propens a falsos positius (donats per la citotoxicitat) en les condicions i tipus cel·lular que ha utilitzat, (V79 hámster xinès i leucòcits humans, on la fragmentació del DNA induïda per citotoxicitat no porta a un valor elevat de DNA migrat mesurat pel SCGE, però també indica que el comportament d'altres tipus cel·lulars pot ser diferent, com el cas de *TK6 human lymphoblastoid cells* i limfòcits de ratolins, en que una substància no genotòxica a concentracions citotòxiques poden induir una migració del DNA). Mentre que altres autors troben important la identificació d'aquestes formes apoptòtiques pel comet test, i la rapidesa de realització de la tècnica, que podria ajudar en estudis de seguiment del tractament de tumors (Olive et al.,1993), ja que la inducció d'apoptosi, és essencial en la teràpia de varies càncers i altres malalties. Möller et al.(2000), però, parla que és discutible que les cèl·lules apoptòtiques puguin ser distingides per un tipus d'imatge especial per al comet test (com la que comenten d'un cap petit i una llarga cua, normalment de valor de DNA a la cua de > del 90%). Roser et al. (2001), en canvi, indiquen que pel seu experiment, l'apoptosi no necessita estar correlacionada o coincidir amb el dany al DNA induït per substàncies genotòxiques en el SCGE. Segons Choucroun et al. (2001), no troba relació de les imatges de *ghost* (cap petit i cua ampla, cèl·lules altament danyades), amb les cèl·lules mortes ni en apoptosi, a diferència d'altres treballs, però sí que troba relació de l'increment de l'apoptosi amb un augment de TM, *Tail length*, i *Tail DNA*, en les mostres on exclou les formes *ghost*, (formes que considera més en estat de cèl·lula morta), així doncs, segons ells, en estat d'apoptosi es pot trobar cèl·lules amb la



forma que correspon a dany moderat de DNA, (en el nostre cas en diríem, b,c,d,e), llavors no es pot distingir les formes causades per apoptosi de les causades per genotoxicitat, i aquest test no seria interpretat com un test de genotoxicitat. Mentre que Marsteinstredet et al.(1997); Hartmann et al.(2001b), Roser et al.(2001), consideren que les cèl·lules en apoptosi no són necessàriament un factor de confusió pels assajos de genotoxicitat d'aquesta tècnica. D'aquesta manera podem veure com encara hi ha una discussió entre els diferents autors, en saber realment si aquestes imatges amb cap petit i cua ampla, i les que no tenen cap, corresponen a imatges apoptòtiques i/o a cèl·lules mortes, respectivament, o justament aquestes imatges en apoptosi no s'arribarien a veure amb aquesta tècnica.

S'han realitzat estudis sobre la possible distinció entre les dues formes de mort cel·lular (apoptosi-necrosi) induïdes per substàncies químiques o per canvis de temperatura als cultius cel·lulars, i coneixent en cada cas quin tipus de mort es donava, mesurada per altres metodologies i comparant amb les formes obtingudes per al Comet Test, Fairbairn D.W. et al. (1995,1996), i utilitzant els paràmetres de la longitud de la cua i el *Tail Moment*, per a mesurar les diferències. Considerant també la forma que ja he comentat anteriorment com a apoptòtica mentre que per a la necrosi mostraria una forma de cap amb cua normal i més difícil de diferenciar d'un estadi de dany causat en una cèl·lula viva i no en estat de necrosi. Una altra discussió per tant seria les formes necròtiques, l'altra tipus de mort cel·lular, quin tipus de forma tindria les imatges del comet?. I també hauríem de tenir amb compte que els estadis d'apoptosis poden acabar secundàriament en necrosi (Olive & Banáth,1995). Cal però, recordar que el procés d'apoptosi és un procés complex [4], en el que gran part és desconegut, i pot variar segons sigui induït de manera natural o per xenobiòtics químicament o també físicament (i pels diferents tipus de substàncies que induïrien de manera diversa aquest tipus de mort cel·lular).

Així doncs, com ja he comentat, encara avui dia hi ha discussions sobre el tema, en treballs més recents, com Choucroun et al.(2001), i Roser et al.(2001), entre d'altres, no coincideixen a dir si realment la apoptosi seria un terme d'interferència en l'estudi de l'avaluació de la genotoxicitat de determinades substàncies a partir del comet test, i si es pot utilitzar doncs per aquests tipus d'experiments o no.

La mort cel·lular és una part important del cicle cel·lular, quan la cèl·lula ja no pot continuar mantenint una activitat després de tot un cicle, mor. Es pot distingir però, morfològicament, bioquímicament i molecularment una sèrie de fets que permeten discernir dos tipus bàsics de mort cel·lular: Necrosi i apoptosi. Mentre els mecanismes del primer són coneguts des de fa temps, la complexitat dels mecanismes de l'apoptosi, fa que encara sigui tema d'estudi actualment.

L'apoptosi es podria dir que és un tipus de "mort cel·lular programada", ja que sembla ser que la cèl·lula té una mena de programa genètic intern que serviria per a destruir-la quan calgués; es podria considerar l'apoptosi com un antagonista de la divisió cel·lular, mantenint un nombre constant de cèl·lules en teixits i òrgans, i ajudant a eliminar cèl·lules danyades o supèrflues (Roser et al., 2001); així l'apoptosi, es donaria també durant la divisió cel·lular quan el DNA que es va a replicar presenta aberracions, com unions incorrectes entre bases, o estructures anòmales induïdes per agents químics que s'han intercalat entre les cadenes, o trencaments,

---

etc..(Muñoz,1997); es dona també de manera normal durant l'embriogènesi, el desenvolupament i maduració del sistema immune, i com ja he comentat, en el manteniment homeostàtic dels òrgans i teixits (Fairbairn et al.1996). Encara que l'ús d'aquest terme de "mort programada" no seria del tot adequat, ja que hi ha moltes substàncies que poden induir aquest tipus de mort (com determinats xenobiòtics, que inclouria des de substàncies químiques, com drogues, a factors físics, dels que n'hi hauria que serien beneficiosos mentre altres serien perjudicials per l'organisme. (Rudolf et al.2000a). Una desregulació de l'apoptosi, pot provocar la seva contribució a serioses enfermetats, (neurodegeneratives, síndromes autoimmunes, càncers), Florent el al.(1999).

Mentre que la necrosi es podria considerar que és una mort més directa, més ràpida després de dany cel·lular i sever causat per un tòxic, l'apoptosi es consideraria més indirecta, més lenta en el temps, les cèl·lules moren al cap d'hores o dies després de la iniciació del dany. Segons les concentracions d'algunes substàncies donarien un tipus de mort o l'altre, en dosis elevades i més severes causarien les necrosis. (Červinka & Půža,1995).

Cal conèixer una mica les diferències morfològiques que es donen en els dos casos de mort cel·lular, per apoptosi o necrosi:

En el cas de l'apoptosi es pot observar un canvi en la forma de la cèl·lula, s'arrodoneix, hi ha una disminució de l'adherència cel·lular i dels contactes intercel·lulars, sofreix canvis en la superfície cel·lular, les membranes formen circumvolucions, disminueix la mida de la cèl·lula (reducció del volum cel·lular), hi ha una condensació del citoplasma (on, en ocasions, es dona un augment de vacuoles), es produeix una condensació de la cromatina que queda en forma de taques uniformes i compactes situades als marges de la membrana nuclear. Fragmentació del nucli i del DNA en fragments nucleosomals múltiples de 180 a 200bp (Olive & banáth,1995; Kaeck et al.,1993; Krishna et al.1995; Nelms et al.1997; Mareková et al.2000; Singh 2000), degut a l'acció de proteases i nucleases, (tot i que hi ha casos en que no es donen els típics passos per a l'apoptosi, i per exemple no es dona aquesta fragmentació del DNA o en el cas que es dona apoptosi en cèl·lules anucleades, Mareková et al.,2000). Aparició de protuberàncies a la membrana, que a vegades acaben separant-se i formant els cossos apoptòtics al voltant de la cèl·lula, que *in vivo* serien fagocitats de seguida per les cèl·lules adjacents en el cas de teixits, i per macròfags, (Tomei & Cope, 1991; Sgonc & Gruber ,1998; Eizirik & Hoorens ,1999; Rudolf et al.,2000a; Mareková et al., 2000; Nagata, 2000). Hi ha una gran preservació de molts orgànuls fins a les fases finals (Muñoz,1997).

Necrosi: es dona un arrodoniment de la cèl·lula, una inflamació dels orgànuls (mitochondries). Tot i que pot haver una condensació de cromatina, la densitat de les masses no són tan uniformes com en el cas de l'apoptosi, són unes agrupacions de masses mal definides i grans. Hi ha una formació de protuberàncies enormes que acaben en un trencament de la membrana i la desintegració de la cèl·lula (Červinka & Půža, 1995; Tomei & Cope 1991, Eizirik & Hoorens,1999), amb la sortida de tot el material citoplasmàtic, causant, *in vivo*, una resposta inflamatòria (Fairbairn et al.,1996). En el cas de la necrosi primer hi ha una alteració de la permeabilitat de la membrana i després la degradació del DNA, a diferència de l'apoptosi on es dona primer la degradació del DNA (Olive et al.1993, Fairbairn el al.1996) i això fa que

---

s'obtinguin imatges diferents a les apoptòtiques quan es fa servir un tipus de tècnica de tinció (com el bromur d'etidi i taronja d'acridina o *trypan blue* o altres tipus de colorants), o en altres tècniques que es poden utilitzar per la mesura de les formes apoptòtiques, com la citometria de flux, etc...

Una de les diferències majors *in vivo*, és que les cèl·lules en apoptosi són fagocitades de seguida evitant cap dany a les cèl·lules del voltant, (no hi ha expulsió del material citoplasmàtic a l'exterior), evitant la reacció inflammatòria del teixit mentre que en la necrosi hi ha una lisi cel·lular, on hi ha enzims proteolítics i altres productes que surten i danyen les cèl·lules del voltant (Granchi et al. 1998, Nagata 2000), i on és evident la resposta inflammatòria.

En aquest capítol es pretén fer l'estudi següent:

Exposar les cèl·lules Hep2 (línia cel·lular establerta a partir de: *Human epidermoid carcinoma of the larynx*) a una substància que induís apoptosi i no fos genotòxica per poder relacionar amb els valors obtinguts per l'assaig del cometa. Es volia veure si realment pot haver una relació o detecció de les formes apoptòtiques amb els valors més elevats de nombre de cometes (amb els paràmetres de mesura del dany al DNA, com l'índex IC, i el % *Tail DNA*), intentant que fos una substància no genotòxica per evitar la interferència dels valors del dany al DNA degut a les mutacions causades pel genotòxic. Es va escollir l'etanol a una concentració de 3% per a la inducció d'apoptosi (Mareková et al., 2000). Així com també es pretenia obtenir imatges que ens poguessin indicar si hi havia algun valor o tipus d'imatge que es pogués atribuir a les formes d'apoptosi per a treure la possible interferència que suposaria l'efecte de l'apoptosi a l'hora de detectar la genotoxicitat d'una substància. El mateix es va voler fer per una substància que induís necrosi, i també veure si es podia establir alguna forma o paràmetre que pogués diferenciar l'estat de la necrosi de la d'apoptosi, i de la típica de trencament de DNA causat per una mutació donada per l'exposició d'una substància genotòxica. Es va escollir doncs el Tween 20 (*polyoxyethylenesorbitan monolaurate*, sovint utilitzat en laboratoris bioquímics com a detergent no iònic, o essent usat normalment com un estàndard de toxicitat en estudis de valoració de citotoxicitat), es comporta com a inductor de necrosi a concentracions superiors a 0.64mg/ml, segons Červinka M. & Půža V. (1995). Al mateix temps es va voler repetir l'experiment amb una substància (etoposide) conegudament genotòxica que indueix apoptosis, per comparar les formes i paràmetres amb els obtinguts per les proves amb l'etanol (inductor d'apoptosi no genotòxic a determinades concentracions).

---

### 3.2.B. Material i Mètodes:

Es van realitzar les proves següents:

- ◆**3.2.1.** Les cèl·lules Hep2 ( *Human laryngeal cell line*), venen també d'una línia tumoral, així es va establir una primera prova de la mesura de dany basal. Es va comprovar que era baix, no interferiria en els resultats ni caldria afegir un factor de correcció, es podia utilitzar doncs, les *Hep2 cells* en aquests tipus d'estudi.

A partir d'aquí es va realitzar un seguit de proves amb les cèl·lules exposades a diferents concentracions en varis intervals, de diverses substàncies:

Les cèl·lules Hep 2, del passatge 230, es sembraven en plaques de petri amb una suspensió de 1.3ml de cèl·lules i 3.7ml de medi DMEM suplementat amb el 10% de sèrum (BS). Es mantenia el cultiu durant unes 24h a 37°C i 5%CO<sub>2</sub> per a permetre el creixement de les cèl·lules i llavors es canviava el medi, es rentaven lleugerament les cèl·lules amb medi nou, per a poder treure les cèl·lules que estarien mortes, haurien quedat flotant a la superfície del medi. S'afegia medi nou amb la dilució de la substància a la que es volia exposar les cèl·lules, 5ml per placa, i es mantenien a la incubadora a 37°C durant els intervals de temps establerts per a cada experiment.

- ◆**3.2.2.** Per a veure la concentració que es podia utilitzar per induir apoptosi amb etanol, es va fer un seguiment a diferents intervals de temps. Es van fer dilucions d'etanol 96% amb el medi de cultiu DMEM amb 10% de BS (sèrum boví), fins a obtenir les concentracions de 1,3,6,9,12,15,18,i 21%, i es van fer les observacions als intervals de 2, 5,7,11,13 hores.  
El manteniment del cultiu i la preparació es va realitzar de la mateixa manera per a tots els experiments realitzats.
- ◆**3.2.3.** A partir de la prova anterior, es va realitzar un experiment a la concentració del 3% d'etanol 96%, en els intervals de 0,3,6,9 hores i un control a les 0h. Es va dur a terme una observació visual de la morfologia, i la realització del comet test, per a poder fer una primera comparació.

Obtenció de les cèl·lules Hep2 per al Comet Test: després de recuperar les cèl·lules amb un raspap en la placa amb una espàtula i resuspendre les cèl·lules en medi, centrifugar 5 minuts a 1000 rpm, i fer un rentat amb 1ml de PBS (1%) amb Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, centrifugar 5 minuts a 1000 rpm i resuspendre en 1 ml de PBS, mantenint-lo en gel durant uns minuts fins a la realització de les capes d'agarosa.

◆3.2.4. Aquest experiment va constar de quatre parts:

**3.2.4.a.** Realització d'una comparació entre el mètode morfològic per a reconèixer l'estat de les cèl·lules durant el procés (ja que és possible distingir tipus característics de mort cel·lular *in vitro* per criteris morfològics, Červinka M., Půža V,1995; encara que no és suficient un sol mètode per a identificar la mort cel·lular per apoptosi, Mareková et al.2000).

**3.2.4.b.** La gravació en vídeo del procés durant 24 hores (aquest mètode anomenat *time-lapse cimenatographic recording*, consisteix en un microscopi invertit Olympus IMT-2, equipat amb un condensador de llarga distància de d'enfocament, un objectiu de contrast de fases de 20x, el microscopi està connectat a un aparell de vídeo Mitsubishi HS-S5600, i al mateix temps hi ha instal·lat al microscopi una càmera fotogràfica Mitsubishi CCD-100E, podent recollir microfotografies i imatges en vídeo simultàniament. El microscopi està situat en una cambra mantinguda en calor, el microscopi disposa d'una cambra de cultiu incorporada per a mantenir la incubació a 37°C. La gravació es duu a terme en modus 480, amb un factor d'alentiment de 160. El temps d'exposició per a la gravació és en intervals d'un segon cada dos minuts; (Červinka M., Půža V,1995; Rudolf et al.2000a,b).

Per aquesta prova es va sembrar en una placa cèl·lules exposades a la dilució del 3% d'etanol amb sèrum que es van col·locar uns 20 minuts a la incubadora per permetre que s'adherissin les cèl·lules a la placa, i llavors es van posar a la cambra del microscopi a 37°C per a continuar la incubació, que es seguia de manera continuada per l'observació amb el microscopi i la gravació en vídeo a intervals de temps curts, i es treien fotografies de l'estat de les cèl·lules a diferents hores.

**3.2.4.c.** El comet test en les cèl·lules Hep2 exposades a 3% d'etanol per als diferents intervals de 3,6,9,15,24 hores.

**3.2.4.d.** El comptatge de figures apoptòtiques i necròtiques amb la tècnica de la tinció de taronja d'acridina-bromur d'etidi (Schwartz LM & Osborne BA,1995). En el mateix tipus cel·lular Hep2, exposat a 3% d'etanol en els intervals de 3,6,9,15,24 i un control hores. L'etanol a aquesta concentració produïria majoritàriament formes apoptòtiques, essent no genotòxica a aquesta concentració, això ens permetria veure la quantitat de cèl·lules en aquest estat i correlacionar-ho amb els resultats obtinguts per al comet test. Veure si són detectables aquestes formes, i si és així, quina imatge adoptarien les cèl·lules en aquest estat visualitzades amb el comet test, per a poder diferenciar de les formes de dany al DNA causades per una substància genotòxica i establir, si es pot, algun tipus de característica que les discerneixi, per a no interpretar erròniament els resultats donats pel SCGE quan s'exposen les cèl·lules a genotòxics, o per poder utilitzar-la com a tècnica per a detecció d'aquest estadi de mort cel·lular.

◆**3.2.5.** Així doncs, seguint l'experiment anterior, aquest cop per establir una relació entre els resultats de tècniques que mesuren necrosi amb el comet test, es volia investigar si realment el SCGE detectaria aquests tipus d'estadi, i si és així, intentar esbrinar la imatge que donarien, si es pot diferenciar d'alguna manera amb les formes que s'obtidrien possiblement per apoptosi, i les formes que s'obtenen quan hi ha dany al DNA del tipus mutació clastògena causada per una substància genotòxica. Per a l'observació de les figures necròtiques es va exposar a les cèl·lules a una concentració de Tween 20 de 1.28mg/ml coneguda de causar formes de mort cel·lular per necrosi (Červinka M., Půža V. 1995), en els intervals de 3,6,9,15,24 hores i un control.

**3.2.5.a.** Es va fer una observació visual.

**3.2.5.b.** Comptatge per a la tinció de bromur d'etidi-taronja d'acridina.

**3.2.5.c.** Comet test. Per a poder correlacionar els resultats del comet test amb el nombre de cèl·lules en necrosi, si és que realment hi ha una detecció d'aquest estadi pel test. El Tween 20 (a partir d'una solució de 3.2g/50ml en PBS amb ions) es diluïa amb medi DMEM (amb 10% de BS) fins aconseguir la concentració final de 1.28mg/ml.

◆**3.2.6.** Seguint els tipus d'experiments anteriors, es volia realitzar el mateix tipus de prova en cèl·lules Hep 2, per a una substància conegudament genotòxica i causant d'apoptosi a determinades concentracions, com seria el cas de l'etoposide (que bloqueja la topoisomerasa II). Es van realitzar proves a concentracions de 2.5,5,10,20,40,80µg/ml, i es van extreure les cèl·lules per al seu procesament a l'interval de 3h després del tractament.

L'Etoposide en solució estoc de 20mg/ml es va diluir amb medi DMEM amb el 10% de BS (sèrum boví), fins aconseguir les concentracions d'experimentació.

Es va dur a terme el Comet test tal com està explicat pels apartats anteriors.

Aquests experiments es van realitzar en col·laboració amb el departament de Biologia de la facultat de medicina de Hradec Králové (Dr.E.Rudolf), i amb el laboratori del departament de Toxicologia de l'Acadèmia Mèdica Militar Purkinje de Hradec Králové (Dr.R.Štětina). República Txeca. Actualment s'estan continuant aquests experiments .

• Protocol Comet assay:

- En portaobjectes normals, prèviament preparats amb una capa d'agarosa assecada a l'estufa per a fer de base d'adherència de les següents capes d'agarosa (per a substituir l'ús de portaobjectes rugosos):
- Es fa una primera capa de 85µl d'agarosa de punt de fusió normal a l'1%.
- Es fa una segona capa de 85µl de la barreja d'agarosa LMP mantinguda a 37°C amb els 35µl de la suspensió cel·lular (d'entre 5x10<sup>5</sup> cèl./ml -10<sup>6</sup> cèl·lules /ml)
- Lisi de les membranes cel·lulars, durant un període d'entre 1 i 3-4 hores. Líquid de lisi (sense DMSO,[\*]). Aquest cop es va haver de guardar algunes mostres en aquesta solució una mica més d'una hora (que era el temps normal de sempre), per a poder esperar varis intervals de temps de les cèl·lules i processar per al comet test diverses mostres alhora, i no fer una electroforesi per a cada interval de temps. Mai van estar més de sis hores, tot i que en alguns dels articles diuen poden estar fins a dotze hores, encara que alguns ho tenen fins a dues setmanes (Silva et al.2000), com ja havia comentat anteriorment.

[\*]: En les variacions de la tècnica que he comentat en capítols anteriors, hi afegiré, (a més del temps de lisi, que en aquest cas és superior a les anteriors vegades), la preparació de la solució de lisi: mentre alguns autors fan servir *N-lauroylsarcosine* en la solució de lisi, altres no, (com en el nostre cas), i McKelvey-Martin et al.(1993) comentaven que no era necessari. Hi ha diverses variacions segons els autors. Amb el DMSO, passa el mateix que pel cas comentat, mentre alguns autors el fan servir, altres no. El DMSO seria, tal com indica Tice et al.(2000), per prevenir la inducció de radicals al DNA degut a l'alliberació de ferro dels eritròcits presents en mostres de sang i d'altres teixits durant la lisi, actuaria doncs com a *radical scavenger* (evitant dany oxidatiu), i llavors no seria necessari segons les mostres, molts autors ja no el fan servir, i en aquest cas, no s'ha utilitzat.

- Desenrotllament en solució per a electroforesi durant 40 minuts en fred.
- Electroforesi durant 30 minuts a 25 V i 0.3 A. en fred.
- Tres rentats de cinc minuts en tampó Tris.
- Quan l'observació al microscopi de fluorescència es realitzava al moment, es feia la tinció amb 20µl bromur d'etidi per a ser seguidament observat al microscopi. Per a les mostres que no es va poder fer els comptatges al moment, es van guardar, a diferència de les vegades anteriors que es guardaven els portaobjectes en caixes horitzontals humides i tapades per evitar que entrés la llum a la nevera un cop tanyits; en aquest cas es fa: després dels tres rentats amb el tampó de neutralització Tris, un rentat amb aigua destil·lada durant cinc minuts, i es deixen assecar els portaobjectes a temperatura ambient, es poden guardar mesos així en caixes normals per a guardar portaobjectes. El dia del seu ús, per a l'observació de les mostres al microscopi de fluorescència, es posen els portaobjectes durant uns deu minuts en aigua destil·lada per rehidratar les mostres i es passen a tenyir amb els 20µl de bromur d'etidi.

Aquest sistema per a guardar les mostres és millor que els anteriors utilitzats (com guardar en una caixa humida a la nevera), ja que es poden conservar millor les mostres i més còmodament. El sistema anterior feia que no poguessin estar més d'una setmana a la nevera, perdien fluorescència, hi havia contaminacions, tot i que les caixes horitzontals permetien que es conservessin bé durant més temps, però les neveres podien quedar plenes d'aquestes caixes. Aquest altre sistema permet guardar-les durant més temps i

ocupant menys espai, ja que es poden tenir en caixes normals per a portaobjectes guardades en armaris a temperatura ambient. Hi ha autors com Hartmann et al.(2001b), que després del rentat amb aigua destil·lada, fan una deshidratació amb etanol absolut durant dos minuts abans de deixar-los assecar a temperatura ambient. Hi ha altres variacions també, segons els autors, però la que hem utilitzat ens ha anat molt bé.

- Es va comptar 50 cèl·lules per portaobjectes.
- Comptatge amb el sistema d'anàlisi d'imatges *Damage Analysis Lucia 4.51 modul comet assay. Laboratory imaging. Prague* connectat al microscopi de fluorescència amb el filtre adequat per al bromur d'etidi.

•Protocol per a la tinció amb Taronja d'acridina-Bromur d'etidi:

Extret de: Methods in cell biology. Schwartz LM & Osborne BA (Eds.).(1995).Vol.46,capítol 9: The end of the cell line: Methods for the study of apoptosis in vitro. Anne J. McGahon et al. (pp.172-173).

- Preparació dels colorants:  
Barrejar 100µl de taronja d'acridina amb 100µl de bromur d'etidi (els dos preparats en PBS).
- És necessari una concentració cel·lular d'entre  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  cèl./ml. (La mateixa necessària per al comet test). I es realitzarà un comptatge de 200 cèl·lules com a mínim.
- Un cop obtingudes les cèl·lules per un raspat amb espàtula en la placa, i després del rentat amb medi i amb PBS, per dues centrifugacions a 1000rpm a 4°C durant 5 minuts. Es mantenen les cèl·lules en PBS i d'aquí es treu 500µl de la suspensió cel·lular als que s'afegeix 10µl de la solució colorant, i es barreja suaument amb una agitació manual. D'aquí es treu 20µl per a portaobjectes, es cobreix amb el cobreobjectes i es passa a fer la observació a 40x pel microscopi de fluorescència (Nikon Eclipse E400) amb una combinació de filtre per fluoresceïna ( $\lambda_{ex}$ :450-490;  $\lambda_{em}$ 520nm; Rudolf et al.2000a).
- Sobre les 200 cèl·lules comptades es divideixen segons les imatges en diferents grups, tenint en compte que aquests colorants poden diferenciar les cèl·lules vives de les que no, i els diferents estadis d'apoptosi, basant-se en la integritat de la membrana. El taronja d'acridina s'intercala al DNA, donant un color verd. S'uneix al RNA, però no s'hi intercala de manera que dóna un color taronja-vermellós. Així doncs, en les cèl·lules viables queda el nucli tenyit de verd i el citoplasma de vermell. El bromur d'etidi pot penetrar només en les cèl·lules no viables, s'intercala també al DNA, donant una aparença taronja, i s'uneix dèbilment al RNA, de manera que queda lleugerament vermell. Així doncs una cèl·lula morta tindria un nucli taronja (es sobreposa el bromur d'etidi a l'acridina) i si hi ha material remanent al citoplasma, apareix vermell. Els nuclis normals i apoptòtics en cèl·lules vives es tenyeixen de verd. En contrast, els nuclis normals o apoptòtics en cèl·lules mortes són taronges.



Per aquesta tinció, es pot diferenciar entre les fases d'apoptosi inicials (EA: *early apoptotic*) i les més avançades, tardanes (LA: *late apoptotic*):

Mentre que les cèl·lules amb membranes intactes tenen un color verd uniforme al nucli, les EA, que conserven encara les membranes intactes però comencen la fragmentació del DNA, tindran un nucli verd encara, ja que el bromur d'etidi no pot penetrar encara, però es veurà la condensació de la cromatina com a taques verdes al nucli. Quan progressa l'estat d'apoptosi en la cèl·lula, la membrana comença a fer protuberàncies (*blebbing*), el bromur d'etidi pot penetrar i tenyeix de taronja, així doncs les cèl·lules en el següent estadi d'apoptosi (LA), tindran les taques taronges de la cromatina condensada al nucli, que les diferenciarien de les formes necròtiques que tenen un color taronja uniforme. Així doncs s'estableixen els següents grups:

1. Cèl·lules vives, amb nucli normal (cromatina tenyida verd, i estructura organitzada). (veure Fig.3.2.5).
2. *Early apoptotic* (EA; cromatina verda, altament condensada o fragmentada). (veure Fig.3.2.3).
3. *Late apoptotic* (LA; cromatina taronja altament condensada o fragmentada). (veure Fig.3.2.4)
4. Cèl·lules necròtiques (N; cromatina taronja amb estructura organitzada, veure Fig.3.2.5).  
(tot i que per les observacions efectuades, es pot veure que a vegades poden ser també, en forma de cèl·lula tota verda amb ombres degut a l'explosió de la membrana i la sortida del material citoplasmàtic).

A partir d'aquí es calcularà els percentatges per les formes apoptòtiques i necròtiques sobre les 200 cèl·lules comptades.

### 3.2.C. Resultats i Discussió:

- ◆3.2.1. En aquesta prova, com ja he comentat anteriorment, es pretenia veure el dany basal d'aquest tipus cel·lular, per avaluar si podia ser utilitzat per aquests experiments en el cas que no presentés un nivell alt d'aquest. Es va veure que aquest valor basal era baix, i es va poder seguir amb els experiments.
  - ◆3.2.2. Experiment per a determinar la concentració d'etanol 96% que es podia utilitzar per induir apoptosi. Es van provar les concentracions 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, i 21%, als intervals de 2, 5, 7, 11, 13 hores. On es va veure que a concentracions elevades (a partir de 9%), les cèl·lules canviaven de forma quasi immediatament després de l'exposició, adoptaven formes arrodonides, la majoria desenganxades de la placa i quedaven flotant en el medi. A les concentracions més elevades (a partir de 12%) la majoria de cèl·lules
-

quedaven parcialment fixades, detectables per un citoesquelet col·lapsat i la preservació de l'estructura interna. A les concentracions de 6 i 3% provocava en les cèl·lules el tipus de canvis morfològics de les cèl·lules en apoptosi, com un aclariment del nuclèol, una vacuolització i contracció cel·lular (reducció de la mida cel·lular); Rudolf et al.(2000a). Es va poder observar que després de les onze hores de tractament en aquestes concentracions de 3 i 6 %, el 70% i el 99% de les cèl·lules respectivament, estaven en forma arrodonida i amb la de cèl·lules amb protuberàncies (aspecte de *blebbing cells*). Sembla doncs que aquestes dues concentracions estimularien les cèl·lules Hep2 a una mort cel·lular que a primera vista semblaria apoptosi, cal recordar però, que l'apoptosi presenta una sèrie de fases molt complexes i que cal més proves per a poder dir que realment es tracta d'aquest procés. La concentració més recomanable doncs per aquest tipus d'experiment seria al 3% per a aconseguir formes en apoptosi en aquest tipus cel·lular (altres autors fan servir per estudis d'apoptosi, en una altres línies cel·lulars, aquesta concentració del 3% d'etanol com a inductor d'aquest tipus de mort cel·lular, Baisch et al.1999; Mareková et al.,2000).

### ◆3.2.3. Hep2 – Exposades a 3% Etanol – Inducció d'apoptosi

En la prova on es van tractar les cèl·lules Hep2 amb un 3% d'etanol que induiria apoptosi, (essent una substància no genotòxica a aquesta concentració), i en que es van recollir les mostres als intervals de 0,3,6,9-10 hores, es va realitzar el Comet test per a veure una possible relació amb l'observació visual de l'estat de les cèl·lules.

Es van obtenir els següents resultats:

**Taula 3.2.1.** Observació visual al microscopi sobre les plaques de cultiu:

Interval (en hores) del tractament	Observacions a partir de la morfologia
0 h	La forma de les cèl·lules era normal, sense canvis morfològics.
3 h	el 10% de les cèl·lules estaven arrodonides, mostraven protuberàncies (aquestes protuberàncies es mostren quan es comencen a desenganxar de la placa, i fan una sèrie de moviments) i desenvolupament de vacuoles. (Aquest percentatge havien iniciat els estadis d'apoptosi).
6 h	el 30% de les cèl·lules eren rodones i mostraven les protuberàncies ( <i>blebbing</i> ).
9-10h	quasi el 50% de les cèl·lules eren rodones i mostraven les protuberàncies, algunes d'elles semblaven mortes.

**Taula 3.2.2.** Resultats obtinguts per al comet test. Utilitzant el sistema de comptatge visual (mesurant l'índex de dany IC), i l'informàtic, a través del sistema d'anàlisi d'imatges (mesurat pels paràmetres de %DNA Tail, i Tail Moment i Tail length :

Intervals	IC	%DNA Tail	Tail Length	Tail Moment
Control	5.66	5.18	18.06	6.73
0h	2.66	1.91	9.40	1.49
3h	15.91	24.49	46.86	29.15
6h	24.16	37.66	65.69	43.55
9h	28.58	55.25	83.95	70.30

En quan als valors (dels paràmetres del comet test) dels control i a la hora zero s'haurien de considerar similars, ja que al temps zero es van exposar les cèl·lules uns segons tan sols a l'etanol. Potser dona més elevat en el control perquè es van treure les mostres per a fer el comet, al cap d'unes hores d'haver posat en medi nou, i no al mateix temps que les de l'hora 0, hi hauria la possibilitat d'haver alguna cèl·lula moribunda que s'hagi produït durant aquest temps, que podria fer augmentar el valor de comets als controls, o potser hauria pogut donar un valor major de comets en aquests degut a una possible activitat de divisió cel·lular durant aquestes hores en medi nou, o hi pot haver influït algun altre factor.

Si comparem l'observació visual de l'estat de les cèl·lules (taula 3.2.1) amb els resultats del comet (taula 3.2.2), es pot veure una relació, ja que el valor d'IC, de %DNA Tail (el percentatge de DNA a la cua), la longitud de la cua (*Tail Length*), i el Tail Moment (producte del percentatge de DNA a la cua, mesurat com a fluorescència, per la longitud de la cua), augmenten amb el temps d'exposició al mateix temps que augmentava el nombre de cèl·lules amb signes morfològics que suggereixen l'apoptosi.

A partir del percentatge de DNA a la cua, (o també a partir de l'IC o de la resta de paràmetres), es pot fer una gràfica on s'estableix una sèrie de categories de percentatge de DNA a la cua en aquest cas, i a on es mira la freqüència del nombre de cèl·lules en cada categoria. Representat a la Figura 3.2.1 a partir del %Tail DNA, per a l'interval de les 10 hores, es pot observar que hi ha dos pics, corresponents a cèl·lules amb poc trencament, poc DNA a la cua, i a cèl·lules amb molt contingut a la cua, això ens indica que hi ha alguna cosa que afecta a les cèl·lules en aquest moment de forma ràpida, que fa que coexisteixin els dos tipus cel·lulars amb molt de dany i amb gens, sense quasi estadis intermedis de dany. Es podria interpretar que d'alguna manera el comet test detectaria l'estat apoptòtic de les cèl·lules, possiblement degut a que hi ha fragmentació del DNA, que podria ser visualitzat pel comet en els inicis d'aquest estadi quan la fragmentació no fos molt gran encara, i donaria aquests valors d'elevat contingut de DNA (el segon pic al gràfic) a les 10 hores, coincidint amb el major nombre de cèl·lules en apoptosis trobades en aquest interval pel sistema utilitzat per a comptabilitzar aquestes formes.

Si es compara aquest gràfic a les 10 hores després del tractament, amb els dels intervals inferiors (Fig. 3.2.1), on la forma de la línia marca un sol pic, de cèl·lules on no hi ha DNA a la cua, les imatges són només de caps que contindrien tot el DNA, i serien cèl·lules no danyades. Comença sols el pic de dany a ser major en els intervals finals. Aquesta situació, on es trobaria en la mateixa població cel·lular un elevat nombre de formes vives i sense quasi dany (que indicaria el primer pic amb poc contingut de DNA a la cua), i un nombre elevat de cèl·lules amb una cua ampla, intensa i poc cap, (forma que s'atribuiria a imatges apoptòtiques, Fairbairn et al. 1996; Krown et al., 1996, entre d'altres) ja va ser comentada per Fairbairn et al. (1996), quan utilitzava com a inductor d'apoptosi una exposició d'hipertèrmia lleugera en diferents tipus de cultius cel·lulars, on podia diferenciar aquests dos tipus cel·lulars pel *Tail Moment* de manera que podia discernir les cèl·lules sense dany de les danyades; mentre que aquesta diferència era difícil d'establir en les poblacions cel·lulars sotmeses a una inducció de necrosi per una severa hipertèrmia (on la mort era més ràpida a una exposició determinada, al contrari de l'apoptosi on es donava de forma més lenta i variava amb el temps d'exposició). Que trobi que la necrosi és un tipus de mort cel·lular més ràpida, en comparació amb l'apoptosi, no tindria perquè traduir-se de la mateixa manera en quan a la fragmentació del DNA. Amb això vull dir que, al trobar dos pics marcats en la gràfica de cèl·lules que se'ls ha induït apoptosi, ens indicaria que hi ha una fragmentació ràpida del DNA, es dona de seguida, mentre que es troben estadis intermedis de DNA danyat en les cèl·lules mortes per necrosi, - com ja es veurà més endavant -, on la fragmentació del DNA s'hauria potser produït més lentament que per a les formes que morien per inducció d'apoptosi, donant tots aquests estadis intermedis entre els dos pics; així, tot i ser una mort més ràpida per necrosi, la manera en que es dona tindria primer altres alteracions abans que la fragmentació del DNA, al contrari de l'apoptosi. Calia però, tenir en compte, segons aquest autor (Fairbairn et al. 1996), la gran variabilitat de dany que es dona entre cèl·lules a nivell individual, cosa que dificultava més aquesta diferenciació entre les cèl·lules necròtiques, considerant com a formes de necrosi les que havien establert comparant amb altres mètodes per a mesurar la quantitat de necrosi i treient la relació amb un determinat valor de *Tail Moment* i de forma. Olive et al. (1993), anteriorment ja havien comparat els histogrames de TM, trobant també dos pics que separarien les cèl·lules apoptòtiques de les que no ho són, com també comenta Nelms et al. (1997), els quals van establir com a valor d'apoptosi, els de TM major de 110. Mentre que Olive et al. (1993) indicaven valors superiors de 30 (equivalents a uns 15.000 SSB/cèl.) i sovint majors a 60, per a les formes apoptòtiques, i menors de 2 per a les formes no apoptòtiques, i Piperakis et al. (1999), o Krown et al. (1996) marcaven valors entre 8-30 per al TM de les imatges que consideraven en estat d'apoptosi. Cal dir que van fer servir diferents tipus cel·lulars i diferents agents inductors d'apoptosi i per tant, no es poden comparar del tot els valors obtinguts pels diferents casos i condicions. Olive et al. (1993) consideraven que si en teoria en estat d'apoptosi pot haver trencaments de cadena de DNA en una quantitat elevada (entre  $2 \times 10^4$  i  $10^7$ ) - i el comet test és capaç de detectar fins a 100 trencaments de cadena senzilla per cèl·lula - van pensar en que aquest test hauria de poder ser un bon sistema de mesura per a l'apoptosi, i el van comparar amb mesures d'apoptosi fetes per citometria de flux i per altres mètodes. D'aquesta comparació van observar que es podien correlacionar bé, els valors d'apoptosi obtinguts pel comet test i els obtinguts pels altres mètodes que van utilitzar per mesurar cèl·lules en aquest estat. I com ja he comentat, al comparar valors de TM (no per les mitjanes de grup, sinó en forma de freqüències per a veure la distribució del dany) es pot veure dos pics també, dues menes de poblacions de cèl·lules, una amb TM molt baixos i una altra amb TM molt elevats, tal com nosaltres hem pogut observar. Les imatges que van considerar

apoptòtiques són les ja descrites anteriorment, i comenten que arriba un moment que els sistema d'anàlisi d'imatges no pot comptar valors molt petits de DNA al cap del cometa, i això fa perdre informació sobre el nombre d'apoptosis en estat tan avançat, on hi ha una fragmentació tan elevada del DNA que fa perdre els petits fragments durant l'electroforesi, i que aleshores també es poden fer mesures visuals directes (*by eye*, sense utilitzar el sistema d'anàlisi d'imatges), podent així detectar més quantitat de cèl·lules, que representarien estar molt danyades (tal com també recomanen Krown et al. 1996; Tebbs et al.1999; Tice et al.2000; Choucroun et al.2001; Hartmann et al.2001; Turner et al.2001) establint categories visuals per a una millor detecció d'aquestes fases, però arriba un punt que no són detectables. Al mateix temps, Olive et al.(1993); Olive & Banáth, (1995); Krown et al (1996); Nelms et al.(1997), van comparar també els resultats obtinguts pel Comet Test en versió alcalina (el tractament alcalí facilita la relaxació i desnaturalització del DNA permetent així una detecció més sensible de dany de cadena senzilla, Nelms et al.1997) i neutre (no indueix la desnaturalització, no hi ha una separació de les cadenes, permetent així la detecció dels trencaments de cadena doble només, Nelms et al.,1997) on van poder observar doncs valors molt similars en els dos casos, dels que van deduir que la fragmentació del DNA que es dona per trencaments eren de cadena doble, coincidint amb el que es dona en les apoptosis. Així doncs tots aquests autors comentats consideren que el comet test és un sistema sensible de mesura de les apoptosis, així com per a la valoració del dany causat per una substància, i de la reparació d'aquest. En els experiments d'Olive & Banáth (1995), intentaven establir la quantitat i la mida dels fragments de cadena doble i simple – utilitzant una calibració a partir de la corba de trencaments coneguts per a una dosi de radiació determinada i relacionant-la amb el TM obtingut pel comet - per a distingir les cèl·lules en apoptosi, en necrosi i les danyades per determinats agents, on segons els agents inductors i els tipus cel·lulars, variaven els paràmetres obtinguts. Tenint en compte que es tracta d'un tema complex, i en el cas de la necrosi, (segons varis d'aquests autors) són més difícils de diferenciar les formes d'aquesta amb les de dany al DNA provocat per alguna substància genotòxica; Olive & Banáth,(1995); Fairbairn & O'Neill, (1995); Fairbairn et al.(1996) van trobar en la població cel·lular en necrosi un patró de fragmentació del DNA més heterogeni que per l'apoptosi. Segons Fairbairn et al.(1995), costa diferenciar sobretot els estadis avançats d'apoptosi i necrosi, tenint en compte també que la necrosi es pot donar de manera secundària a l'apoptosi. Segons Olive et al.(1999), és possible distingir les cèl·lules apoptòtiques dels estadis inicials de la necrosi, però generalment no es poden diferenciar amb els últims estadis de la necrosi. Tot això pot ser discutible, segons es pugui o no detectar aquestes formes, o si es perdrien els fragments i ja no es veurien, etc..

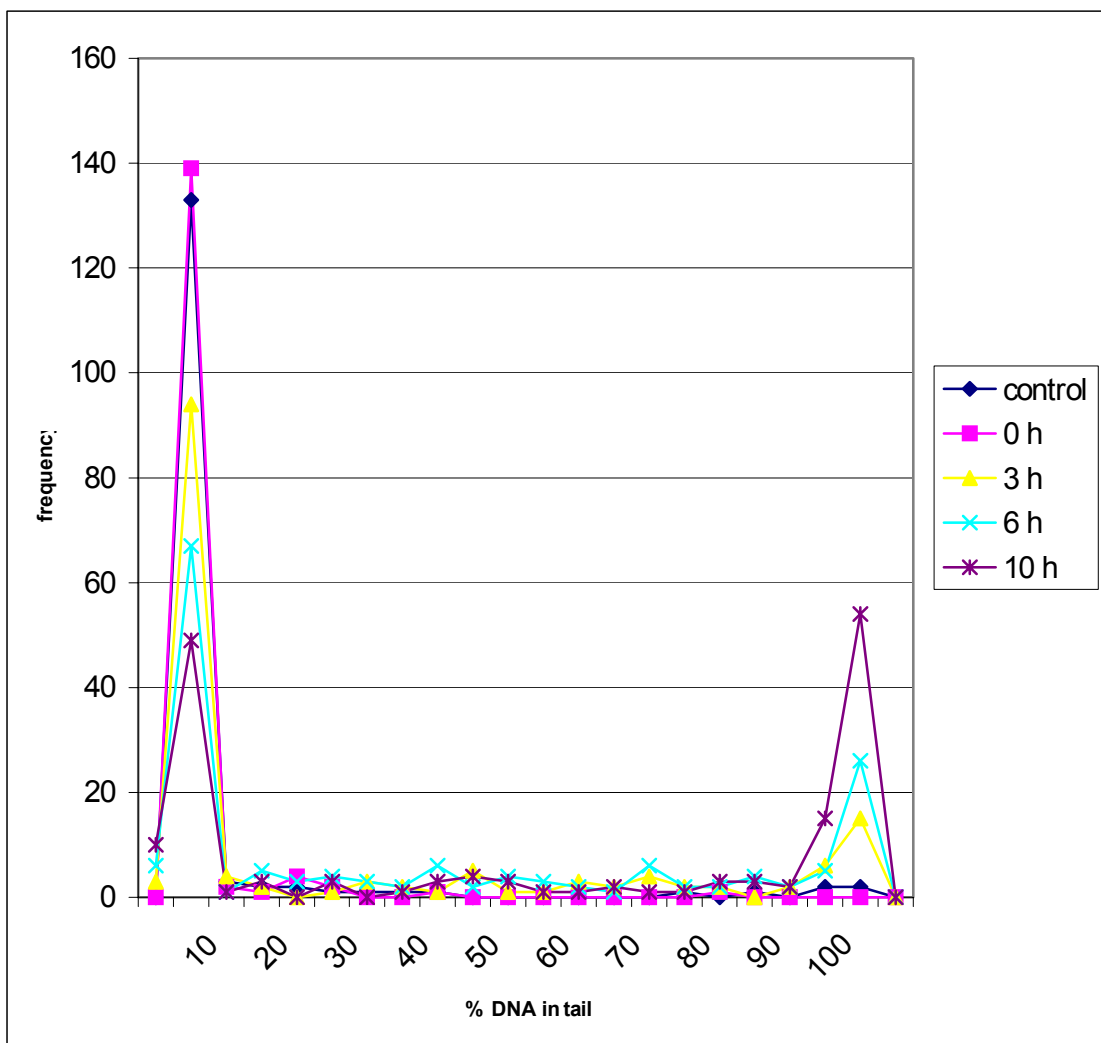
Com ja havia comentat anteriorment, hi ha encara actualment una discussió sobre aquest tema entre els diferents autors, sobre les imatges que donen aquests estadis, i si podria ser un artefacte per a la mesura de la genotoxicitat mitjançant aquesta tècnica. Segurament, hi ha millors sistemes i més adequats per a mesurar apoptosis que no aquest assaig, encara confús en aquest tema, i aquesta aplicació no resulta vàlida per a altres investigadors; a més del fet que seria necessari més d'un test per a mesurar les apoptosis, perquè com ja he dit, és un procés complex. D'alguna manera, però semblaria que el SCGE, n'és sensible o influenciable.

Tice et al (2000) proposa una assaig de difusió de baix pes molecular per a detectar cèl·lules en apoptosi /necrosi, a partir de les mostres preparades per al Comet Test, amb una variació de la tècnica, sense electroforesi, en el que la difusió de DNA es donaria per la degradació del DNA (degut als DSB) en fragments de molt baix pes molecular, i diu que ajudaria

a diferenciar en experiments de dosis molt elevades d'una substància o per a la interpretació de respostes positives amb el Comet Test. Singh et al.(2000), descriu en aquest article (*review*), la tècnica del *DNA Diffusion Assay*, un sistema similar al SCGE sense electroforesi, per a visualitzar apoptosi i necrosis de forma diferencial.

Per observar els dos pics de % de DNA a la cua que es donen sobretot en els intervals més avançats trobats en el nostre experiment, es mostren en l'histograma següent:

**Fig.3.2.1.** Histograma de les cèl·lules Hep2, exposades al 3% d'etanol en els diferents intervals de temps, 0,3,6,10hores:

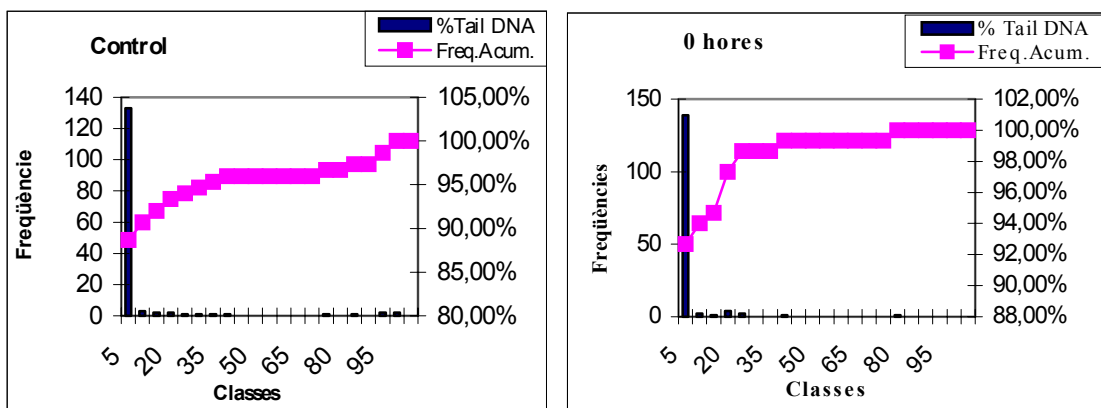


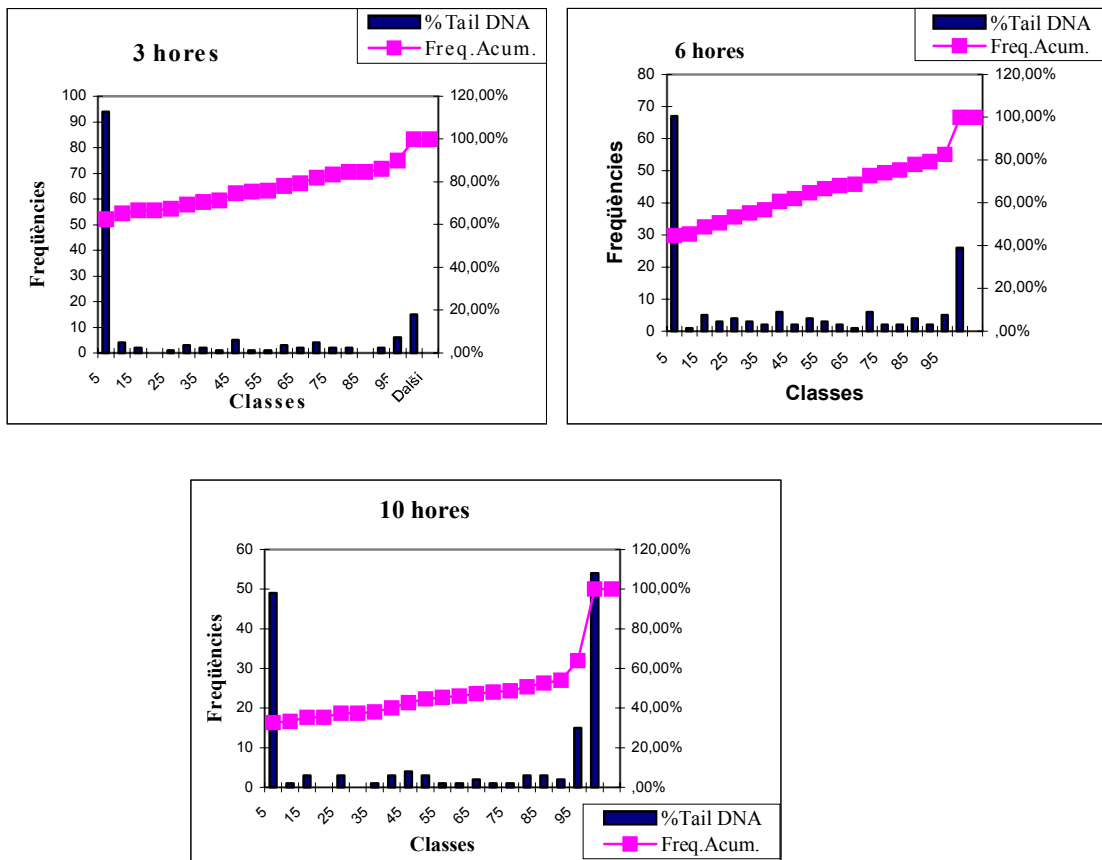
Cal tenir em compte, però, que hi ha varis estadis d'apoptosi, i que potser el comet detectaria sols algunes fases, les més inicials on comença la fragmentació del DNA i encara no és molt acusada. Olive (1999), comentava que un extens nombre de trencaments resultarien en la pèrdua de DNA, fragments més petits de 50kb es poden perdre durant la lisi i l'electroforesi o poden no quedar

ben tenyits. Mentre que segons altres autors, les apoptosis no es detectarien en absolut, degut a la gran fragmentació del DNA, que en l'electroforesi faria que es perdessin els fragments tant petits i no es podrien veure (Collins, comunicació personal, entre d'altres).

Es veurien pocs estadis intermedis, faria pensar en que les cèl·lules sotmeses a la inducció d'una mort programada, un cop comencen l'apoptosi, aquesta procedeix molt ràpidament, (hi hauria un procediment de fragmentació nucleosomal molt ràpid), ja que durant el temps de seguiment de la inducció hi ha pocs estadis intermedis de dany al DNA (Olive et al.1993; Godard et al.1999) detectat pel SCGE, a diferència de les morts per necrosi, on es veuria un ampli rang de formes de comet (Olive & Banáth,1995). De tota manera, aquí ho podem relacionar amb el fet, que per a l'observació visual, semblava que a les 10 hores hi havia el 50% de cèl·lules en apoptosi, i l'altre 50% no (serien cèl·lules viables), aquí hi hauria els dos pics, un amb poc %DNA a la cua, que ens indicaria cèl·lules vives, i un pic, menor, amb %DNA a la cua elevat, que ens podria indica cèl·lules molt danyades, en aquest cas, es podria relacionar amb el percentatge de cèl·lules en apoptosi que serien detectades pel comet test degut a la fragmentació del material nuclear que es dona en aquesta fase. En els intervals anteriors el nombre d'apoptosi seria menor, i aquí podríem veure el segon pic, també menor. Així doncs, ens podria separar els dos tipus de cèl·lules tal com Olive et al.1993, havia comentat. Cal però, tenir en compte que en aquest cas, el sistema de mesura de les apoptosis per a comparar amb el comet test, era una simple observació pel microscopi sense cap mena de tinció, ni cap sistema específic de comptatge per aquestes fases.

**Fig.3.2.2.** Si fem els histogrammes a les diferents hores s'observarà millor l'augment del pic dels valors elevats per DNA a la cua:





En aquests gràfics està representat el mateix que la figura 3.2.1, però en histogrames, on es pot veure per les barres la representació del %de DNA a la cua (%Tail DNA), en freqüències de les diferents quantitats del percentatge agrupades en classes, o categories de dany d'interval de 10 en 10), i on es representen també, les freqüències acumulades (Freq.Acum.).

Es pot observar en el control i en l'interval de 0 hores, un sol pic corresponent a la classe de menys de 5-10% de DNA a la cua, evidentment la majoria de cèl·lules estan en bon estat i vives, mentre que en l'interval de 3h. es pot ja començar a veure una primera insinuació d'un segon pic al costat oposat de l'histograma indicant que comencen a augmentar les categories, o classes d'un major dany (superiors a 95% Tail DNA), que aniran creixent en els intervals següents, havent poca quantitat d'estadis intermedis, cosa que ens podria indicar una evolució ràpida en el procés de la mort cel·lular per apoptosi, una degradació del DNA ràpida, que es podria detectar pel comet test. A les 10 h. es poden veure ja els dos pics que correspondrien a dues categories de dany i que es pot considerar que d'alguna manera es corresponen amb l'observació visual sobre les plaques on hi havia aproximadament la meitat de cèl·lules vives i l'altre meitat mortes en aquest interval, com ja havia comentat.

En l'observació visual al microscopi de les formes dels cometes, les cèl·lules mesurades en el nostre experiment tenen una varietat de formes (des de caps sense cua, cap amb cua més o menys llarga, cua sola, cap petit i cua ampla; en una proporció diferent segons l'interval i la substància a que s'exposen les cèl·lules). Si considerem el dubte que les imatges donades com a



típiques d'apoptosi (caps petits i cua ampla, o imatges sense cap, cua de pols), ho siguin realment, ja que com he dit, és un tema a discutir encara, i per exemple, segons Choucroun et al.(2001), consideren les formes de cap amb cua llarga com a relacionades amb apoptosis, mentre que Roser et al.(2001) no troba relació entre la mesura d'aquest tipus de formes mesurades per la intensitat de la cua, i el nombre de cèl·lules en apoptosi. Volíem intentar veure la diferència de formes o paràmetres que es donarien, si és que es donen, (tant per la mesura visual dels cometes, *by eye*, com pel sistema d'anàlisi d'imatges), en les imatges obtingudes pel SCGE causades per substàncies genotòxiques (trobades en estudis anteriors realitzats), i les obtingudes en aquesta prova, quan hi ha un inductor d'apoptosi, per intentar discernir les formes d'un i altre cas, i establir doncs, un tret diferencial per a caracteritzar les que podrien ser possibles formes apoptòtiques, i pal·liar d'alguna manera la possible interferència que causaria l'apoptosi en l'avaluació dels efectes d'una substància genotòxica, si és que hi és (ja he comentat que encara és discutit actualment; Möller et al.2000; Choucroun et al.2001, Roser et al.2001, entre d'altres). No es va trobar cap paràmetre que les diferenciés ni cap imatge concreta que es pogués associar de manera clara a l'apoptosi, malgrat que en general hi ha algunes diferències.

D'aquesta manera, en la nostra observació de les imatges de cometa pel microscopi, es podia veure l'augment de cues en els intervals més avançats. Les imatges de cues amples i caps petits, amb una intensitat difuminada de tinció al centre de la cua (considerades per alguns autors, com ja he comentat, com a formes de cèl·lules en apoptosi), eren cada cop més abundants en els intervals de temps més grans, i en l'interval de 9-10 hores es van observar moltes cues que semblaven haver perdut una part d'aquesta, el que anomenaríem núvols de pols (cues soles), i que ens podria indicar una fragmentació molt gran del DNA causada per la inducció de l'apoptosi per l'etanol, i segurament ja no es veurien en un interval major (o inclús en aquest mateix no hi hauria detectades totes les cèl·lules), podríem considerar que hi ha un major nombre de cèl·lules en els estadis més avançats d'apoptosi, on la fragmentació seria tan gran que podria ser que es perdés la cua en l'electroforesi, i no l'observaríem ja ni visualment, cap forma de cometa. Tot això, podria coincidir amb la interpretació visual de l'estadi de les cèl·lules en la placa, on mostrava que en aquest interval la meitat de cèl·lules semblaven en fase d'apoptosi, i algunes mortes. Caldria però un sistema o varis test per mesurar aquest estat de les cèl·lules i comparar-ho.

En aquest cas s'ha utilitzat per a comparar i fer els histogrames, el percentatge de DNA a la cua, mentre hi ha autors com Nelms et al.(1997) que comenten que és millor utilitzar el *Tail Moment* o la longitud de la cua, ja que es poden trobar casos on hi ha el mateix valor de percentatge de DNA a la cua (mesurat per la intensitat) i diferents longituds de cua, corresponent doncs, a imatges diferents de comet. Per altra banda el mateix autor, com he comentat ja anteriorment, establia una manera d'identificació de les imatges apoptòtiques indicant un valor de *Tail Moment* superior a 110 per aquestes; o Fairbairn et al.(1995) indicava un valor de TM superior a 30 o 60 per les cèl·lules en apoptosi, però considerava no fiable el *Tail Length*, perquè porta a confusió. Cal però, tenir en compte que realitza l'estudi amb un altre tipus cel·lular i la inducció a l'apoptosi és causada per un altre agent, així doncs, aquest valor de TM obtingut per aquests autors en casos concrets, podria no servir-nos del tot per a comparar, ja que els resultats podrien variar segons l'espècie cel·lular utilitzada, el tipus de substància inductora, etc... Podíem haver utilitzat el TM per a fer els histogrames i veure els dos pics també, o la relació amb l'apoptosi, però si es miren els valors de les mitjanes per a cada interval donat (taula 3.2.2), tant

pel TM, *Tail Length*, *%Tail DNA*, i IC, es pot veure que els tres augmenten amb els intervals, al mateix temps que per l'observació al microscopi augmentaven els valors de cèl·lules en apoptosi.

#### ◆3.2.4. Hep2- Exposició a 3% Etanol – Inducció d'apoptosi.

Resultats per l'experiment de l'exposició de Hep2 a 3% d'etanol als intervals de 3,6,9,15 i 24 hores i dos controls (a les 9 i 15h).Hi van haver quatre tipus de proves:

- **3.2.4.a.** Es va realitzar la gravació del seguiment en vídeo durant 24 hores d'una placa de cèl·lules i es van obtenir fotografies per a l'observació del comportament de les cèl·lules exposades a l'etanol.
- **3.2.4.b.** Observació directa a les plaques de l'estat de les cèl·lules.
- **3.2.4.c.** Es va dur a terme el comet test en aquests intervals.
- **3.2.4.d.** Quantificació de la viabilitat cel·lular i l'índex apoptòtic amb la tinció de bromur d'etidi i taronja d'acridina.

##### 3.2.4.a. Per a l'observació en vídeo:

A les cinc hores comencen a aparèixer els primers canvis en les cèl·lules que són característics d'apoptosi: un augment de les vacuoles ,no es podia però, observar l'aclariment dels centríols al nucli. Les cèl·lules anaven canviant de forma, s'arrodonien, disminuïen de mida, anaven perdent l'adhesió a les plaques i començaven llavors unes protuberàncies a la superfície de la membrana (un procés anomenat *blebbing*), aquests moviments i protuberàncies en el temps donaria l'anomenat "ball de la mort", que consistiria en relaxacions i contraccions rítmicament repetides de les membranes de les cèl·lules. Finalment adopten l'estat que s'anomena de necrosi secundària, les cèl·lules es queden parades, es formen els cossos apoptòtics (fragments de cromatina que queden envoltats per una protuberància de la membrana i queden com a cossos diferenciats al voltant de la cèl·lula), i, on finalment s'aprecia quan es trenca la membrana cel·lular i surt tot el material citoplasmàtic, formant una mena d'ombra al seu voltant. No estan sincronitzades, així que no totes moren alhora. A les 9 hores la majoria estaven en aquests moviments o ja estaven parades. Però al cap de 12 hores estaven totes mortes. (Es pot comparar amb les observacions recollides per altres autors, Rudolf et al.2000b, on es pot veure el procés per la gravació en vídeo de cèl·lules Hep2 , en les que se'ls indueix a l'apoptosi per etoposide). (En les cèl·lules mortes per necrosi, és una mort molt diferent , ràpida, violenta i que acaba embrutant molt el medi).

---

3.2.4.b.

En l'observació directa de la morfologia en les plaques, en les mateixes plaques d'on es van treure les mostres per a la realització del comet test i de la tinció amb taronja d'acridina i bromur d'etidi es podia observar:

Taula 3.2.3.

Interval	Observacions a partir de la morfologia
3 hores	Un 25% de cèl·lules estaven en apoptosi.
6 hores	un 40% eren cèl·lules morint-se.
9 hores	un 60% de les cèl·lules estaven en apoptosi.
15 hores	el 90% de les cèl·lules eren mortes, algunes en apoptosi i moltes necròtiques.
24 hores	el 100% de les cèl·lules estaven mortes.

3.2.4.c i d:

En la realització del comet test i el comptatge per a la tinció específica de taronja d'acridina i bromur d'etidi es van obtenir els següents resultats:

Taula 3.2.4. Resultats de l'exposició de Hep2 al 3% d'etanol per a la inducció d'apoptosi.

Etanol	%Tail	%SSB	Tail L.	TM	IC	% EA	% LA	% A	% N	% Live
C 9h	10.16	0.426	19.10	9.01	15.00	7.70	0.71	8.41	10.63	81.91
C 15h	21.54	0.904	42.89	25.80	26.25	22.70*	4.34*	27.04*	4.83*	68.11*
3h	15.71	0.660	24.94	16.32	20.75	16.50	6.00	22.50	5.00	72.50
6h	18.08	0.759	31.92	22.31	22.75	58.59	7.03	65.62	14.45	19.90
9h	42.27	1.775	59.86	48.06	52.50	54.61	18.46	73.07	10.00	13.07
15h	57.41	2.411	94.89	80.28	60.50	22.22*	28.50*	50.72*	37.68*	11.60*
24h	80.51	3.381	139.83	121.66	92.75	9.10*	23.44*	32.54*	62.67*	4.70*

Els intervals són de 3, 6, 9, 15, 24 hores i hi ha dos controls (C9h i C15h), tret a les 9 i 15 hores.

Els valors del Comet Test es mesuren amb els paràmetres obtinguts a partir del sistema d'anàlisi d'imatges: el percentatge de DNA a la cua (%Tail), el percentatge de trencaments de cadena senzilla per a  $10^9$  daltons (SSB), la longitud de la cua (Tail L.), i el *Tail moment* (TM) i pel comptatge visual (*by eye*) amb IC, el *Comet Index*, ja comentat anteriorment.

La mesura per a la tinció de taronja d'acridina-bromur d'etidi, es dona en percentatges de: apoptosi total (%A), que es pot desglossar en primers estadis d'apoptosi (EA, *early apoptotic*), i estadi més avançat (LA, *late apoptotic*), el percentatge de cèl·lules en necrosi (%N) i el percentatge de cèl·lules vives (% live).(\*Els valors marcats de la taula, a les 15, 24h i C15h, s'han d'interpretar amb precaució, van haver problemes al comptatge).

Si comparem aquests percentatges (malgrat no tenir-los complets per a tots els intervals), amb els de l'observació visual de les plaques realitzada anteriorment, i recollida en l'apartat anterior (3.2.4b; Taula 3.2.3), es veu bastant bona relació entre les dues mesures, l'observació al microscopi de les formes per un expert, i la comptabilització per un sistema de tinció que diferenciaria els diferents estadis. Per aquesta tinció en que pot separar els estadis més inicials d'apoptosi dels més avançats, es pot veure una correlació lògica segons les hores. Al principi hi ha quasi totes les cèl·lules vives, hi ha algunes morts, però poques, després de l'exposició a l'etanol, comencen a augmentar les formes apoptòtiques inicials (EA) induïdes per aquest, i a mesura que avancen les hores, van augmentant el nombre de cèl·lules en (EA), que es va desplaçant per l'augment de les (LA), estadis més avançats de l'apoptosi, fins que comencen ja a augmentar les necrosi, i pràcticament no queden cèl·lules vives al cap de 21 hores.

Un cop més tenim uns valors de dany elevats dels controls, mesurats per a tots els paràmetres del comet, mentre que hi ha un valor gran (82%) de cèl·lules vives. Això ens podria indicar que al haver extret les mostres a un interval de temps tan llarg després del canvi de medi (a les 9 i 15 hores) per a fer les mesures, i no estar sincronitzades, podria fer que hi hagués una part de les cèl·lules en estat moribund, com ens indicaria un nombre elevat de %N (percentatge en necrosi) en una de les mostres control tenyides (amb un valor del 10%, mentre que a les 3h és del 5%), o, al estar en medi durant aquest cert temps, hi hauria cèl·lules en els diferents estadis de la divisió també, (si no s'havia arribat a la confluència cel·lular), que podrien afectar els resultats del comet test d'alguna manera. Hagués doncs, calgut treure les cèl·lules en un interval de temps anterior, ja que el problema podria estar en els diferents estadis en que poden estar del cicle cel·lular en la placa al cap de tantes hores de viure en el mateix medi.

Al mirar la resta d'intervals, podem veure un augment dels valors de dany mesurat en %Tail DNA, i també per a la resta de paràmetres del comet, amb el temps, que podria estar relacionat doncs, en part, amb aquest augment del nombre d'apoptosi que es pot observar al mirar les plaques directament al microscopi (entre les 3 i 9hores sobretot), i l'augment també de les necrosi en els últims intervals (de les 15 a les 24h.). I el mateix al comparar-ho amb la tinció de taronja d'acridina-bromur d'etidi (tot i no haver tots els intervals comptats). Però no es pot establir una relació exacte, ja que no coincideixen els valors proporcionalment en els diferents intervals entre els resultats dels paràmetres del comet i els de la tinció. Semblaria potser seguir més una relació de més a prop amb les formes de (LA), no queda massa clar amb les de (EA), contràriament al que s'hauria pensat fins ara que seria més fàcilment potser detectar les apoptosi en estadis primers on la fragmentació no seria encara tan elevada, que en els últims, on la seva detecció podria ser més difícil (Olive et al.1993, entre d'altres). I tampoc es relacionaria massa amb el percentatge de necrosi. Així, amb els pocs resultats obtinguts en aquest experiment, no es pot veure de manera clara una relació amb les formes (EA), o (LA), o de necrosi i aquests valors de comet, sí es veu que hi influïrien d'alguna manera, però segurament no ho fan prou com per

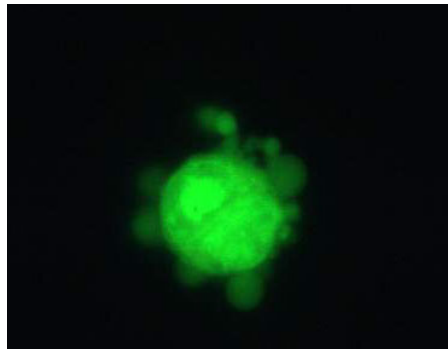
ser detectats més exactament per aquesta tècnica, estan llavors més d'acord amb el que comentarien Roser et al.(2001), els quals indiquen que el *Comet assay* és un test específic per la detecció de diversos rangs de dany al DNA, induïble per substàncies genotòxiques, i que el tipus de dany detectat, no és necessàriament indicatiu de confusió per apoptosi (l'apoptosi no necessita "obligatòriament" correlacionar-se o coincidir amb el dany al DNA induït per substàncies genotòxiques en el SCGE), malgrat que la relació apoptosi/comets, pot variar per a diferents tipus de cèl·lules, components testats i les seves concentracions. Contràriament a tot el seguit d'autors ja comentats anteriorment, que utilitzen el comet test per a la detecció d'apoptosi, i que en un cas comenten que es podria detectar la fragmentació per apoptosi, més aviat inclús que per citometria de flux o per la típica *DNA ladder* (Fairbairn et al.1996; Godard et al.1999). Influeixi o no en els resultats del Comet test, sembla que sí hi ha alguna mena de relació pels experiments vists fins ara.

Si comparem els resultats d'aquest experiment (Taula 3.2.4) amb els de l'anterior (Taula 3.2.2), pel paràmetre de %Tail DNA, TM i IC, en els intervals de 3,6,9hores: malgrat que els valors d'aquests paràmetres siguin menors en general pels corresponents intervals, es veu un augment del percentatge a partir de les tres hores cap amunt, igualment com es donava en la prova anterior. Hi ha hagut, però un creixement diferent de les cèl·lules i una reacció una mica desplaçada en el temps en les dues proves. Però es podria veure una mena de relació entre la major quantitat de formes en apoptosi i un augment de comets.

Si es fessin uns histogrames com els de l'apartat anterior per a les 9 hores s'obtidria una forma similar, dels dos pics corresponents a dues poblacions diferents de cèl·lules coexistents, les que no tenen dany, i les que estan altament danyades, amb elevat valor de % de DNA a la cua. (Fig.3.2.11).

Es van poder recollir imatges dels estadis d'apoptosi per un sistema d'imatges digitals a partir de les mostres tenyides amb bromur d'etidi i taronja d'acridina:

**Fig. 3.2.3.** *Hep2 cells*. Estadi EA (*Early Apoptotic*).

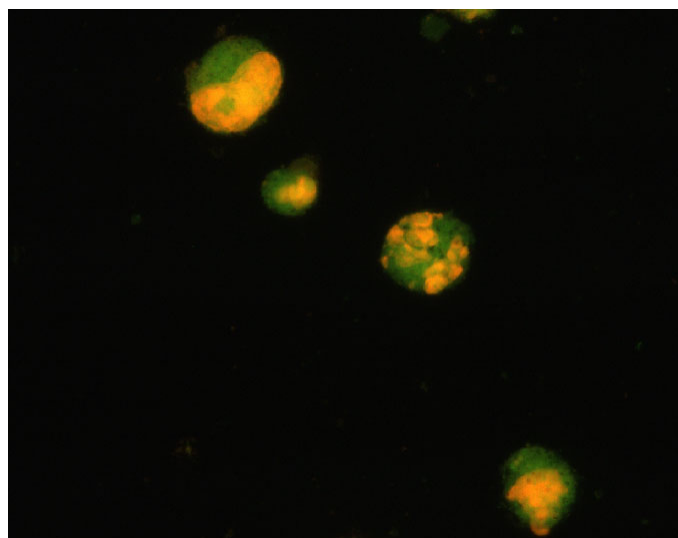


Hep2 cells exposades a etanol al 3%. Tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi.

Microscopi de fluorescència (Nikon Eclipse E400). Obj.40x, amb filtre per a fluoresceïna. Foto digital guardada pel software d'anàlisi d'imatge Lucia LIM 4.51.

Imatge que correspondria a una forma apoptòtica, en estat de (EA), on es poden veure les protuberàncies (*blebbing*)de la membrana i la condensació de cromatina tenyida de verd més intens en el nucli, formant com a taques compactes. Al ser dels primers estadis d'apoptosi, s'ha començat a fragmentar el DNA mostrant les taques condensades de cromatina, però la membrana encara no ha sofert canvis de permeabilitat, això fa que no pugui penetrar encara el bromur d'etidi i es pugui observar de color verd tota la cèl·lula.

**Fig.3.2.4.** *Hep2 cells*. Estadi LA (*Late apoptotic*)

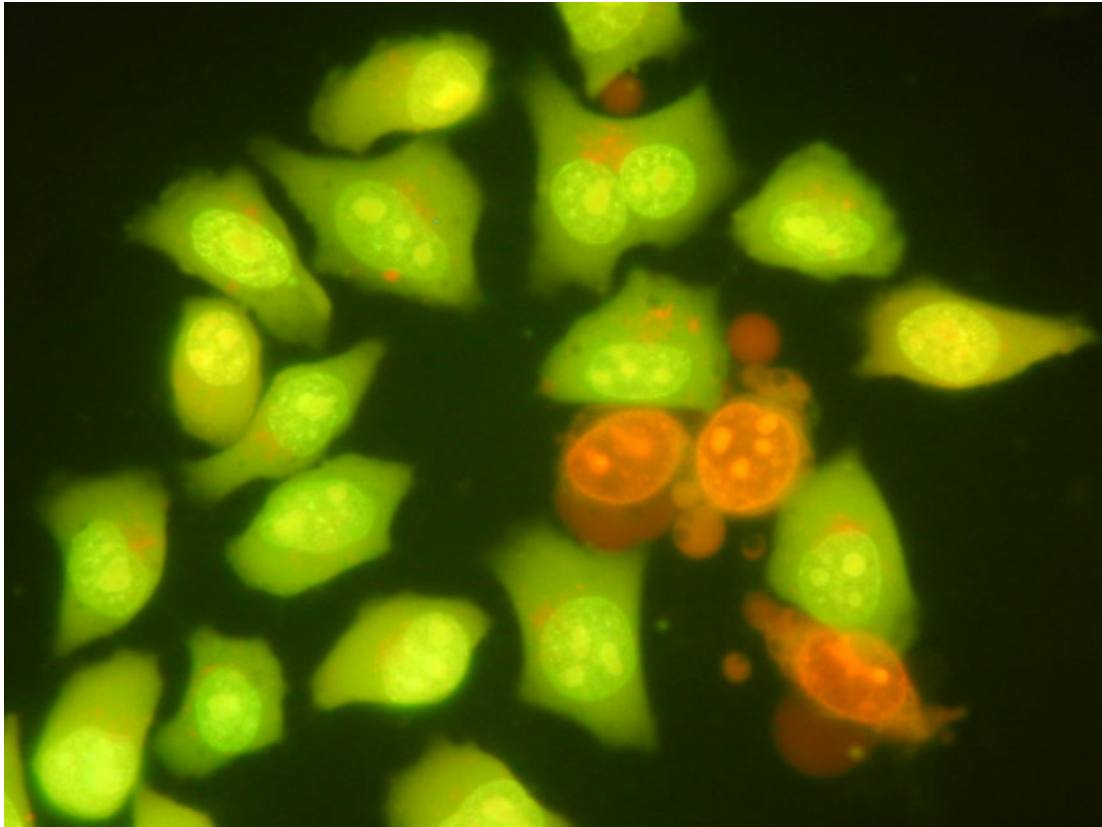


*Hep2 cells*, exposades a etanol al 3%. Tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi. 400x.

Estat (LA) d'apoptosi. On es pot observar la fragmentació de la cromatina tenyida de taronja, i és un estat d'apoptosi molt més avançat que l'anterior on hi ha canvis en la permeabilitat de la

membrana i es pot observar per això la cromatina tenyida de taronja degut a que el bromur d'etidi ha pogut penetrar ja en la cèl·lula.

**Fig.3.2.5.** *Hep2 cells*. En estats: Vives, i en necrosi.



Cèl·lules Hep 2. Mostra control. Tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi.400x.

Aquí es poden observar les cèl·lules vives tenyides de color verd, amb la membrana intacta i totes les estructures cel·lulars en bon estat. En taronja, però, es poden observar les cèl·lules en necrosi, en les quals es pot observar el trencament de la membrana i sortida del material citoplasmàtic (fa com una bombolla, o ombra al costat de la cèl·lula), tenyit d'aquest color per la penetració del bromur d'etidi.

En quan a les formes de cometa que es podien observar a les mostres obtingudes per al comet test a partir dels paràmetres mesurats pel sistema d'anàlisi d'imatges: en aquest experiment, com en l'anterior, no es va trobar cap paràmetre que ens pogués diferenciar d'alguna manera les possibles imatges d'apoptosi de les que són simplement trencaments causats per algun genotòxic que no arriba a causar apoptosi, però en els dos experiments es donarien dos pics en els valors de mesura del dany que ens indicarien la convivència al mateix temps de cèl·lules vives i moribundes, i que farien d'alguna manera que es veiés que el comet test és

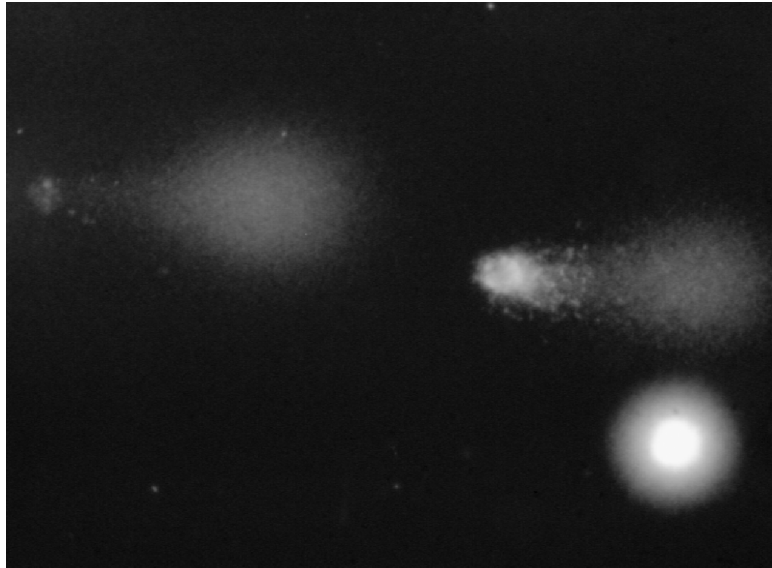
influenciable per l'estat cel·lular mesurant no tant sols dany degut a una mutació sinó també la possible fragmentació o altres alteracions que es produeixen durant la mort cel·lular programada o no.

En quan a la forma observada visualment (*by eye*): tampoc no es va poder trobar una forma concreta per a atribuir a aquestes imatges de possibles estadis d'apoptosi que detectaria el comet. Es va veure també un augment de nombre de formes amb cua de les tres hores a les nou hores. Però a diferència de l'experiment anterior (3.2.3), en aquest es va observar unes formes diferents (només de caps petits sols, sense cues, però el cap no tindria tota la quantitat de DNA esperable, se n'hauria perdut molta part; Fig.3.2.7), en els intervals més grans (9,15 i 24 h); aquestes formes no són massa explicables, són cèl·lules segurament molt danyades, tot i que no han perdut tot el DNA del nucli, no tenen cua, i potser serien identificatives d'alguna de les fases d'apoptosi. Aquestes imatges no van ser analitzades pel sistema informàtic, es van descartar i no es van comptar, ja que les comptaria com a cèl·lules senceres, sense dany, i no és així, llavors per això és important també fer un comptatge visualment i tenir-les en consideració. Però, el que sí es pot comentar, corresponguin o no realment a formes en apoptosi les anomenades per Olive et al.(1993), Fairbairn et al.(1996) i Nelms et al.(1997) entre d'altres, on hi ha un cap petit i una cua ampla tenyida intensament de forma difusa al centre de la cua (Fig.3.2.6); aquí es pot observar un augment del nombre d'imatges corresponents a aquesta descripció, i que es pot considerar en nombre superior que en experiments realitzats on les cèl·lules estan exposades a substàncies genotòxiques, en principi no inductores d'apoptosi.

S'ha de tenir amb compte, que els valors de mesura captats a través del sistema informàtic no són discriminatius, en el sentit que mesurem tot allò que sembla que són nuclis amb o sense cues, però quan es perd la cua, el sistema informàtic detectaria el cap com una forma on tot el % del DNA està al cap quan en realitat no és veritat, i és la dificultat trobada en aquest cas. Tant pel comptatge amb ordinador com amb els ulls, caldria una categoria més, degut a que en els intervals de 9,15 i 24 hores es van trobar moltes formes amb caps petits, sols, sense cua (Fig.3.2.7, tal com també trobaven Florent et al.1999). També es podia observar molta pols que deurién haver estat cues anteriorment. El comptatge va ser difícil per la poca quantitat de cèl·lules, ja que com les observacions amb les altres tècniques ens indicaven, la majoria de cèl·lules eren mortes ja, cosa que hauria provocat una degradació tal del DNA que faria que es perdés durant l'electroforesi, sent així impossible trobar una imatge de DNA compactat, i per això es veurién aquells núvols de pols i els caps petits sols, o aquelles imatges de caps petits i una llarga i ampla cua amb una concentració d'intensitat al centre de la cua. Cal també pensar que aquestes cèl·lules haurien estat induïdes a un tipus de mort particular, l'apoptosi, per una determinada substància a una concentració concreta en un tipus cel·lular específic; l'apoptosi és un procés complex, i pot tenir variacions segons els casos. Tot això podria fer que morissin d'una manera diferent i es degradés el DNA de manera diferent que en altres casos, (amb altres tipus cel·lulars exposats a altres substàncies), essent detectat o estant reflectit en aquestes imatges pel comet test, però s'ha de tenir en compte, que al final les fases d'apoptosi poden acabar amb una necrosi secundària.



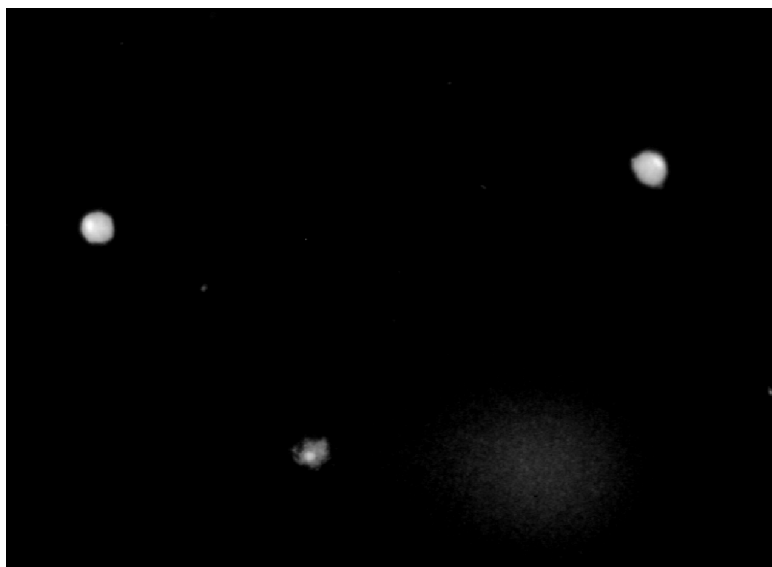
**Fig. 3.2.6.** Hep2 cells. 3% Etanol 96°. Interval 6 hores.



Cèl·lules Hep2 exposades a 3% etanol, a l'interval de les 6 hores. Imatge al microscopi de fluorescència, 200x. Tinció bromur d'etidi. Imatge digitalitzada, sistema anàlisi d'imatges, Lucia 4.51.

En aquesta imatge es pot observar una cèl·lula normal, a la part inferior dreta de la fotografia. A la part esquerra de la fotografia: una imatge considerada típica d'apoptosi (*hedgehogs*; tal com comenta Tice et al.2000), amb el cap petit, i la cua ampla i difuminada al centre. I a la part dreta superior, seria una imatge que es començaria a acostar a la que es consideraria apoptòtica (segons Olive et al.1993; Krown et al.1996; Fairbairn et al.1996; Nelms et al.1997, entre d'altres).

**Fig. 3.2.7.** Hep2 cells. 3%Etanol 96°. Interval: 24 hores.



Cèl·lula Hep2, exposada al 3% d'etanol, a l'interval de les 24 hores. Tinció amb bromur d'etidi. Imatge al microscopi de fluorescència. 200x. Fotografia digital, a partir del sistema d'anàlisi d'imatges Lucia 4.51.

En aquesta fotografia es poden veure els caps petits sense cues, i una imatge de les comentades com a típiques d'apoptosi per varis autors, en un estadi avançat ja de pèrdua de cua i fluorescència.

En aquestes mostres a 24 hores, ja no hi havia quasi cèl·lules, degut a que moltes haurien mort, i es veien molts d'aquests caps petits sense cues.

Godard et al.(1999), estableix unes categories visuals utilitzant el comet test per a quantificar apoptosi, que es basava en considerar cèl·lules no danyades (UC), cèl·lules danyades (DC), cèl·lules altament danyades (HDC), que es correspondrien amb aquestes que tenen el cap petit i la cua ampla considerant-les com a apoptòtiques. Florent et al.(1999), hi va afegir una altra categoria anomenada fragments petits (SF), que serien justament aquestes imatges de caps sense cues (ja vistos per Godard et al.1997, els va semblar que representarien uns últims passos de l'apoptosi detectada pel SCGE), que considerava junt amb les HDC com a estadis d'apoptosi. Els dos autors van trobar una relació amb l'augment de cèl·lules en apoptosi i aquestes imatges HDC i SF, comparat amb el que trobaven per altres tècniques, però indicaven que es perdrien les formes d'estadis avançats d'apoptosi (on no es veien HDC ja) i que els resultats del comet test en comparació amb les altres tècniques de tinció i citometria de flux s'avançarien i coincidirien en estadis inicials de l'apoptosi, i no en els finals perquè justament es perdrien els fragments i no serien detectats. Per això Godard et al.(1999), en la comparació amb la tècnica normal del test amb la modificació d'aquest (que anomenen en aquest cas, *Halo Assay*, en que es realitza tot igualment sense l'electroforesi, i així no es perdrien aquests petits fragments en l'electroforesi, sinó que farien augmentar l'halo al voltant del nucli, o del que en quedaria) troba una millor detecció per aquesta modificació. S'ha establert aquest comet test modificat per a una millor detecció de l'apoptosi que el comet test. Així aquests dos investigadors (Godard i Florent) també utilitzarien el comet test no modificat per a quantificar apoptosi, però amb certes reserves també. Consideren que el comet test detectaria aviat les cèl·lules en apoptosi, i seria un sistema adequat, però indiquen que en teixits presentaria una sèrie de problemes al haver de dissociar el teixit, com la pèrdua dels fragments o d'aquestes cèl·lules i llavors no seria gaire idoni per quantificar la fracció apoptòtica, però, seria un sistema ràpid i sensible per a veure el nivell d'alteracions al DNA que resulten de la mort per apoptosi, i que es podria utilitzar en paral·lel amb altres tècniques.

**◆3.2.5. Hep2- Exposició a Tween20-Necrosi**

Aquest cop es va repetir la prova amb Hep2 exposades a una substància inductora de necrosi, Tween 20 a una concentració de 1.28mg/ml. Es va realitzar:

- **3.2.5.a.** Observació visual de la morfologia de les cèl·lules en la placa, per a poder quantificar primerament l'estat de les cèl·lules.
- **3.2.5.b.** Quantificació de la viabilitat cel·lular i l'índex d'apoptosi amb la tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi.
- **3.2.5.c.** Comptatge amb el comet test i observació de les imatges visualment.

Va haver algun problema amb el creixement de les cèl·lules, cosa que va fer no considerar massa l'experiment, tot i això, es va voler utilitzar per a poder veure com es veien les cèl·lules mortes per necrosi i intentar diferenciar entre els paràmetres de mesura del comet i l'observació de les imatges, si es podia trobar alguna diferència amb les obtingudes en l'apartat anterior (3.2.4) on la mort cel·lular era causada pràcticament tota per apoptosi.

**3.2.5.a.**

En l'observació de la morfologia de les cèl·lules es va poder veure algun error en el procediment, sigui per algun problema de les cèl·lules, o en la interacció del medi (DMEM) amb la substància utilitzada per a induir la necrosi (Tween20), o a algun altre factor, que van portar a causar falsos resultats. Van fer que s'observés la majoria de cèl·lules mortes ja a les 3 hores, mentre que en les plaques preparades un dia anterior a l'interval de 15 hores, també la majoria de cèl·lules eren mortes, diverses en apoptosi, i moltes en necrosi, però no tantes com en el cas de les 3 hores. Per tant és evident algun problema en l'experiment.

Així per aquest comptatge es veien les cèl·lules pràcticament totes mortes en tots els intervals.

S'ha de tenir en compte, que en experiments anteriors, i posteriors a aquest, a l'exposar el mateix tipus cel·lular a igual concentració d'aquesta substància que en el nostre cas, es va veure una reacció diferent de les cèl·lules, aconseguint-se un dany més o menys evident a partir de les 24 hores. Després de les 24 hores, moltes de les cèl·lules estaven morint-se i en estadis finals de mort, hi havia un 20% de cèl·lules afectades, i el 80% perjudicades però no mortes morfològicament (no estaven arrodonides o destruïdes, més del 80% mantenia la seva forma irregular); així doncs, ens indica que alguna cosa va anar malament en aquesta prova.

En aquests experiments que he comentat les *Hep2 cells* tractades amb Tween20 desenvolupaven vacuoles, que incrementaven amb el temps.

---

## 3.2.5.b. i 3.2.5.c

Comparació dels resultats obtinguts pel Comet Test i la tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi:

**Taula 3.2.5.** *Hep2 cells* tractades amb 1,28mg/ml de Tween20.

Tween20	%Tail	SSB	Tail L.	TM	IC	% EA	% LA	% A	% N	% Live
C 9h	10.16	0.426	19.10	9.01	15.00	7.70	0.71	7.41	10.63	81.91
C 15h	21.54	0.904	42.89	25.80	29.50	22.70*	4.34*	27.04*	4.83*	68.11*
3h	35.53	1.492	64.02	41.33	50.50	5.52	1.50	7.02	64.32	28.60
6h	43.34	1.820	75.94	50.62	58.00	2.43	1.21	3.64	89.83	6.50
9h	76.33	3.206	121.43	99.17	91.25	0	2.80	2.80	96.72	0.46
15h	68.04	2.858	106.81	88.35	72.25					
24h	72.67	3.052	124.84	102.76	80.50					

(\*Els valors marcats de la taula de C15h, s'han d'interpretar amb precaució, van haver errors al comptatge).

Comentari sobre el problema detectat en aquest experiment:

Com ja he fet referència anteriorment, podíem notar una dificultat en el desenvolupament del cultiu, un problema de mortalitat elevada en aquest experiment per a totes les plaques en relació a altres experiments realitzats en el mateix tipus cel·lular tractats amb igual concentració de Tween20 que aquest cas; a més, es va veure un major nombre de cèl·lules mortes en els intervals de 3,6,9h, que als darrers 15 i 24h (sembrats el dia anterior que les plaques a 3,6,9,h) en l'observació de les plaques, i també en l'observació de formes de comet. Això ens va fer pensar en algun problema afegit en els cultius que van provocar una mort molt ràpida de les cèl·lules en aquests primers intervals pel que s'esperaria, i que per tant no faria vàlid del tot l'experiment, (les dosis van ser les mateixes per a totes les plaques, el medi, tot). Es podia veure, però, que la majoria de morts eren per necrosi (%N), (a la taula que hi ha molt poques apoptosi, %A), així, d'alguna manera ens podria servir pel nostre propòsit de veure les imatges en necrosi, i comparar-les amb les imatges obtingudes per una substància que indueix apoptosi, tenint en compte que aquest experiment s'ha d'interpretar amb cura degut a aquesta dificultat en el cultiu. No va ser gaire correcte posar les plaques en dies diferents, s'haurien d'haver posat totes al mateix dia per a seguir l'interval de temps fins a les 24 hores, tot i això sempre hi pot haver algun problema i no sortir el que s'esperaria amb el transcurs del temps. Per a mirar els resultats, es descarten llavors els intervals de les 15 i 24 hores, no sols perquè en aquests intervals, si mirem la taula 3.2.5, ja hauria d'estar tot mort si haguessin seguit la línia de comportament de les plaques dels intervals anteriors, ja que a les 9 hores totes les cèl·lules estan pràcticament mortes, sinó també pel fet que en aquest cas, per als intervals de les 15 i 24 hores, mostren uns valors de %Tail, %SSB, IC una mica menors que als inferiors, i tot i que es podrien considerar més que valors menors, similars, no serien detectables més formes de comet o més fragmentacions per la gran mortalitat que hi hauria a partir de les 9 hores on quasi bé tot seria mort. O també es podria considerar que haurien pogut sortir una mica menors per la menor detecció pel sistema d'anàlisi d'imatge, degut al major nombre de les figures de pols, amb molta fragmentació de DNA que no

es veurien o s'haurien perdut; pel sistema de comptatge visual del SCGE, potser s'hauria de poder detectar alguna imatge més, però no si es perden; així es podrien explicar aquests valors més petits dels paràmetres de mesura pel comet en aquest interval de temps que pels anteriors, però en aquest cas, tot i que és vàlida aquesta argumentació, i que segurament també hi intervé aquest factor, s'ha d'afegir el fet que es va veure amb l'observació directe de les plaques al microscopi, un major nombre de cèl·lules mortes en els intervals de 3,6,9 hores que en aquests de 15,24h., quan hauria de ser al revés, així doncs és millor descartar-los ja que potser va haver algun error en la dosi, o alguna altra cosa com ja he comentat anteriorment. Tota la prova, s'ha de considerar amb una certa cura.

Així doncs, malgrat la problemàtica en aquest experiment, detectada prèviament amb l'observació de les cèl·lules en les plaques, es va seguir l'experiment, per a intentar establir alguna relació diferencial entre les imatges necròtiques que observariem i les imatges de l'apartat anterior on la majoria de morts eren causades per apoptosi, considerant però, el problema que hi havia hagut en l'experiment.

D'aquesta manera, malgrat tot, a partir del que es va obtenir (Taula 3.2.5), es pot observar una quantitat de %DNA a la cua (igualmente com per als altres paràmetres de mesura del comet test) superior que el control i en valors creixents des de l'interval de 3 fins a les 9 hores, que es correspondrien amb un augment també del percentatge de necrosi (%N). Segurament doncs, es detectaria algun dels estadis de la fragmentació del DNA (per la desintegració del nucli) que es pugui donar durant la mort per necrosi, que faria que no es perdessin els fragments del tot en l'electroforesi i es pogués observar les imatges de cometa.

Aquí però, cal un cop més afegir la dificultat de les mesures i la realització de comptatges, degut al nombre baix de nuclis visibles en les preparacions per al comet test. Segurament es perdria tot o gran part del DNA de moltes cèl·lules (a causa de la gran fragmentació o disgregació de DNA del gran nombre de cèl·lules en estat molt degradat) durant el procediment del comet test (preparació de les mostres, durant l'electroforesi, etc..), quedant en forma de pols no detectable o simplement no hi hauria res, cosa que faria que no s'observés cap imatge per aquesta tècnica.

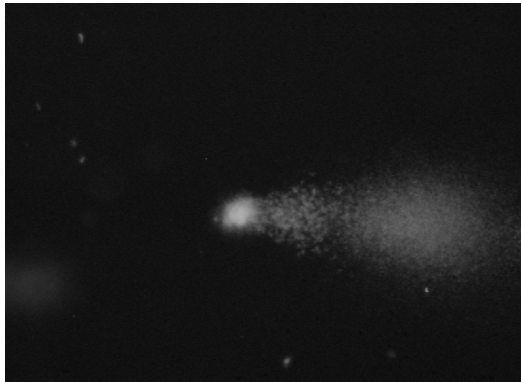
Mitjançant l'observació visual de les imatges dels comets, es va poder apreciar cometes amb cap i cua evidents en els temps 15 i 24, i altres amb cues llargues i molta pols, inclús fins a caps petits sols, similars als trobats per l'etanol a les últimes hores. Les cèl·lules en aquests intervals de temps, però, estaven una mica millor que les de temps inferiors, (no cal recordar el problema que es va tenir en la prova, on en les plaques a temps 3,6,9h. que van ser preparades un dia més tard que les de 15 i 24h, va haver una mortalitat molt ràpida respecte al que s'esperava, tot i que podríem considerar també que als intervals 15 i 24 la mortalitat va ser diferent a l'esperable, i que pels dos casos va ser més elevada del que havia de ser per comparació amb altres proves). Pels intervals de 3,6,9 hores, es pot observar cada cop més cues i pols en els temps més llunyans fins el punt en que a les 9 hores costava molt comptar cèl·lules degut a la seva manca (es deurien haver desintegrat durant el procés del comet test ja que deurien estar completament mortes i trencades). No es va poder veure cap diferència a simple vista de les

---

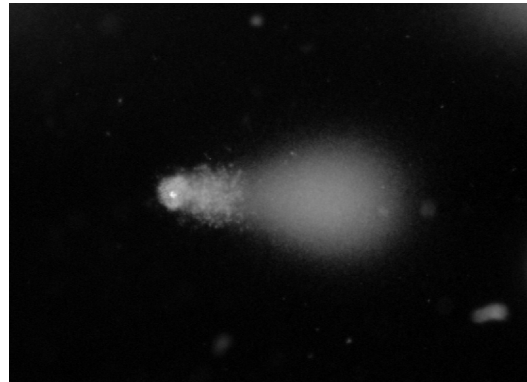
imatges per diferenciar apoptosi de necrosi, en algun moment va semblar una aparença diferent, en quan al fet, que aquí trobàvem, entre el gran nombre de cometes que es veien, el que podríem anomenar una forma intermèdia entre un cap més o menys petit i cua llarga, i la de cap petit amb cua ampla i difuminada al centre (considerada com a apoptòtica per diversos autors), una forma que tenia com una mena de coll abans de la cua difuminada (veure Fig.3.2.9), i que a simple vista, ens va semblar que n'hi havia moltes en proporció amb el que havíem vist en les mostres amb etanol (en les que no recordàvem haver-ne vist), però en realitat no era així. També ens havia semblat que en aquestes no trobàvem tantes formes de caps sols, sinó més aviat no trobàvem ja nuclis, passàvem més de veure formes amb cues a no res, ni que tampoc vèiem tantes formes descrites com les típiques per apoptosi (*hedgehogs*), però tampoc, era molt subjectiu, hauria calgut fer un comptatge més acurat de totes aquestes formes pels dos experiments. Així en aquest cas, hi havia formes de tot tipus, a les que anteriorment vaig anomenar **a, b, c, d, e** (capítol 1, apartat 1.1.b; Fig.1.1.2), i les que consideren alguns autors com les d'apoptosi, i també cues sense caps i caps sols, i les formes rares ja descrites. No seria estrany tampoc trobar algunes d'aquestes imatges de *hedgehog* (o *ghost cell*, segons Choucroun et al.,2001) si es consideren com a les representatives o indicadores de cèl·lules en apoptosi, ja que també hi hauria algunes morts per apoptosi (tal com es pot veure a la taula 3.2.5) encara que poques, i segurament acabarien en necrosi. Tal com descriu les formes de necrosi, amb un cap petit i una llarga cua (Tice et al.2000), sí és difícil de diferenciar d'altres imatges de dany al DNA causat per una substància genotòxica. Tampoc no es va poder trobar cap diferència entre els paràmetres de mesura del SCGE que ens poguessin diferenciar els dos tipus de formes de mort cel·lular.

Així doncs, quan es va voler fer una observació de les imatges del comet (*by eye*), i dels paràmetres de mesura pel sistema d'anàlisi d'imatges, per poder intentar establir alguna diferència entre les imatges i paràmetres de les formes de cometa obtingudes en les cèl·lules exposades a una substància inductora d'apoptosi, amb les obtingudes en les cèl·lules exposades a un agent inductor de necrosi, per poder veure si es podia trobar alguna forma o paràmetre diferencial que pogués diferenciar i caracteritzar les cèl·lules en un i altre estat de mort cel·lular, es va trobar que no es podia obtenir cap paràmetre que les diferenciés, ni es va trobar cap imatge concreta que es pogués establir de forma clara, tot i que a nivell general va semblar veure uns trets diferencials entre les imatges en els dos casos, cosa que no es pot considerar massa fiable degut a la subjectivitat que comportava, i a la manca de comprovacions. Es va intentar també veure si es podien diferenciar d'alguna manera amb les formes obtingudes quan hi ha una exposició a un agent genotòxic (obtinguts en diversos estudis anteriors), però no es va poder establir cap mena de diferència amb les imatges, sols serien de proporcions dels diversos tipus de formes observades, més que obtenir una imatge més concreta per a cada cas; evidentment, ja que hi hauria diferents estadis i no es podria caracteritzar una sola forma per diferenciar-les. De tota manera les substàncies genotòxiques estudiades no causarien tan ràpidament ni acusadament una apoptosi o necrosi en els intervals en que es mesuren aquestes, i llavors no s'obtidrien tampoc imatges tan dràstiques com les de caps petits sols que han perdut la majoria de DNA i ja no es veu la cua.

**Fig.3.2.8.**Cèl·lula Hep2 exposada a Tween20. Interval: 6h.



**Fig.3.2.9.**Cèl·lula Hep2 exposada a Tween20. Interval : 24h.

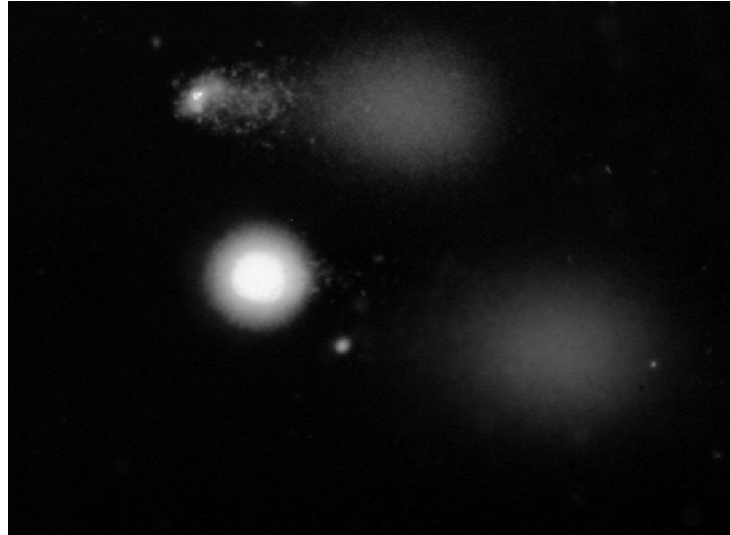


Aquestes dues imatges estan recollides pel microscopi de fluorescència a 200x. Tinció amb bromur d'etidi. Fotografia digital del sistema d'anàlisi d'imatges Lucia 4.51.

En la imatge 3.2.8, es pot veure un cometa típic, començant a tenir una cua més ampla i difuminada.

En la imatge 3.2.9, es veu el que ja considerarien forma apoptòtica per alguns autors, tot i que es pot trobar alguna diferència amb la mostrada a la figura 3.2.6, aquí tindriem encara el nucli bastant evident, i una cua ampla i amb una tinció difosa cap el centre de la mateixa, però amb una part de cua més marcada i no tant difosa, com si tingués una mena de "coll". En aquest cas de l'exposició a Tween20, es van trobar diverses d'aquestes formes (en major abundància que pel cas de l'etanol, on la majoria de cèl·lules amb aquesta forma no tenien aquest coll, eren més com la Fig.3.2.7 i la forma situada més superiorment a la foto de la Fig.3.2.6), que podríem considerar intermitges, (entre les que serien cometes típics, formes **d** per exemple (Fig.1.1.2, capítol 1), i aquestes a les que consideren apoptòtiques), ja que encara hi ha bastant cap i cua, però aquesta ja és també ampla i difusa al final.

**Fig.3.2.10.** *Hep2 cells*. A les 24 h de l'exposició a Tween20.



Aquesta imatge també està presa a partir del sistema d'anàlisi d'imatges Lucia 4.51, a partir del microscopi de fluorescència a 200x. Tinció bromur d'etidi.

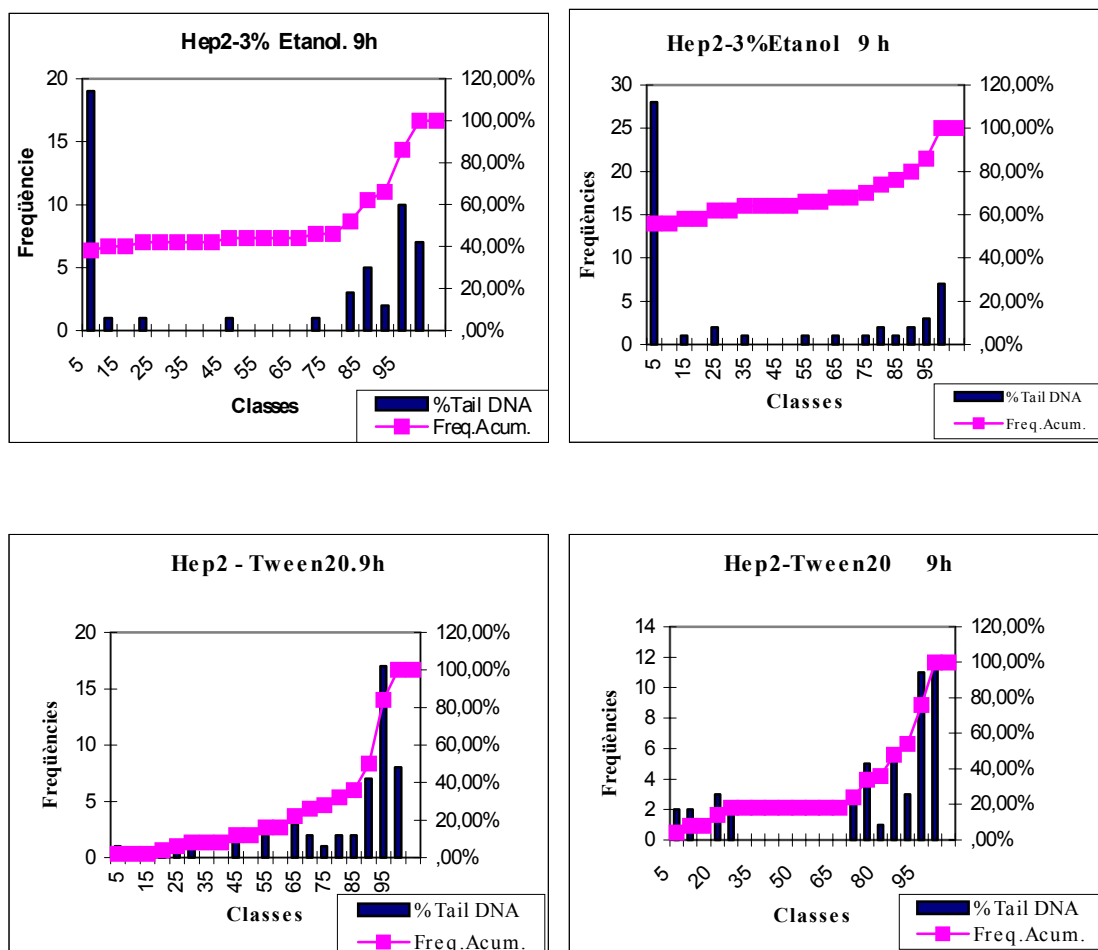
Es pot observar tres formes de cometa. La situada més superiorment a la fotografia, seria un d'aquests principis de la considerada forma d'apoptosi, però no del tot, sinó en aquest terme que he considerat d'intermedi, degut a que té com una mena de coll que seria una cua no tan difusa al principi. Al mig de la fotografia es pot veure una cèl·lula que no està danyada, o poc, ja que es veu algun petit fragment e cua que se'n desprèn. La imatge situada més inferiorment i a la dreta de la fotografia, seria ja un altre d'aquests estadis considerats com a cèl·lula no viva (i en apoptosi, per alguns autors), on hi ha un cap molt i molt petit, i quasi tot és cua, però no una cua llarga i escampada, sinó una cua ampla i difosa del centre.

Tot i que jo n'he dit d'alguna manera forma intermèdia a aquesta imatge una mica diferent de la típica forma d'apoptosi, suposo que entraria dins el rang de formes que aquests mateixos autors considerarien com a apoptòtiques. Cosa que en aquest cas, seria discutible, ja que el que detectem bàsicament són necrosi. Altres autors en canvi, ho anomenen més generalment com a formes no vives.



Però, si comparem de forma general, amb l'experiment anterior en la inducció a apoptosi per etanol, i fem els histogrames per la quantitat de DNA a la cua (%Tail DNA), podem veure:

**Fig.3.2.11.** Comparació d'histogrames a les 9 hores obtinguts per cèl·lules Hep2 exposades a 3% d'etanol per induir apoptosi i exposades a Tween 20 per causar necrosi:

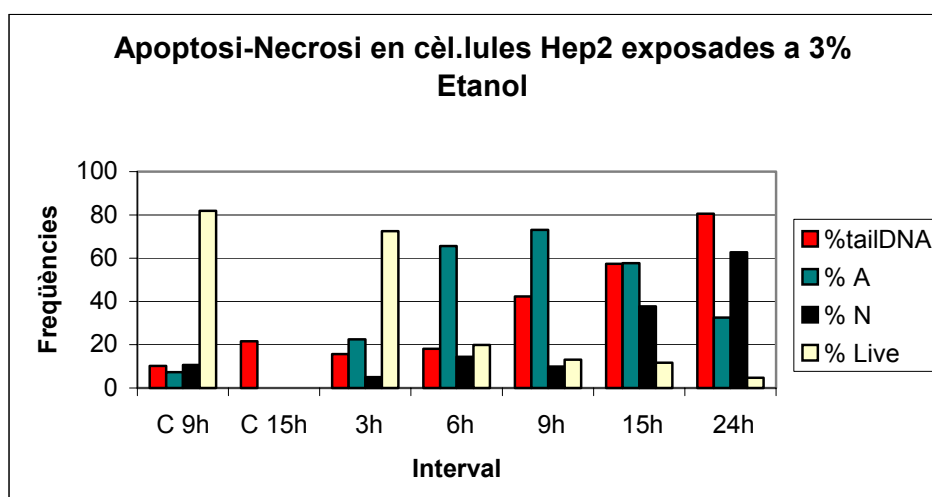


Es pot observar que en el cas de les cèl·lules exposades en Tween20, inductor de necrosi, hi ha una tendència cap a dreta de l'histograma que correspon a les categories o classes dels valors elevats de dany cel·lular, això coincideix en que en aquest interval de temps la majoria de cèl·lules estaven en necrosi i llavors es pot detectar una quantitat de dany o fragmentació del DNA amb el comet test que donaria aquests valors degut a la degradació de les cèl·lules en aquest interval de temps. En intervals anteriors, com a les 3 i 6 hores (histogrames no mostrats) es veuria també dos pics, en les cèl·lules sense dany i en les molt danyades, però amb varis estadis intermedis de les diferents categories o classes de dany al DNA (%Tail DNA). Mentre que en el cas de les cèl·lules exposades a Etanol al 3% que hauria induït apoptosi s'observa en aquest interval el que ja ha estat comentat en l'apartat 3.2.3 (Fig.3.2.1; 3.2.2), on s'observarien els dos pics diferenciats, que indicarien dos estats de les cèl·lules, unes bé i vives (el pic estaria en la

categoria de poc percentatge de DNA a la cua) i les altres danyades possiblement detectant la fragmentació que es dona deguda a algun dels estats d'apoptosi (on hi hauria el segon pic elevat en les categories o classes que corresponen a l'alt percentatge de DNA a la cua), però, amb un menor, o molt petit, nombre d'estadis intermedis de dany al DNA a diferència del que es troba en les mostres en que s'indueix la necrosi. En intervals més avançats en l'exposició a l'etanol, com el de 24 hores (no mostrats), es podria observar ja sols un pic a la dreta de l'histograma que correspondria a la majoria de categories de valor elevat de percentatge de DNA a la cua, que es deuria a la degradació de les cèl·lules, ja que en aquest interval la majoria són mortes, però es veuria fins un punt, el que fos detectable pel comet test, ja que arriba un moment que es perden els fragments degut a l'elevada desintegració del material genètic i en l'electroforesi s'escampa com a pols.

Si comparem els resultats dels dos experiments en forma de gràfics per a intentar establir alguna diferència entre els paràmetres en quan als que s'obren en una població cel·lular exposada a una substància inductora d'apoptosi a una que produeix necrosi:

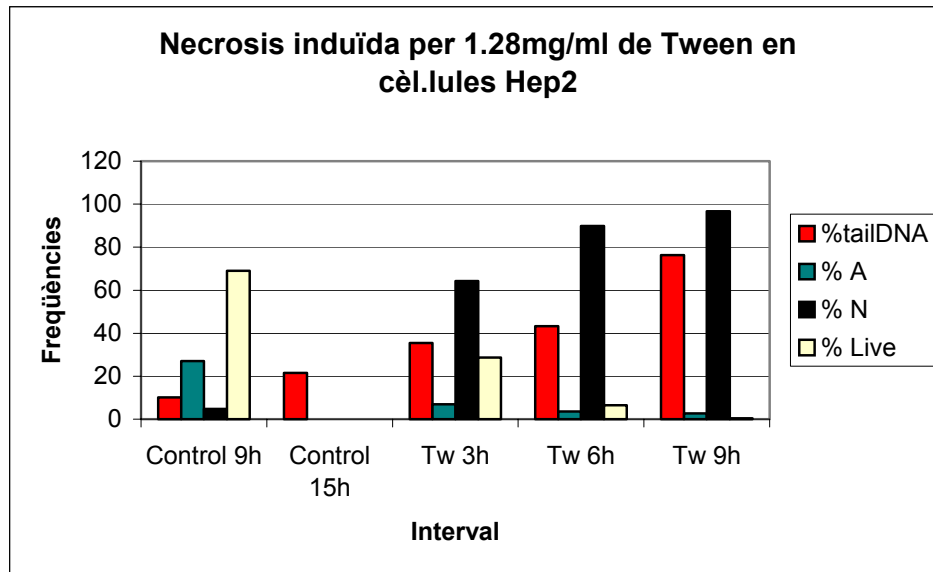
**Fig.3.2.12.**Valors obtinguts per necrosi i apoptosi, per indicar que s'insinua una tendència diferent:



S'observen uns valors d'apoptosi que van augmentant amb el temps, com era d'esperar, i un augment del percentatge de DNA a la cua del cometa, que continua augmentant a les 24 hores tot i la disminució de l'apoptosi, ja que també augmenta la necrosi, i així hi hauria variats estats de possible fragmentació del DNA que es detectarien amb el comet test deguts als dos diferents tipus de mort cel·lular, sense haver pogut diferenciar en aquest cas per quin dels dos, i tenint en compte que molts valors es perden degut a que els fragments s'escamparien tant durant l'electroforesi que no es podrien observar les imatges de cometa.

Si s'hagués separat en valors d'apoptosi avançada (LA) amb la fase més inicial (EA), es donaria que a les 6 i 9 hores la que predomina és EA, i si hi ha una relació entre el valor de dany mesurat amb el comet test i la fase d'apoptosi, ens indicaria que detecta ja els primers estadis de l'apoptosi, on es produeix ja una fragmentació del DNA i del nucli, sense canvis encara en la membrana. (Olive et al.,1993; Schwarts & Osborne,1995; Fairbairn et al. 1996)

**Fig.3.2.13.** Gràfic per a la necrosi induïda per Tween 20 en cèl·lules Hep2.



Es pot veure de seguida un increment de les formes necròtiques, com era d'esperar degut a la inducció per aquest agent, i es veu també un augment del valor percentatge de DNA a la cua, i per tant de dany o trencament al DNA, que es podria atribuir a la fragmentació que es dona a les fases últimes de la necrosi.

D'aquesta manera hem vist un augment del % Tail DNA, com també d'altres paràmetres del comet,(incloent l'IC realitzat pel comptatge visual), en relació a l'augment tant del nombre d'apoptosis en un cas, com pel nombre de necrosi per l'altre. Així es podria veure una certa influència en els resultats del Comet test degut a aquests tipus de mort cel·lular. Que es puguin diferenciar aquests dos tipus de mort pels resultats obtinguts, i diferenciar-los del dany causat per una substància genotòxica a partir de diferències en els paràmetres o en les formes de les imatges dels comets, queda encara discutible i no és gaire clar, com ja he comentat anteriorment, encara hi ha discussió entre els diferents autors sobre aquest tema, i també en quan a atribuir certes imatges als diferents tipus i estadis de mort cel·lular.

Els trencaments al DNA que pot detectar el comet test poden provenir de cèl·lules en apoptosi també, ja que el començament de la fragmentació apoptòtica podria aparèixer com a comets (Olive et al.1993; Roser et al.2001 entre d'altres), i com he comentat, alguns autors utilitzen aquesta tècnica per a la seva mesura. Olive et al.(1993) indiquen però, en quan a utilitzar aquesta tècnica per a la detecció d'apoptosi, que és important posar èmfasi en la detecció de les fases inicials de l'apotosi (segons Godard et al.1999 serien les fases que es detectarien),

perquè en les més tardanes, és més problemàtic degut a que la membrana es torna permeable, com en la necrosi, (Fairbairn et al.1995), a més de tenir en compte que l'apoptosi pot acabar en necrosi. D'altra banda, l'ús de la tècnica *in vivo* per a la detecció d'aquestes formes, seria més complicada ja que com també he comentat anteriorment, hi ha una fagocitosi per part de les cèl·lules adjacents i els macròfags que fan desaparèixer més ràpidament les cèl·lules en aquest estadi (Fairbairn et al.1995). Així doncs, en cas que les formes de mort cel·lular per apoptosi causin un artefacte o interferència en la interpretació dels resultats per al comet test, aquest podria ser menor en mostres *in vivo*, depenent de la fase en que es pugui afectar o interferir, ja que pels nostres resultats no quedava massa clar si influiria més la fase EA que la LA. (Per Choucroun et al.2001, en els estadis inicials de l'apoptosi no hi ha *ghost cells* - formes atribuïdes a l'apoptosi per varis autors, o a cèl·lules no viables sense especificar, per altres - aquestes apareixen més tard, essent més probablement imatges de mort, i llavors no distingiria les imatges d'inici d'apoptosi amb les de genotoxicitat, no es tractaria doncs, sols de treure aquestes imatges de *ghost* per evitar la possible interferència de l'apoptosi en els resultats del comet). Així hi ha varis autors que indiquen aquesta interferència de les apoptosis en els resultats del comet (com aquest comentat, Choucroun et al.2001), mentre altres consideren que no (Roser et al.2001), per citar alguns exemples. Cal però tenir en compte, diverses consideracions com el fet que la cinètica dels esdeveniments pot no ser igual en diferents tipus cel·lulars, per diferents substàncies i diferents concentracions, fent difícil a vegades comparar els casos concrets, com el nostre per a un determinat tipus de cèl·lula i condicions, induïda en apoptosi per a una substància concreta, en que ens semblaria trobar una relació entre les formes d'apoptosi i els resultats del comet test, amb altres experiments. Sobretot quan l'apoptosi és un procés complicat i es pot donar de maneres diferents per a diferents cèl·lules, substàncies i dosi, fent que es poguessin obtenir formes diferents d'aquestes obtingudes en les fases EA, LA del nostre experiment.

Hagués estat molt bé poder repetir els experiments. S'havia pensat en la utilització d'altres substàncies, línies cel·lulars diferents, i diverses tècniques per a la mesura de la fragmentació de DNA en fase d'apoptosi i necrosi com seria l'escala de DNA (*DNA ladder*), entre d'altres, encara que per a fer l'escala per electroforesi del DNA caldria canviar de línia cel·lular, ja que el patró d'apoptosi obtingut per aquesta tècnica en les Hep2 no segueix l'estàndard normal (Rudolf et al. 2000a).

Així aquestes proves presentades, van ser només unes primeres proves d'un seguit d'experiments que s'estan duent a terme.

#### .Conclusions:

1. Pels resultats obtinguts, es podria veure una relació entre l'augment de formes en apoptosi i l'increment del valor dels paràmetres de mesura pel comet, indicant-nos d'alguna manera, la detecció per part del SCGE de la fragmentació o dany al DNA que es donaria en aquestes fases, existint doncs, la possibilitat d'una influència sobre els resultats del comet test. No s'ha pogut establir però, una relació amb una imatge concreta de comet i les cèl·lules en apoptosi.

2. Es podia observar també un increment del valor dels paràmetres de mesura del comet test seguint l'augment de cèl·lules en necrosi, indicant d'alguna manera també, la possibilitat de la tècnica de ser afectada per la mesura de la fragmentació o dany que es pugui donar en aquest tipus de mort cel·lular.
3. No es va poder trobar cap paràmetre dels utilitzats per a mesurar el dany al DNA pel Comet test, que pogués diferenciar entre les imatges d'apoptosi i necrosi, ni que pogués diferenciar aquestes imatges d'apoptosi causada per una substància citotòxica, de les que produeix una substància genotòxica. Així com tampoc es va trobar una imatge determinada de cometa que les pogués diferenciar.

### ◆3.2.6. Inducció d'Apoptosi per Etoposide.

L'etoposide, és un derivat semisintètic de les podofilotoxines, que s'extreuen de l'arrel de la mandràgora (*Podophyllum peltatum*). Causa un bloqueig en la fase S-G2 del cicle cel·lular, inhibeix la Topoisomerasa II, i causa dany al DNA degut a que es forma un complex ternari entre el DNA, l'enzim i el fàrmac (causaria SSB, DSB i DNA-Protein cross-links, Mckelvey et al.,1993). S'utilitza per al tractament de varies formes de càncer, però causa toxicitat als sistemes hematopoiètic i limfoide. S'està estudiant la seva activitat actualment en tractaments del càncer tot i que està autoritzat en alguns països el seu ús clínic (Salmon & Sartorelli,1999). Degut a la seva activitat bloquejant la Topoisomerasa II durant l'escissió del DNA (durant la reparació i replicació d'aquest), i a la seva activitat danyant el DNA, es pot considerar genotòxic, (en general, tots els anticancerígens són cancerígens). Produeix doncs dany al DNA, és genotòxic i al mateix temps indueix apoptosi (un exemple d'estudi de la inducció d'apoptosi per aquesta substància, Rudolf et al.2000b). El *Comet Assay* ja ha estat utilitzat per a determinar els efectes de l'etoposide *in vitro* en varis tipus cel·lulars (veure les referències a Rojas et al.2001), com també *in vivo* (Turner et al.2001).

Per la prova en cèl·lules Hep2 exposades a etoposide a concentracions de 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 µg/ml, a un interval de 3 hores, es va observar :

**Taula 3.2.6:** Comet test en cèl·lules Hep2 exposades a etoposide a diferents concentracions:

Dosi	%Tail DNA	%SSB	Tail Length	Tail Moment
Control	8.58	0.36036	20.87	5.11
2.5µg/ml	68.92	2.89464	61.87	44.97
5µg/ml	82.2	3.4524	76.49	64.48
10µg/ml	86.78	3.64476	87.02	75.97
20µg/ml	84.13	3.53346	81.35	69.17
40µg/ml	89.09	3.74178	90.21	80.81
80µg/ml	88.98	3.73716	83.49	74.55

Si féssim un histograma amb les categories de dany en aquest cas s'obtindria que tot està desplaçat a les categories superiors al 75% de DNA a la cua (es considera que un valor major al

70% de DNA a la cua, és molt danyat), sense haver dos pics com trobàvem en els casos d'inducció a apoptosi per etanol. En canvi al control tot estaria desplaçat a valors inferiors al 5% de dany. Distingint un cop més el pic de molt dany que havíem vist anteriorment, i que es podria relacionar amb apoptosi. De tota manera, cal dir que en aquest cas són concentracions molt elevades.

En les observacions de les imatges dels cometes, no es van veure elevades pèrdues de DNA, ni figures de caps sols petits sense cua, com es va observar en els casos de l'etanol, i Tween20, aquí la distribució del dany és més homogènia. En aquest cas, però, estem en un interval de temps molt curt, 3 hores només, i hem pogut notar un dany elevat en les cèl·lules. En intervals més avançats potser es podria trobar formes com les que vam observar en el cas de l'apoptosi induïda per etanol, o de la necrosi provocada pel Tween20, on hi havia caps sols, remanents i petits, on la cua s'havia perdut totalment, segurament degut a la desintegració d'aquestes formes de comet a l'estar molt desfets ja els nuclis (Godard et al., 1997, trobarien també aquestes formes a les 48 h. de l'exposició d'etoposide a cèl·lules d'ovari de hamster xinès, CHO). De tota manera, cal recordar que l'etanol produiria apoptosi essent no genotòxic, mentre que l'etoposide és genotòxic degut a que inhibeix l'acció de la Topoisomerasa II, (bloqueja el complex DNA-Topoisomerasa II), en el moment en que la Topo II introdueix el trencament de cadena doble, (i forma un complex impeding la re-lligació de trencaments de cadena del DNA). L'etoposide actua principalment durant la fase S quan el DNA s'està replicant, també pot actuar durant la profase mitòtica en la condensació cromosòmica, dos estadis en els que s'utilitza la Topoisomerasa II, per a desenrotllar les cadenes inicials durant la replicació, i per a la reparació dels cromosomes replicats, respectivament (Turner et al. 2001). És conegut que pot causar delecions i translocacions als cromosomes, entre d'altres, que poden conduir a una mort cel·lular o a una possible modificació de la proliferació o diferenciació (Turner et al. 2001). L'etoposide, interferiria en la reparació també, i podria causar indirectament, d'alguna forma, apoptosi per acumulació del dany endògen i exògen no reparat. D'aquesta manera, caldria tenir en compte la interpretació del comet test, ja que hi pot haver un factor de dany i/o reparació que sigui detectat pel SCGE, a més de la possibilitat de la detecció d'apoptosis.

El que sí es pot dir és que a aquestes concentracions, l'etoposide causa grans quantitats de dany, essent ja molt elevat en la concentració de 2,5 µg/ml i es manté quasi constant fins a 80 µg/ml, això pot ser degut a la presència d'un nombre constant de molècules de Topoisomerasa II per cèl·lula. Es podria pensar en que es pot augmentar la concentració de l'etoposide però es pot induir un nombre limitat de trencaments de doble cadena, que no pot ser més alt que el nombre de molècules de Topoisomerasa II. Les formes dels cometes van ser molt similars, no gaire variabilitat, així la distribució del dany és homogeni, cosa que també pot ser deguda al nombre constant de molècules de Topoisomerasa II per cèl·lula.

Hauria estat molt útil poder tenyir les cèl·lules en aquest cas, per a determinar la quantitat de cèl·lules en apoptosi (poder quantificar quantes EA, LA) i necrosi i establir si hi ha una relació entre aquestes i els valors del comet test. S'obtenen però sols els valors per a la concentració de 10 µg/ml, ( a les 3 hores), són de :

Cèl·lules :	- Vives:	96.8 %
	- Apoptosi:	2.8 %
	- Necrosi:	0.03 %

Així ens indicaria que l'interval de temps potser hauria estat massa curt perquè no es detecten moltes apoptosis encara amb aquest sistema de tinció, (també ho podríem relacionar amb les imatges obtingudes per video en un experiment similar a aquesta concentració d'etoposide en cèl·lules Hep2, Rudolf et al.2000b; on les cèl·lules començaven a arrodonir-se i a formar pseudopodis entre les 2 i 6 hores després del tractament, i començaven a donar-se les contraccions rítmiques violentes de la membrana citoplasmàtica, el *membrane blebbing*, anomenat també, "*dance of death*", entre les 8 i 16 hores, i a les 24 ja estaven immòbils). Això no voldria dir, però, que no haguessin pogut començar ja d'alguna manera les alteracions provocades per l'apoptosi - no essent detectades per aquest sistema de tinció encara, ja que és un procés molt complex aquest tipus de mort cel·lular - i que pogués tenir alguna relació amb les observacions amb el comet test. Però hagués estat interessant fer les proves en intervals més avançats, almenys en aquesta concentració.

Un cop vistos aquests resultats es va voler continuar l'experiment a concentracions inferiors d'etoposide 10, 1, 0.1, 0.001µg/ml, i en diferents intervals de temps (3,6,9,15,24 hores), i en diferents tipus cel·lulars, per seguir la cinètica del dany i el procés. Es va voler repetir també a aquests mateixos intervals de temps, i el mateix tipus de cèl·lula exposades un cop més a etanol al 3% i Tween20 a 1.28mg/ml de concentració, i amb una nova substància com és el cromat potàssic a una concentració de 150µmol (essent un altre agent inductor d'apoptosi, per una altra via diferent que l'etoposide), metilmetanosulfonat, etc... Es van mesurar al mateix temps la viabilitat de les cèl·lules per la tinció de taronja d'acridina-bromur d'etidi, i es van comptar també les imatges apoptòtiques per un altre tipus de tinció, amb DAPI. Així com també hi havia alguns experiments *in vivo* en una exposició a micotoxines a més llarg plaç. Però no es mostren en aquesta tesi, i una part s'estan duent a terme encara. Alguns d'aquests treballs estan exposats a (Štětina et al.2001,a-b), en els que junt amb les proves presentades en aquest capítol, podríem comentar que:

En les mostres on es va induir apoptosi per etanol, es va obtenir doncs els dos grups de valors de dany al DNA, un de poc danyat (<10%), i l'altre de molt danyat (>80%) que apareix ja a partir de les 6 hores d'incubació, no havent quasi formes intermitges de dany. Mentre que per substàncies genotòxiques, la distribució del dany al DNA és homogènia en la majoria de cèl·lules per a l'interval dins les tres hores de tractament depenent de la dosi. Es va poder veure com corresponia bastant bé aquest major valor de dany amb les formes de la fase EA d'apoptosi per la tinció de taronja d'acridina i bromur d'etidi. Era important doncs, per evitar una possible interferència de l'apoptosi en determinades substàncies que la poden induir, fer els tractaments curts, menors de 3 hores per evitar aquest possible artefacte. La distribució del dany pels casos d'animals amb exposició crònica a mutàgens, va ser més heterogènia que en cèl·lules tractades *in vitro*, en que no es va detectar un augment significatiu del nombre de cèl·lules altament danyades (que es podien relacionar amb estadis inicials d'apoptosi). Ja he comentat anteriorment, però, que *in vivo* hi pot haver una eliminació ràpida de les cèl·lules en apoptosi; també pot influir la reparació que poden tenir del possible dany que puguin causar determinades substàncies, ja que podria detectar-se pel SCGE.

En els experiments d'aquest capítol doncs, s'ha vist una certa relació dels estats d'apoptosi i necrosi amb els resultats del comet en aquest cas.

Hi ha autors que han demostrat com algunes substàncies citotòxiques (no mutagèniques/carcinogèniques) donen resposta negativa al comet test per a un determinat tipus cel·lular (tal com comenta Mitchelmore et al.1998). Hartmann et al.(2001b) indica com el SCGE no és propens a donar falsos positius (deguts a la citotoxicitat, i en anteriors estudis havien realitzat proves amb 4 substàncies citotòxiques i no van veure els possibles falsos positius amb el comet test), per a les condicions i tipus cel·lular provats. Roser et al.(2001), indiquen que no és l'apoptosi un factor de confusió, però com ja he comentat, Choucroun et al (2001), consideren que no pot ser considerat un test de genotoxicitat. Tice et al.2000 comenta com Sasaki i els seus col·laboradors en un dels seus treballs, utilitzaven histopatologia per a identificar teixits amb excessives necrosi o apoptosi en experiments on s'obtenia resposta positiva per al comet, però comenta com hi ha estudis que no troben que hi hagi relació amb la citotoxicitat *in vivo*. També comenten que un control en que hi hagi un valor de viabilitat inferior a 70-80% és inadequat, altres autors consideren que cal tenir-ho en compte també per a poder esquivar la possible interferència d'aquests estadis cel·lulars. Henderson et al.(1998), per a les seves substàncies citotòxiques testades amb el comet test, troben que les citotoxines poden induir un augment de la migració del DNA quan la viabilitat és menor del 75% *in vitro*, i comenten que tot i que el seu estudi no ho ha comprovat, creuen que la formació de cometes pot reflectir un augment de dany al DNA indirecte com a conseqüència secundària d'alteracions, dany físic o químic a les membranes cel·lulars. Aquests són alguns exemples de la discussió. D'aquesta manera cal interpretar amb cura els resultats, tenint en compte aquesta possibilitat, tot i que és un test que es fa servir ja àmpliament i de manera molt usual en molts laboratoris. Potser a vegades, més que la possible migració del DNA degut als SB associats a la necrosi o apoptosi, seria interessant veure els casos en que perdem les imatges i no poden ser comptabilitzades, ja que ens estaria donant informació sobre el dany causat per una determinada substància, i que no es podria detectar, podent donar falsos negatius per a una substància provada. Seria recomanable fer estudis de viabilitat en paral·lel, tal com fan diversos dels investigadors citats. El més recomanable de moment, seria el que fan molts autors, per estudis de genotoxicitat, es descartarien aquests tipus d'imatges amb cues amples i caps petits, o sense caps, (tot i que no s'ignorarien), mentre que per estudis de toxicitat no es descartarien, si es consideren com a imatges relacionades amb cèl·lules no viables. Però el que realment seria necessari, és poder-se posar d'acord entre els diferents autors a l'hora d'establir com es fan els comptatges i de quines formes, ja que potser la variació de resultats entre diversos autors estigui també en com han considerat els comptatges de les diferents figures. Caldria doncs, una estandardització de la tècnica.

Així doncs, malgrat que no han pogut clarificar massa el que encara continua essent una discussió entre els diferents autors, els nostres experiments poden servir com un altre granet de sorra per afegir en aquesta polèmica o debat, i poden servir de base per a posteriors investigacions sobre el tema.



### 3.2.D.Conclusions:

1. Segons els nostres experiments, hi hauria una certa relació entre les quantitats creixents del nombre de cèl·lules en apoptosi i l'increment dels valors dels paràmetres de mesura del SCGE, quan s'utilitzava una substància inductora d'apoptosi (etanol) a concentracions no genotòxiques (3%).
2. De la mateixa manera, es trobaria un augment dels valors de mesura del comet test en relació a la pujada del nombre de cèl·lules en necrosi, induïda per una substància tòxica (Tween20, a concentració de 1.28mg/ml indueix necrosi).
3. El test del cometa, pot ser influenciat per la citotoxicitat causada per les substàncies no genotòxiques testades, en la línia cel·lular utilitzada.
4. No es va poder establir cap forma diferencial o típica per als diferents tipus de mort cel·lular, com tampoc a partir dels paràmetres del SCGE.
5. En el cas d'una substància genotòxica inductora d'apoptosi, es va poder veure l'augment dels valors dels paràmetres del comet test (serien deguts possiblement, al dany que causaria la substància, la possible reparació, i a l'estat d'apoptosi d'algunes cèl·lules). En l'interval experimentat, però, no es troba una diversitat de formes de comet, com les que es trobava en els casos d'inducció a apoptosi per etanol, o de necrosi per Tween20.

Seria doncs, un tema per a seguir estudiant, ja que encara hi ha molta discussió entre els diferents autors. Sembla però, que el SCGE no deixa de ser una tècnica apropiada per a la detecció de la genotoxicitat, només caldria tenir en compte aquesta possibilitat d'interferència.

---

### ● 3.3. Fragments de DNA – *Loops* de DNA.

#### 3.3.A. Introducció

Seguint en una de les altres discussions que hi ha encara actualment, com ja havia comentat anteriorment, i de fet, que està molt relacionada amb els apartats anteriors per a poder fer-ne una correcta interpretació, és el tema de què és realment el que veiem a les cues dels cometes. Al principi es va pensar que eren fragments de DNA, quan més petits, més de pressa migrarien en l'electroforesi, llavors, més llarga seria la cua, segons les intensitats de les mesures pel sistema d'anàlisi d'imatges, es podia veure al mateix temps, la quantitat de DNA a la cua. La discussió està ara, en que molts dels autors pensen, que el que realment veiem, no serien trencaments, sinó els efectes dels trencaments, en forma de *loops*. Unes determinades mutacions, causades per agents genotòxics o no, podrien causar lesions al DNA en forma de trencaments de cadena, o altres alteracions que es traduirien en trencaments durant la lisi alcalina de les mostres pel *Comet test*. Els trencaments de cadena, relaxen el DNA enrotllat, i farien que en l'electroforesi, correguessin més de pressa aquests *loops* ocasionats pels trencaments en una estructura tan empaquetada (durant la lisi alcalina, es destrueixen algunes proteïnes a més de les membranes). Així doncs, potser es donen les dues coses alhora. Si és així, o només es dona alguna d'elles, és encara un tema a aclarir entre els molts autors.

D'aquesta manera, es va intentar buscar un sistema per visualitzar la forma, l'estructura del DNA un cop dut a terme el SCGE. Es va pensar amb el microscopi de força atòmica, que permet visualitzar les imatges de la forma del DNA (de cadena simple, doble i veure complexes DNA-proteïnes, i DNA-metalls), entre altres coses (per a uns exemples del seu funcionament i aplicacions, veure Radmacher et al.1992; Delain et al.1992; Putman et al.1993; Onoa et al.1998). Breument i simplement, es basaria en un microscopi que pot aconseguir una imatge a tres dimensions de l'objecte (que pot ser dur, o tou, en el qual es poden avaluar mostres orgàniques en el rang des de l'ordre de fines pel·lícules a resolució molecular fins a cèl·lules vives) amb un escanejat a partir d'una sonda que utilitza com a guia per a resseguir la superfície els diferents camps de força entre la mostra i la sonda.

Es va pensar doncs, en la possibilitat de poder comparar així, les imatges de cometes que podem observar en la realització del comet test, amb les imatges obtingudes d'aquestes, per aquest sistema. Intentant d'aquesta manera poder discernir o no, el que passa realment amb l'estructura del DNA i relacionar-la amb la imatge corresponent del cometa, cosa que ens facilitaria molt la interpretació del que obtenim per la tècnica i avançaríem en el coneixement del seu funcionament.

### 3.3.B. Discussió

Aquest experiment no es va poder dur a terme degut a problemes tècnics com ara el fet que les mostres no eren prou planes. L'ús de portaobjectes rugosos donaven una superfície rugosa i no plana, que tot i quedar plana amb les capes d'agarosa, el microscopi no podia discernir entre aquestes protuberàncies i les de la forma del DNA. Un altre problema seria doncs, que el DNA està barrejat i dins d'una capa d'agarosa, no es va trobar manera de poder-lo aïllar de l'agarosa.

Ara però, s'hauria de veure si després d'utilitzar portaobjectes normals i no rugosos, que ja permetrien tenir una superfície totalment plana, i després de suprimir la tercera capa d'agarosa (la capa que es posava al damunt de la que anomenàvem segona capa que és la que està barrejada amb la mostra cel·lular), que permetria treure una possible superfície destorb per a la tècnica, i amb la possibilitat ara de poder assecar les capes d'agarosa amb la mostra de cèl·lules sense que hi hagi cap alteració en el DNA, i que potser permetria tenir la superfície prou plana, tot i que segurament es donarien arrugues de l'agarosa al assecar-se, podent interferir en la lectura pel microscopi; potser ara doncs, es podria tornar a repetir l'experiment. Si en un futur es té la possibilitat de continuar aquest estudi, seria un dels punts a intentar de provar un altre cop. Ja que si fos possible aquest tipus d'observació, potser ens podria donar una idea més sobre el que veiem realment en la imatge del cometa, i donar una avançada en quan a la discussió i interpretació del que obtenim en l'ús d'aquesta tècnica.

El fet de poder aclarir aquest punt, seria molt important en l'ajuda de poder esbrinar millor o clarificar, els punts anteriors del capítol. Justament es detecta que la divisió cel·lular, d'alguna manera interferiria, sigui pel moment de síntesis del DNA, quan detectem fragments, o quan hi ha els *loops*, el mateix quan es dona la reparació, els enzims causarien trencaments de cadena que es podrien detectar pels fragments o *loops* causats en la relaxació de les cadenes de DNA, així mateix, la interpretació de les imatges considerades per alguns autors com imatges d'apoptosi, es podrien veure el que són, i ajudar en la comprensió i investigació de la possible detecció de les apoptosis, o si més no, d'esbrinar què són aquestes imatges que veiem, fragments, etc...

Així, aquest punt és molt important per ajudar a conèixer més la tècnica, el seu funcionament, les seves limitacions, aplicacions, i la interpretació dels resultats que s'obtenen al processar mostres per aquest assaig. Potser semblaria, que es donen les dues coses, *loops* i fragments, deguts als trencaments de les cadenes de DNA.

---

### 3.B. Conclusions generals del capítol

1. Per les proves realitzades tant *in vitro* com *in vivo*, s'ha pogut veure d'alguna manera una certa influència de la divisió cel·lular en els resultats del SCGE.
  2. De la mateixa manera s'ha pogut observar una certa relació amb les cèl·lules en estat d'apoptosi i necrosi, a l'augmentar els valors dels paràmetres del comet test amb l'augment del nombre de cèl·lules en aquests estats.
  3. No s'ha pogut establir cap relació entre les possibles imatges de necrosi i/o apoptosi obtingudes pel comet test i les cèl·lules en aquests estadis. No podent obtenir unes formes de cometa determinades per a cada estat, ni trobar una diferència entre imatges per a diferenciar o caracteritzar les dues formes de mort cel·lular.
  4. Així doncs, seria interessant continuar els experiments realitzats i proposats en aquest capítol, (en relació a la divisió cel·lular, l'apoptosi-necrosi, i els *loops* o fragments de DNA) per a investigar més en el funcionament i coneixement de la tècnica, i poder entendre millor, el que realment està detectant aquest test.
-

## Capítol 4

---

### 4. ALTRES APLICACIONS DE LA TÈCNICA.

---

#### 4.A.Introducció:

La utilització del Comet test es va estenent diàriament a diferents i noves aplicacions per les moltes possibilitats i avantatges de l'assaig. La rapidesa en el seu procediment, amb la possibilitat d'obtenir resultats en un curt període, com la seva elevada sensibilitat a baixos nivells de dany al DNA (pot arribar a detectar tan pocs com 100 SSB per cèl·lula, Olive et al.1993), i la possibilitat d'aconseguir avaluar els efectes de substàncies genotòxiques a dosis molt baixes (Rojas et al.1999), fan, entre d'altres propietats, que sigui cada cop més utilitzat. Una de les aplicacions que ha adquirit especial èmfasi recentment, ha estat el derivar-la cap a estudis de reparació del DNA. Gran part de les mutacions puntuals causades per una determinada substància poden ser reparades pels sistemes de reparació del DNA; en un interval variable segons l'espècie i el tipus de lesió.(Tal com comenta Rojas et al. 1999: en limfòcits humans irradiats, el 50% del dany pot ser reparat en 15 minuts, o fins a 1-2 hores per la reparació completa; o un altre exemple: una hora és suficient temps per a reparar SB causat per a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cèl·lules HeLa, mentre que no és prou temps per a reparar les bases oxidades, Collins 2000). Això fa que puguin no ser detectables les mutacions ja que poden haver estat reparades, o per altra banda, es pot mesurar precisament la reparació que causa el determinat agent veient com disminueix el nombre de cometes en un determinat temps, mentre que ja és conegut, que també es pot detectar la reparació traduïda com a un "índex del dany causat" (pels diferents paràmetres de mesura del comet test), veient trencaments que no serien els provocats directament pels tòxics, sinó pels efectes de l'actuació dels enzims de reparació que podrien convertir determinades lesions (les quals podrien o no ser detectables pel comet test) en trencaments de cadena essent mesurables llavors amb aquesta tècnica.

A diferència del capítol 1, on l'interès estava en la valoració dels efectes d'una exposició crònica als contaminants en animals vius, en laboratori es sol buscar la mesura dels efectes a curt termini d'una exposició puntual. Així doncs en un estudi de laboratori dels efectes d'una substància, cal conèixer els intervals de temps en que es recullen les mostres, ja que poden variar els resultats degut als fenòmens de reparació entre d'altres, i podria portar a una interpretació errònia dels resultats. Això ens obra les portaobjectes a noves aplicacions, no sols avaluar els sistemes de reparació seguint la seva cinètica, sinó que, un cop conegut l'efecte i reparació del dany causat per un determinat tòxic, es pot detectar problemes d'aquest sistema de reparació. En un altre cas es poden detectar o valorar altres substàncies que poguessin afectar els sistemes de reparació del DNA, seria un altre tipus, més indirecte d'efecte genotòxic sobre el DNA.

---

L'òxid d'estirè ( $C_8H_8O$ ) o també anomenat feniloxirà entre d'altres sinònims, pot ser alliberat al medi ambient durant la seva producció i ús, en forma d'emissions o en les aigües de rebuig ([6]). Les persones poden estar exposades a aquesta substància en els seu lloc treball. És el principal metabolit intermediari de l'estirè (Somorovská et al.1999; Koskinen et al. 2000b, Laffon et al.2001). S'utilitza en la producció d'estirè glicol (producció de varis plàstics i gomes) i els seus derivats, i com un diluent per a les resines epòxiques (resines de polièster); com a un reactiu intermediari en la preparació de cosmètics, productes químics biològics i agrícoles, entre d'altres, com a material per a la producció de fenil etil alcohol utilitzat en perfums; i també en el tractament de fibres i tèxtils. Es pot considerar un producte de risc per a la salut ( una exposició curta provoca irritacions a la pell i als ulls en humans, i en exposicions agudes en ratolins té efectes més greus, com canvis en enzims del fetge en exposició intraperitoneal, increment de carcinomes esquamosos de pell i papil·lomes atri-estomacals de rates, etc., obtenint resultats positius en varis tests de genotoxicitat realitzats per l'EPA (*Environmental Protection Agency*) com el test d'Ames, MNT, i altres, en mostres de ratolins i inclús fibroblast i i limfòcits humans; [5]; [7] ;[8]). S'han fet diversos estudis per avaluar el risc de càncer, en ratolins, etc... i s'ha classificat segons IARC (*The International Agency for Research on Cancer*) com a un probable carcinogen humà, grup 2A ,( [5]; [7]; [8]; Blastová et al. 1995; Somorovská et al.1999; Vodička et al.2001a), i carcinogènic en animals d'experimentació (Laffon et al.2001). Està ben documentat que causa trencaments de cadena del DNA en cèl·lules de mamífers *in vitro* i *in vivo*, intercanvi de cromàtides germanes i aberracions cromosòmiques en cultius de limfòcits humans (Somorovská et al.1999). És un mutagen actiu directe i com ja he dit, un carcinogen per animals d'experimentació, essent capaç de reaccionar amb diverses posicions dels constituents dels àcids nucleics (Hemminki & Vodička,1995; Koskinen, 2000b). Pot formar diferents tipus d'*adducts* amb el DNA (Hemminki & Vodička 1995; Marczynski et al. 1997; Koskinen et al. 2000a,b, Vodička et al.2001a), els trencaments de cadena poden ser deguts a dany oxidatiu al DNA (en cèl·lules de la sèrie blanca de treballadors exposats a aquest tòxic, tal com comenta Marczynski et al.1997). Així pot causar determinades mutacions, i un retard en la cinètica del cicle cel·lular (inhibint la proliferació) en determinades condicions (dosis concretes en diferents intervals de temps d'exposició), com també un augment de la síntesi i de la inducció a la reparació (indicant potencial carcinogènic), en cultius de limfòcits humans (Chakrabarti et al.1997).

Més recentment un estudi realitzat per Laffon et al.(2001) indica la seva capacitat de causar dany al DNA de leucòcits humans a determinades concentracions, mesurat amb el Comet test (en forma de SSB), i altres tècniques com el SCE (l'intercanvi de cromàtides germanes), el Test del micronuclis amb bloqueig de citocinesi (per mesurar el nombre de MN), en combinació amb tècniques de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), basant-se en el seu potencial clastogènic, o altres estudis com el de Vodička et al.(2001a). Es pot comentar la utilització també del Comet test per a mesurar el dany causat per l'estirè (Somorovská el al.1999, Vodička et al.2001a-b), i la seva sensibilitat en aquest tipus d'estudis.

En aquest capítol es pretenia fer diverses proves, d'una banda hi ha uns experiments per mostrar la reproductibilitat del test i la bona correlació positiva dosi-efecte amb els resultats del comet test, i altres experiments dedicats a veure l'aplicació d'aquesta tècnica per a indicar la reparació del DNA. Així es va realitzar la sèrie d'experiments següents, utilitzant l'òxid d'estirè com a substància genotòxica d'estudi:

- **4.1.** Mesura de la correlació dosi-resposta positiva amb el comet test.
- **4.2.** Estudi *in vitro* de la reparació del dany al DNA induït per SO.
- **4.3.** Estudi del tractament amb SO en ratolins NMRI.
- **4.4.** En aquest apartat es fa una sèrie de consideracions de la tècnica.

#### •4.1. Mesura de la correlació dosi-resposta positiva amb el Comet test.

##### 4.1.a. Introducció:

De les moltes característiques que valorarien la fiabilitat i rendiment d'un test, la reproductibilitat n'és molt important (per a la tècnica del comet test, hi ha una evidència de la seva reproductibilitat, Hartmann et al.2001b, troben que és molt elevada, en la mesura de 188 experiments individuals - 94 proves, fetes per duplicat- on en el 85% dels casos, els resultats de la repetició eren iguals que els de la primera prova; Miyamae et al.1998, també trobaven una bona reproductibilitat del test en els seus experiments, per a diferents proves en diferents òrgans), però no sols en el sentit d'obtenció de resultats similars en diferents repeticions de la prova realitzades per a un mateix grup de recerca, sinó també a nivell de la semblança entre els que es realitzen en diferents laboratoris, tot i les variacions en el protocol de la tècnica entre els mateixos, degut a la manca d'estandardització d'aquesta encara; (Miyamae et al. 1998, van comparar resultats del mateix experiment entre diferents laboratoris també, obtenint una bona correlació; mentre que no sempre coincideixen els resultats en diferents grups d'investigació per a altres experiments, caldria seguir tots el mateix protocol i sistema). Altres requeriments importants serien l'eficiència a l'hora de mesurar els efectes d'una substància tòxica. Cal veure el que succeeix a diferents dosis d'una substància, interessa trobar la dosis mínima en que hi ha efectes perjudicials, veure si incrementen els danys a dosis superiors, si es poden donar reaccions de reparació, i si tot això és mesurable per la tècnica.

En aquest cas es volia fer un estudi sobre els efectes de l'òxid d'estirè. Seria interessant, no sols veure si el comet test detecta el tipus de dany causat per aquesta substància, sinó també veure la relació dosi-efecte. S'esperava un major dany al DNA (un augment del nombre de cometes) causat per un increment de la concentració d'aquesta substància.

---

#### 4.1.b. Material i Mètodes:

- Mostres de sang de ratolí:

- . Es van anestesiar dos ratolins amb pentobarbital ( 0.1ml/ 10 g de pes).

- . Se'ls va treure 1 ml de sang amb una punció directa al cor.

- . Aïllament dels limfòcits:

- En un tub amb 1 ml de Ficol+Vg es va posar 1 ml de sang a poc a poc.

- Es va centrifugar 30 minuts a 2000 rpm i es van treure els limfòcits amb cura amb una pipeta , el Ficol+Vg permet que per gradient de densitats es separin les diferents fraccions cel·lulars i el plasma, quedant els limfòcits en una capa separada.

- S'afegiren 10 ml de PBS i es centrifugà 5 minuts a 1200 rpm per a fer un rentat, es va repetir un segon rentat i es decantà el PBS, afegint 1 ml de medi RPMI 1640 + FCS (sèrum). Es va barrejar bé, i es va posar en un pot de 25 ml de medi per a preparar el cultiu de limfòcits per a la posterior incubació amb les corresponents concentracions d'òxid d'estirè.

- . D'aquí es posaren en tubs 1ml del medi amb les cèl·lules en les que es van aplicar les diferents concentracions d'òxid d'estirè: 10, 50, 100, 250, 500  $\mu\text{mol/ml}$  (diluint amb DMSO), i va fer un control amb DMSO. Es deixà incubar durant 30 minuts a 37°C.

Les dilucions de SO es van fer amb DMSO (tal com fan Bastlová et al.1995; Chakrabarti et a. 1997, Laffon et al.2001 entre d'altres autors). El DMSO pot resultar tòxic a segons quines concentracions (però en les concentracions tan baixes utilitzades, no causaria un dany afegit al que es vol mesurar en aquest experiment, de tota manera, si fos així, quedaria l'efecte compensat per la comparació amb el control en que s'incuben les cèl·lules amb DMSO sense SO, fent potser que es veiés en aquest, un valor de dany basal més elevat que en mostres en medi sol, sense DMSO, considerant que pogués afectar les cèl·lules d'alguna manera en aquesta concentració). Però tal com indiquen Bastlová et al.(1995), en l'avaluació a partir del SCGE del dany causat per SO, en els controls amb DMSO (a concentracions de 0.05%), no apareixia cap trencament addicional. Laffon et al.(2001) també fa servir un control negatiu a partir de DMSO, però a l'1% de concentració; en els dos casos, es tractava també de cultius cel·lulars.

- . Per a fer les capes d'agarosa, es va preparar la suspensió cel·lular a partir dels cultius: en cada tub es posà 5ml de PBS, es va centrifugar durant 10 minuts a 2000rpm, i es varen resuspendre les cèl·lules en PBS, barrejar bé i treure 35  $\mu\text{l}$  per a fer la segona capa.

- . El procediment del Comet test es dugué a terme tal i com està explicat en el capítol 3 (apartat 3.1.2.b). Molt breument:

S'utilitzen portaobjectes normals preparats amb una capa d'agarosa assecada a l'estufa. Es va fer una primera capa de 85 $\mu\text{l}$  d'agarosa de punt de fusió normal a l'1%, una segona capa de 85 $\mu\text{l}$  de la barreja de l'agarosa LMP (85 $\mu\text{l}$ ) amb els 35 $\mu\text{l}$  de la suspensió cel·lular (utilització de cobreobjectes de 20x20mm). Una hora en líquid de lisi. Desenrotllament en el tampó per l'electroforesi en fred durant 40 minuts. Electroforesi en fred durant 30 minuts. Tres rentats de cinc minuts amb tampó neutralitzador Tris. Tinció amb 20 $\mu\text{l}$  de bromur d'etidi, i es va passar a fer els comptatges al moment amb el sistema informàtic Komet 3 (Kinetic Imaging, Liverpool).

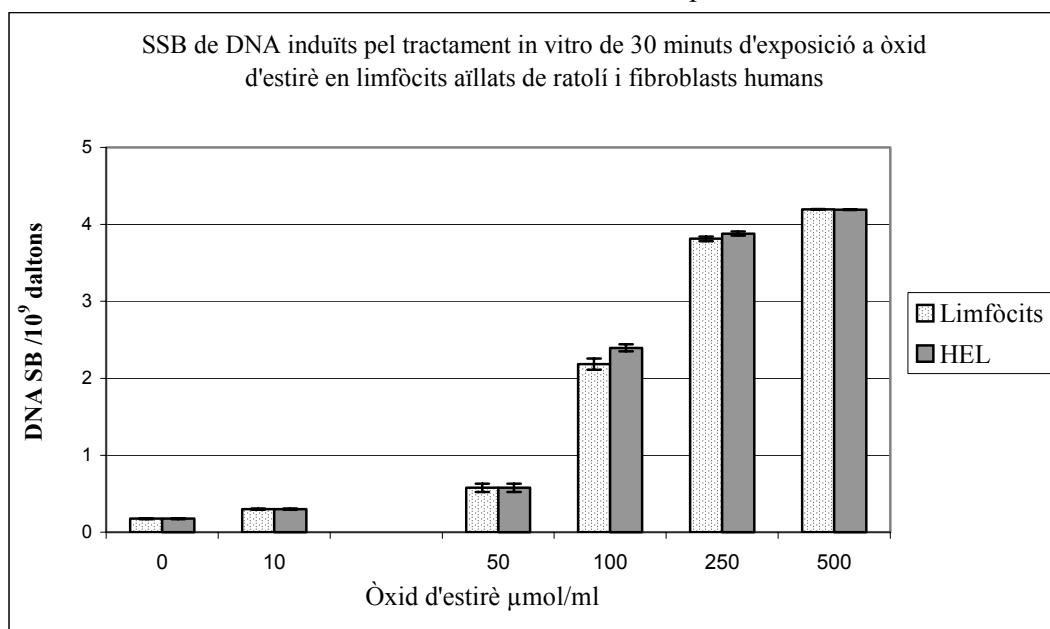


▪ Mostres de HEL Fibroblasts:

. A partir dels cultius de Fibroblasts (HEL: *Human Embryo Lung Fibroblasts*) es va realitzar la mateixa prova, l'exposició a les mateixes concentracions d'òxid d'estirè durant 30 minuts. I es va realitzar el comet test de la mateixa manera que pel cas dels limfòcits.

#### 4.1.c. Resultats i Discussió:

**Fig.4.1.** Gràfic del comet test en limfòcits i HEL fibroblasts exposats a òxid d'estirè



En els dos experiments es pot observar un augment del dany al DNA en forma de SB (trencaments de cadena), a mesura que s'augmenta la concentració del genotòxic en un temps determinat d'exposició. Així ens indicaria que el Comet Test pot mesurar *in vitro* l'augment de la presència d'una substància conegudament genotòxica, que provoca major dany a mesura que s'augmenta la concentració. Altres estudis han comprovat que el comet test és una eina molt sensible a l'hora de mesurar el dany al DNA a molt baixes dosis causat per estirè (Somorovská et al., 1999), i SO (Laffon et al. 2001) trobant també una bona dosi-dependència *in vitro*.

Hi ha un especial interès en aquest experiment en quan a què els resultats obtinguts per dos tipus cel·lulars diferents, es mostren similars, deixant de banda que els tòxics poden tenir dianes diferents o afectar diferentment als diversos tipus cel·lulars, l'observació seria que en els dos casos augmenta el dany amb l'increment de la concentració del tòxic. Així doncs ens podria

indicar la seva utilitat, no tan sols en estudis de laboratori, sinó de camp també, en el fet de poder detectar els efectes de diferents concentracions del tòxic. Caldria però, tenir en compte molts altres aspectes en la interpretació, sobretot en estudis de camp, en quan a l'actuació del tòxic i de l'organisme respecte aquest, etc..

Ja havia comentat en capítols anteriors, l'aplicació de la utilització d'enzims en la tècnica del Comet test per augmentar la sensibilitat de l'assaig, i per a una detecció específica del dany oxidatiu. Enzims com la Endonucleasa III i la Formamidopirina glicosilasa (FPG) en la que es detectarien les pirimidines oxidades i purines danyades, respectivament i els llocs apurínics i apirimidínics (*AP sites*), (Rojas et al.1999; Collins 2000), són ara molt utilitzats. En aquest cas podem anomenar l'exemple de Somorovká et al.(1999), entre d'altres, que utilitzen aquesta tècnica junt amb el tractament d'aquests dos enzims de reparació, en limfòcits de treballadors exposats a l'estirè (l'estirè és molt utilitzat en la indústria sobretot de fabricació de plàstics, resines de poliester, gomes sintètiques, etc., classificat com a grup 2B per l'IARC, possible carcinogen per humans - Somorovská et al.1999; Möller et al.2000 - i els treballadors d'aquestes indústries en poden estar exposats per inhalació durant la seva manipulació, també és un contaminant del medi ambient, en petites quantitats es pot trobar en el fum del tabac, en alguns articles de menjar, (degut al seu empaquetament en plàstics), i en els fums o gasos d'escapament dels motors (Vodička et al.2001b); el SO, es pot formar a partir de l'estirè quan s'afegeixen peròxids a les resines, o a partir de l'estirè de l'aire pot oxidar-se a SO en presència d'oxigen i llum. SO seria el principal metabolit mutagènic de l'estirè *in vivo*. El fetge és el principal òrgan metabolitzador de l'estirè en organismes vius, però altres com el ronyó, intestins, pulmons i pell, poden convertir-lo en SO també, (Laffon et al.2001). Part del dany doncs, podria estar relacionat amb el SO. El dany oxidatiu en les bases i altres alteracions en aquestes (alquilacions, etc.), poden provocar llocs apurínics i apirimidínics (*AP sites*), són alcalino-làbils, llavors en condicions alcalines com les que es donen en el Comet test, es formarien trencaments de cadena, que serien detectats pel SCGE. D'aquesta manera doncs, alguns dels tipus d'*adducts* es podrien convertir en llocs AP i llavors en trencaments, o aquests llocs AP es poden donar també durant els processos de reparació d'algunes d'aquestes lesions (Somorovská et al.1999), podent ser detectats, doncs, trencaments de cadena durant els processos de reparació per escissió. En aquest sentit ens mostra la detectabilitat que pot existir per aquesta tècnica, del dany causat per aquestes substàncies, tenint en compte que una part del dany no podrà ser reparat i altra sí (Chakrabarti et al.1997; Koskinen et al.2000a), i que la reparació es donarà en un determinat temps, (ex: entre dues i tres hores es poden reparar els SSB induïts per SO en fibroblasts HEL; Štětina & Vodička, 1998), que podrà dependre del tipus d'exposició, la quantitat, la duració d'aquesta, l'estat dels organismes, i el tipus, dels mecanismes de reparació, etc...Llavors els resultats del comet s'haurien d'interpretar considerant tots aquests factors, en quan a la dosi i concentració, temps d'exposició, interval de recollida de mostra, tipus cel·lular, etc..

Laffon et al.(2001), troba un major dany al DNA mesurat pel comet test, en relació a l'augment de concentració testada de SO en limfòcits humans (igualment com trobava Bastlová et al.1995, tot i que la incubació amb SO era d'una hora enlloc de 30 minuts). Utilitza els paràmetres de %*Tail DNA*, TM i *Tail Length* per a l'avaluació; tots tres serien bons per a mesurar el dany, però troben una millor correlació amb el *Tail Length* i la dosi, en el seu cas concret, (Bastlová et al.1995, fan les mesures amb aquest paràmetre també). Mentre que en el nostre cas

hem mesurat el nombre de SSB a partir del % de DNA a la cua (*%Tail DNA*), utilitzant la corba estàndard de calibració del comet establerta, en la que és conegut un nombre de trencaments de cadena induïts per una certa radiació X (Slameňová et al.1997). On el factor de conversió del trencament de DNA, és de 0.31 trencaments per  $10^9$  daltons per Gy (Collins et al.1996-97b). Ja he comentat anteriorment, la discussió entre els diferents autors sobre quin és el millor paràmetre per avaluar la genotoxicitat amb el SCGE, on també, segons els casos, pot ser més adequat un, que altre paràmetre. Un altre fet a comentar en l'experiment de Laffon et al.(2001), és la correlació que troben també entre els resultats del SCGE i dels altres tests (MNT, SCE, per aquest estudi realitzat), tot i que mesurarien de manera diferent el dany. Ja havia comentat en capítols anteriors, la necessitat de validar els resultats del comet test amb tècniques establertes i estandarditzades per aquests tipus d'estudi, com també el fet de que és millor utilitzar diverses tècniques, que es podrien complementar, en els anàlisis dels possibles efectes genotòxics de determinades substàncies, ja que uns poden ser més sensibles que d'altres a diversos tipus de mutacions al DNA (per alguns exemples, veure les correlacions entre diverses tècniques i el SCGE en estudis *in vivo* per a diferents substàncies, Sasaki et al.1999-2000; Tsuda et al.2000, en que agafen substàncies classificades com a genotòxiques o no, per diverses tècniques ben establertes, i ho comparen amb els resultats del comet test per les mateixes). Al nostre experiment, però, sols es volia veure la possibilitat de la detecció del dany a diferents concentracions, veure si hi havia una correlació al augmentar-la per a un mateix interval de temps d'exposició, i comparar-ho per dos tipus cel·lulars diferents.

Hem trobat similars respostes en dos tipus cel·lulars exposats a les mateixes concentracions del genotòxic, en quan a la detecció de trencaments de cadenes del DNA, que podrien ser causats, no sols per la capacitat clastògena de la substància, sinó també per la possible detecció dels estats de reparació. Tot i utilitzar diferents tipus cel·lulars, concentracions, i condicions que Bastlová et al.(1995), i Laffon et al.(2001), també troben un augment del dany al DNA mesurat pel comet test, amb l'increment de la concentració de SO.

#### 4.1.d.Conclusions:

1. A partir dels resultats del Comet test, es podia observar un increment del nivell de dany al DNA mesurat per aquest assaig, en relació a l'augment de la concentració de la substància genotòxica, en aquest cas l'òxid d'estirè.
  2. Pels dos tipus de cultius utilitzats, limfòcits i HEL fibroblast, obtenim una relació dosi-dependent similar per a les concentracions i temps d'exposició provats, en la mesura del dany pel comet test.
-

## •4.2. Estudis *in vitro* de reparació del dany al DNA causat per l'exposició a òxid d'estirè.

### 4.2.a. Introducció:

Com ja he comentat anteriorment, una de les altres aplicacions que pot tenir avui dia el Comet test, és la seva utilització en estudis de reparació.

Moltes de les mutacions causades per una substància genotòxica poden ser reparades pels sistemes de reparació cel·lulars, i així segons el període en que es facin les proves poden ser detectats o no, cosa que ens podria fer variar la interpretació dels resultats.

El camp de l'estudi de la reparació de DNA fa possible fer treballs amb substàncies tòxiques que alterin, inhibeixin, o estimulin la capacitat de reparació del DNA, detectant llavors més quantitat de dany cel·lular degut a la falta de reparació més pròpiament que no degut a una mutació de tipus clastògena, o si l'exposició al tòxic és molt recent, també es pot detectar uns nivells de dany molt superiors que serien deguts al procediment dels enzims d'escissió durant el procés de reparació (al mateix temps, és una manera indirecta de mesurar que hi ha hagut lesions). És sabut també, que hi ha un dany cel·lular endogen, i gran part és reparat pels sistemes de reparació cel·lulars (Collins et al. 1997a; Rojas et al. 1999). Una substància que provoqui alguna alteració en aquests sistemes causarà al final una acumulació de mutacions no reparades que podran en part ser detectades pel Comet test. Això obra tot un munt de possibilitats sobre la utilització d'aquesta tècnica.

En aquest cas es va voler veure la capacitat de reparació, en un cultiu de Fibroblasts HEL, sotmesos un cop més a diverses dosis d'òxid d'estirè (0,50,250µmol/ml), comparant els valors a les zero hores amb els de les 2 hores després del tractament (incubació durant 30 minuts amb SO).

Es va utilitzar l'enzim Endo III per augmentar la sensibilitat del test, i poder detectar d'aquesta manera altres mutacions que es passarien desapercebudes amb la tècnica normalment utilitzada. Aquest enzim és un enzim bacterià de reparació, que reconeix i talla allà on hi ha una base pirimidínica oxidada, donant un *AP site* (lloc apurínic/apirimidínic, Collins 2000; en una sola macromolècula, combinen l'acció glicosilasa, que treu la base danyada, causant un *APsite*, i l'AP-endonucleasa, que pot convertir en SB l'*APsite*; Dušinská & Collins, 1996; Collins et al. 1997a, Angelis et al. 1999), a més, els ALS (llocs alcalino-làbils, com podrien ser aquests *APsites*) es poden convertir en SB a pH elevats, com els que es donarien en el comet test, essent llavors detectats per aquesta tècnica. Així doncs podríem mesurar també el possible dany oxidatiu que es produís, i veure la seva reparació, si és que es dona, al cap d'un cert temps, en aquest cas dues hores, ja que en experiments anteriors s'havia observat que en dues hores es donava una disminució del dany, que es va atribuir a la reparació. Aquest dany es veuria restant els valors del comet test sense la incubació amb l'enzim, i els resultats de la incubació amb aquest, de la mateixa manera podríem veure la reparació d'aquests, al cap de les dues hores, essent moltes vegades més persistents a ser reparades les lesions sensibles a aquest enzim (*Endo III sensitive sites*), que els trencaments de cadena, en un determinat temps i tipus cel·lular. L'ús

d'aquest enzim (Endo III), ha estat molt interessant també, en quan a avaluar l'efecte protector de les vitamines antioxidants contra el dany oxidatiu endogen, en humans amb dietes suplementades amb aquestes (Dušinská & Collins, 1996, Collins et al.1998, entre d'altres).

#### **4.2.b.Material i Mètodes:**

Les dilucions del SO es van preparar igualment com he comentat anteriorment (4.1.b), com també el manteniment dels cultius es va fer de la mateixa manera, i el seu tractament.

La tècnica del Comet test s'efectua de la mateixa manera que en l'apartat anterior (4.1.b).

Hi ha, sols, una modificació en aquest cas: l'ús de l'enzim Endonucleasa III. En la meitat de les mostres es duu a terme el comet test amb incubació d'Endonucleasa III i en l'altre meitat es realitza el comet test sense aquest enzim.

Procediment pel tractament amb l'enzim:

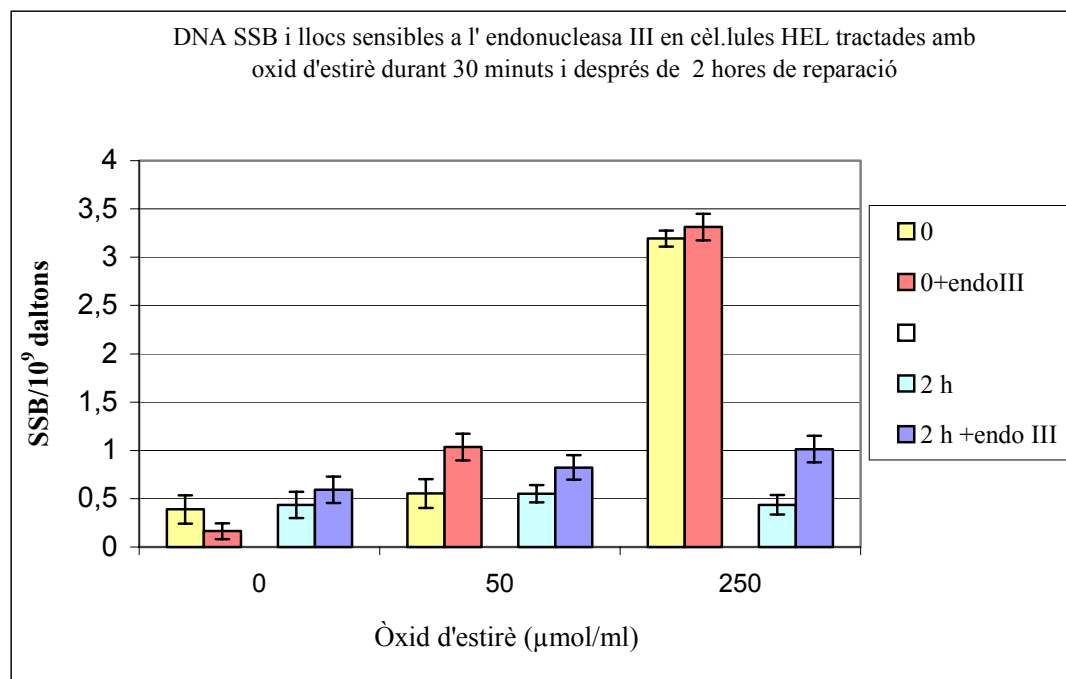
- Després de la lisi a pH:10 durant una hora, es fan tres rentats de cinc minuts amb tampó per Endo III (0.1M KCl , 40mM Hepes,0.5mM EDTA, 0.2mg/ml BSA; pH:8 ajustat amb KOH) al bany a 37°C en cubetes de tinció verticals.
- Es posen 30µl de la solució de l'enzim per portaobjectes. (Solució que es guarda al congelador en tubs Eppendorf, i que s'ha posat un moment al bany a 37°C ).
- S'incuben les mostres a l'estufa a 37°C durant 45 minuts; (es solen preparar també alguns portaobjectes de més per a posar a incubar amb tampó per Endo III que ens serviria de control).
- Després de la incubació es retiren els cobreobjectes es posen al tanc d'electroforesi per al desenrotllament durant 40 minuts en tampó per electroforesi i en fred.
- Es duu a terme l'electroforesi durant 30 minuts en fred, i es continua els següents passos de la mateixa manera que els casos anteriors (ja explicats) quan no hi ha incubació amb l'enzim.

Preparació de les dilucions de l'enzim: Les aliquotes congelades a -80°C de 100µl de l'enzim concentrat es reparteixen pel seu ús en 10 tubs eppendorf on es fa una dilució de 10µl de l'enzim amb 0.99ml de tampó per Endo III, i es guarda congelat fins el seu ús. És important fer aquestes aliquotes petites perquè no es pot congelar i descongelar diverses vegades ja que es faria malbé l'enzim.

---

## 4.2.c.Resultats i Discussió:

**Fig. 4.2.** Resultats del Comet test en HEL fibroblasts exposats a diverses concentracions d'òxid d'estirè durant 30 minuts i al cap de les dues hores de la reparació.



La quantitat de dany està mostrada aquí en nombre de trencaments de cadena senzilla (mitjanes de SSB  $\pm$  SE), segons la relació que es va establir entre el percentatge de DNA a la cua i els SSB (Collins et al.1996-1997b), tal com també hi ha una relació lineal entre el *Tail Moment* i el nombre de SSB (Olive & Banáth, 1994-95).

En els resultats del Comet test realitzat amb la incubació de les mostres amb l'enzim Endonucleasa III, s'esperarien uns valors superiors de dany al DNA que els resultats de la tècnica sense aquest enzim, ja que l'ús d'aquest fa més sensible el test, detectant més tipus de mutacions.

Els valors control, (dosi 0 d'òxid d'estirè), mostren una quantitat de dany, en forma de trencament de cadena senzilla de DNA (SSB), petita, però n'hi ha, el que es pot atribuir al dany endògen basal. El fet que surti una mica més elevat al cap de dues hores, al no haver cap tipus d'exposició al tòxic, podria ser degut a una acumulació de mutacions, o a alguna influència de les mesures deguda a l'estadi cel·lular, o a un petit augment de la mortalitat, en el cas que aquests interfereixin en els resultats dels valors del comet, o a algun efecte que pogués causar el DMSO, de tota manera, la diferència de valors no és massa gran, es podrien considerar com a similars. Durant els processos metabòlic normal, hi ha uns processos endògens d'oxidació, que poden ser més o menys reparats (Dušinská & Collins, 1996; Collins et al.1997a, aquests autors han pogut veure com l'Endo III detecta dany oxidatiu en limfòcits no tractats amb cap genotòxic, essent un dany

oxidatiu endògen, possiblement causat per radicals lliures d'oxigen; els quals se suposa, que estan relacionats o són causants de diverses patologies, entre elles el càncer; Fairbarin et al.1995; Collins et al.1997a). Així es pot pensar en aquesta acumulació de dany al cap de dues hores, degut a l'activitat metabòlica endògena, com a una de les moltes possibilitats d'explicar aquests valors més elevats.

El que es pot veure un cop més (igualment com en l'apartat 4.1.c) és que la quantitat de dany augmenta amb l'increment de la concentració del SO (*styrene oxide*). I que el test és més sensible amb l'ús de l'enzim, ja que pot detectar més tipus de mutacions causades pel genotòxic, així es veu un valor més gran en les proves on s'ha incubat amb l'enzim, tot i que no és un valor molt diferenciat.

Aquesta poca diferència de valors obtinguts en el comet sense enzim i en el que es fa la incubació amb l'Endo III (aquest enzim detectaria les pirimidines oxidades i els llocsapurínics/apirimidínics, *AP sites*), ens podria fer pensar en un principi, que aquest enzim no va ser el més adequat en aquest cas, no essent la majoria del dany detectat en aquesta prova, lesions causades per SO sensibles a aquest enzim. Potser hauria estat convenient utilitzar també el FPG que detecta purines oxidades i formamidopirines (purines d'anell obert, que resulten de l'alquilació de purines o purines oxidades; Dušinská & Collins, 1996), i també llocsapurínics/apirimidínics. El SO causa alquilacions i oxidacions, (moltes d'elles a les adenines i guanines), entre altres lesions, i l'ús d'aquests enzims ens hagués permès augmentar més la sensibilitat del test, detectant mutacions que no es detectarien en el procediment normal de la tècnica, tot i que determinats *adducts*, poden causar *AP sites*, i aquests, són alcalino-làbils, llavors són probablement ja detectats entre els trencaments de cadena vistos pel comet sense la digestió per l'enzim (Dušinská & Collins, 1996), això podria ser la raó més probable de la poca diferència entre els valors de Endo(+), i Endo(-), en aquest cas. Per altra banda, autors com Somorovská et al.(1999) comenten també, en el seu cas, que no hi havia un augment significatiu del dany al DNA amb la utilització dels enzims FPG o Endo III en les mostres d'individus exposats a estirè, que podria ser degut a un nivell molt elevat de SB (trencaments de cadena) induïts per l'estirè. Les bases danyades i les formamidopirines es podrien convertir en *AP sites* que es detectarien com a SB a elevades condicions alcalines. Pot haver, però, diferències amb els resultats obtinguts *in vitro*, o *in vivo*, i diferents pels dos tipus de substància. En el nostre cas podríem pensar el mateix, ens indicaria que el tipus de dany causat al DNA per aquest tòxic són trencaments ja detectats quasi tots amb el procediment normal del comet sense la incubació amb aquest enzim. O que no s'haurien produït les mutacions normals que sol causar aquesta substància, i que en principi, haurien de ser detectades, en part, per aquests enzims.

El nostre propòsit però, en aquest experiment, era veure la possible reparació del dany al DNA al cap de dues hores de l'exposició a la substància genotòxica. I es pot comprovar una disminució del dany en les dues dosis d'oxid d'estirè al cap de dues hores, essent més acusada en la concentració més elevada, podent atribuir-se a la reparació. Tal i com havia comentat abans, diverses de les lesions produïdes podrien ser reparades (diversos tipus d'*adducts* i oxidacions o altres alteracions de les bases; Chakrabarti et al.1997; Koskinen et al.2000a).

---

En el cas on la dosi és més elevada, i on la quantitat de dany és molt més gran, veiem una disminució del dany molt més marcada al cap de les dues hores, atribuint-la a la reparació, i arribant a nivells similars als obtinguts en les concentracions més baixes un cop reparades al cap de dues hores, que són valors també quasi similars als controls. Essent doncs, tan sols una mica més grans que els controls, poden indicar que aquest tipus de lesions són reparades molt ràpidament, en tan sols dues hores. (Bastlová et al.1995, van veure un augment del dany amb l'increment de dosi en limfòcits humans tractats *in vitro*, i una disminució al cap de 1-2 hores, aconseguint un nivell semblant al control a les 24 hores d'incubació en un medi fresc). Potser en més hores es podrien reparar totes les lesions que són detectables pel comet test, o potser ja no, perquè quedarien algunes que no serien reparables. Tal i com indiquen Koskinen et al. (2000a) hi ha diversos *adducts* causats per l'exposició a l'òxid d'estirè que poden ser reparats, i altres no. Els trencaments de cadena causats per exemple, per radiacions ionitzants són eficientment reparats en varis tipus cel·lulars (Collins et al.1997b; Olive 1999; Rojas et al.1999), tot i que els SB són induïts directament per tan sols un nombre petit d'agents que danyen al DNA, no són les lesions més abundants malgrat que són un intermediari comú en la reparació de moltes lesions (Dušinská & Collins, 1996). Aquí però, estariem parlant de molts diferents tipus de mutacions que es podrien traduir en aquests trencaments, i molts no podrien ser ja reparats, o sí, però de manera més lenta. En la diferència de valors amb incubació o sense de l'enzim, a les dues hores per aquesta dosi, és més gran el nombre de trencaments detectats pel comet + Endo respecte al del comet sense enzim, indicant-nos d'alguna manera que hi ha una acumulació de dany degut a llocs apurínics/pirimidínics, o bases oxidades, que no s'haurien pogut reparar encara a les dues hores; segurament, aquestes lesions siguin més persistents que les altres - trencaments de cadena- (tal com comenta també Collins et al.1997a, per les lesions sensibles a FPG, en mostres de limfòcits digerides per l'enzim FPG; Bánath et al.2001, indica que la reparació de bases danyades és més lenta que la re-unió dels trencaments de cadena; Kassie et al. 2000, fa referència a que els SB detectats pel comet test, poden ser reparats en 30 minuts, en cultius de limfòcits exposats a unes determinades substàncies), o com ja he comentat, irreparables.

#### 4.2.d.Conclusions:

1. Es pot veure un efecte atribuïble a la reparació, en la mesura del dany al DNA pel comet test al cap de dues hores de l'exposició dels fibroblasts HEL a òxid d'estirè, al mostrar una disminució del nombre de trencaments detectats pel SCGE.
2. Confirmant el primer experiment (apartat 4.1), es pot observar un augment del dany a major concentració de SO.

#### Incís:

Els dos experiments anteriors (apartats 4.1 i 4.2), van ser realitzats en un altre laboratori (Dr.Štětina), i amb la col·laboració del personal d'aquest. Aquests experiments junt amb els següents es van realitzar dins un projecte d'aquest laboratori, essent molt més complex i llarg del que presento.

---



### •4.3.Tractament amb òxid d'estirè en ratolins NMRI

#### 4.3.a.Introducció:

Continuant en la línia d'estudi sobre l'efecte genotòxic i la cinètica de reparació del dany produït per l'exposició a diferents concentracions d'òxid d'estirè *in vitro*, es va voler fer una sèrie d'experiments encaminat al mateix tipus de proves amb la utilització del Comet test *in vivo*, en ratolins exposats a SO.

#### 4.3.b.Material i Mètodes:

Es va realitzar el comet test en mostres de limfòcits i de fetge de ratolins NMRI mascles, exposats a una concentració d'òxid d'estirè d'1mM/kg. Es van extreure les mostres en els intervals de 3, 12, 24 i 48 hores. Es va fer un grup control a les 3 hores i un altre a les 24 hores. Es pretenia veure la cinètica de dany i de reparació *in vivo*, amb la utilització també de l'enzim Endonucleasa III per aconseguir un augment de la sensibilitat del test. El nombre d'animals per grup estava entre 6 i 7.

Es van injectar els ratolins (v.i.p.) amb 10µl /g d'una dilució d'òxid d'estirè amb oli d'oliva i amb DMSO al 10%. Per dissoldre i injectar aquesta substància es va necessitar fer aquesta dissolució amb oli d'oliva, encara que hagués estat millor utilitzar oli de blat de moro, ja que l'oli d'oliva té uns agents antioxidants que pot fer un efecte protector del dany oxidatiu que pugui causar l'òxid d'estirè. Es va fer també la dilució amb DMSO, ja que en experiments anteriors s'havia utilitzat per a fer la dissolució, i es va voler continuar per poder comparar amb els resultats anteriors, però, cal recordar que el DMSO a concentracions elevades és perjudicial, tot i així es va utilitzar aquí perquè les concentracions no van ser elevades, i es considerava que no els podia afectar massa. Als controls se'ls va injectar oli d'oliva i DMSO.

. Extracció de les mostres:

Es van anestesiar els ratolins amb la injecció intraperitoneal de pentobarbital (0.1ml/10 g de pes de l'animal, encara que va caler donar-ne una mica més perquè potser degut a l'oli, costava més que s'adormissin). Es va dur a terme la dissecció, traient directament del cor tota la sang que es pogués, fins a 1.5-2ml amb una xeringa heparinitzada i es guardava en fred un moment per al posterior aïllament dels limfòcits. Es va agafar una part petita de fetge que es va mantenir en fred en 4ml de PBS.

.. Per a la preparació del pentobarbital:

A partir de l'ampolla de 500mg, s'afegeix 10ml de solució fisiològica, i 10 ml d'aigua per injecció. Per a ratolins es preparen dilucions amb 1ml d'aquesta solució amb 2ml de la solució fisiològica i 2 de l'aigua per a injecció.

---

. Aïllament de limfòcits:

- En un tub amb 1.5 ml de Ficol i Verografin(\*), es posa a poc a poc la sang, que degut a una menor densitat queda a sobre del ficol.
- Es centrifuga a unes 1900 rpm (400g) durant 30 minuts. Per gradients de densitat es separen els limfòcits, queden en una línia blanca que s'aspira amb cura amb una pipeta i es posen en un tub, on s'hi afegeixen uns 10 ml de PBS.
- Es centrifuga a 1200 rpm durant 5 minuts, per a fer un rentat.
- Treure el sobrenedant i tornar a omplir amb PBS per a un segon rentat, barrejar bé, i centrifugar 5 minuts més.
- Es decanta el sobrenedant i s'afegeix 1'5ml de PBS estèril per 1 ml de sang, per a aconseguir la dilució necessària pel comet test. I d'aquí es passa a fer la segona capa d'agarosa amb 35µl de la suspensió cel·lular i 85µl d'agarosa LMP.

(\*)En comptes de Ficol i Verografin (densitat:1.085g/ml), es pot utilitzar Histopaque 1077, per aïllar els limfòcits.

. Preparació de la suspensió cel·lular a partir del fetge:

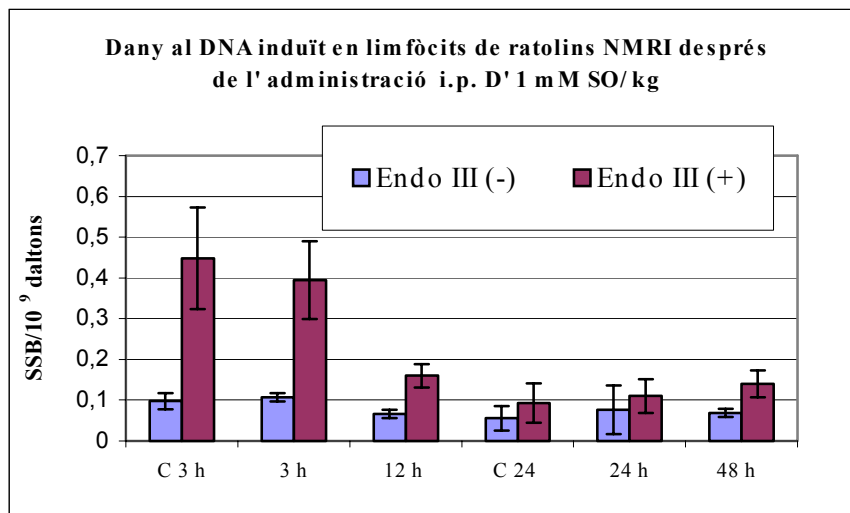
- La peça de fetge mantinguda en PBS, es posa en 2 ml de tripsina (a l'1%) i s'homogenitza amb un *potter*.
- Es deixa incubar durant 10 minuts a 37°C perquè actuï la tripsina separant les cèl·lules.
- Afegir 3ml de PBS + sèrum i barrejar bé. (proporció de 90%de PBS a l'1% amb 10% de CS, sèrum boví), deixar en gel per aturar l'acció de la tripsina, i esperar que precipitin els fragments grossos.
- Es treu el sobrenedant que es centrifuga durant 5 minuts a 1200 rpm.
- Es llença el sobrenedant i s'afegeixen 1.5ml de la solució de PBS + CS en fred i es barreja bé.
- D'aquí es treuen 0.5ml que s'afegeixen a 1.5ml de la solució de PBS+CS.
- D'aquesta suspensió cel·lular es treuran 35µl per portaobjectes, per a barrejar amb 85µl d'agarosa LMP dels que se n'agafen 85µl per a fer la segona capa .

La realització del Comet test és el mateix procediment que el descrit en els apartats anteriors d'aquest capítol. On en unes mostres es duu a terme el procés normal del Comet i en l'altre s'utilitza la incubació amb l'enzim Endonucleasa III.

No es van realitzar els comptatges al moment, així es van conservar les preparacions en caixes per a portaobjectes un cop assecades a temperatura ambient després dels tres rentats amb tampó neutralitzador Tris, i d'un rentat de cinc minuts amb aigua destil·lada. I les lectures es van fer sobre 50 cèl·lules per portaobjectes analitzats amb el sistema d'anàlisi d'imatges especial per al comet test, Lucia 4.51, prèviament hidratades les mostres en aigua destil·lada durant 5-10 minuts, i tenyides amb bromur d'etidi.

## 4.3.c.Resultats i Discussió:

**Fig.4.3.** Resultats per al comet test amb la incubació de l'enzim Endo III i sense, sobre limfòcits de ratolins que reben una dosi intraperitoneal de 1mM/kg d'òxid d'estirè:



Es pot observar en aquest cas que el valor del control a les 3 hores (C3h), és el més alt. Als controls se'ls administrava oli amb DMSO, però en principi no hauria de provocar cap dany considerable. En aquest cas però, ens trobaríem que seria aquest dany, major que quan hi ha l'administració del genotòxic, SO: òxid d'estirè. Altres factors poden haver intervingut en aquests resultats, com serien algun tipus d'estrès, per la manipulació de l'animal, o el fet de posar-los una substància estranya a l'organisme, o, degut a que en aquest control les mostres van processar-se de forma més lenta que en els altres casos, i podria haver acumulat danys addicionals deguts al processament d'aquestes durant la realització de la tècnica. Es podria comparar amb el valor del control al cap de les 24 hores de la dosificació d'oli amb DMSO (C24h) i, es pot veure un valor molt inferior a les 24h, que es podria interpretar com una reparació del que trobem a les tres hores del control, si és que aquest valor tan elevat és degut al dany (no causat pel tòxic pròpiament ja que no se'ls ha injectat SO, sinó que podria ser degut a l'estrès del moment de la punció, la injecció, i del que se'ls hagi injectat, per l'estat dels animals d'aquesta mostra, etc...) però que seria posteriorment reparat, o si no hi ha hagut res d'això, s'interpretaria tan sols com que ens indica uns valors basals de dany, i que detectaria algun problema en la mostra a les 3 hores. Sigui el que sigui, aquests controls a les 3 hores, no serien els esperats, i els podríem considerar no fiables del tot, perquè pot haver hagut algun problema durant en el seu processament.

A diferència de la figura 4.2 (de l'apartat anterior) on podíem observar poca diferència entre els valors obtinguts per al comet amb o sense Endo III, aquí es pot observar unes diferències, cal també dir que en aquest cas estem referint-nos a un cas *in vivo*, mentre que en els apartats anteriors eren *in vitro*, cosa que ens fa pensar, entre d'altres coses, en que hi ha una actuació a nivell de l'organisme a l'exposició del SO i pot fer canviar doncs, les condicions. (Per als resultats obtinguts en experiments anteriors, s'havia vist també aquesta diferència, es van

continuar així, els experiments amb l'ús d'aquests enzims). En comparació amb les proves anteriors amb ratolins, el valor de dany a les tres hores, en sang sencera, era superior ( $0.5 \text{ SSB}/10^9 \text{ da}$ ; dades no mostrades) al valor obtingut en aquest experiment pels limfòcits ( $0.1 \text{ SSB}/10^9 \text{ da}$ , pel comet sense Endo III, fins a  $0.45$  al comet amb l'enzim), cosa que ens podria fer pensar en una possible reparació durant el procés d'aïllament dels limfòcits que faria disminuir aquest valor de dany respecte al de sang sencera (on no es va mirar el valor amb la utilització de l'enzim). Més tard en un segon experiment on la concentració d'òxid d'estirè aplicada era el doble, es va veure que un cop més els valors eren baixos en controls de limfòcits a les 3h ( $0.1 \text{ SSB}/10^9 \text{ da}$ , dades no mostrades) respecte als valors obtinguts per a sang sencera ( $0.5 \text{ SSB}/10^9 \text{ da}$ ), cosa que ens faria tornar a pensar en aquesta possibilitat de la reparació durant el procés d'aïllament dels limfòcits, ja que el temps necessari de preparació de la suspensió cel·lular d'aquests per al comet test, és més gran que el requerit per al procés amb sang sencera; tot i mantenir les mostres en fred durant el procediment, cosa que podria ajudar d'alguna manera a que no es produís o que s'alentís la reparació. Pot haver per això moltes altres causes, aquesta només seria una especulació més.

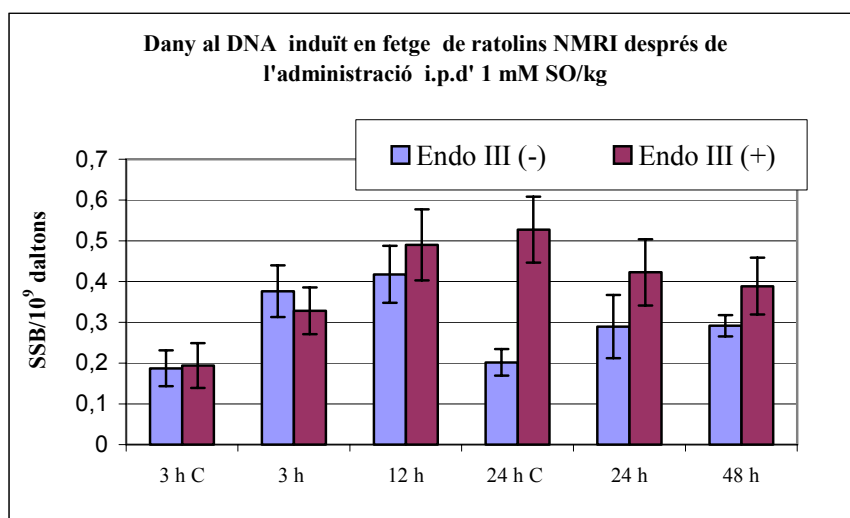
El que és evident però, és un augment del dany detectat amb l'enzim, que no es podia detectar amb el test sense la incubació amb aquest, i ens fa adonar de la possibilitat de la detecció de dany oxidatiu causat per el SO, que a més és reparable en un interval de temps relativament curt, arribant a valors de dany similars als controls (exceptuant els valors per al control a les 3 hores), i que es podrien considerar danys basals. (Bastlová et al.1995, en cultius cel·lulars exposats a SO, també trobava una ràpida reparació arribant a valors similars als controls al cap de 24 hores, tot i ser en casos i condicions diferents, i comentava que els valors poden ser diferents *in vitro* que *in vivo*, si es té en compte que hi podria haver una interacció entre el SO i el sèrum, o les proteïnes de la paret cel·lular reduint la seva accessibilitat cap el DNA, o que *in vivo*, en el cas de persones exposades a l'estirè, els limfòcits poden metabolitzar-lo produint espècies reactives d'aquest, com el SO, que estarien més a prop de la diana i podrien causar més danys que els esperats *in vitro*). Aquí podríem afegir-hi molts altres factors que poden intervenir en la diferència entre cultius o casos en viu.

La importància d'aquesta prova, doncs, rau en el fet que es volia veure, a part de la cinètica de dany, la de reparació d'aquest induït per SO en limfòcits. Es pot observar doncs, una augment de dany a les 3 hores que disminueix a les 12 hores de la dosificació als animals amb òxid d'estirè, i es mantindrien els valors de dany baix, basal o irreparable a les 24 i 48 hores. Dany que es detecta amb el dos tipus de comet test realitzat, però que és més evident en el que es fa la incubació amb l'enzim, detectant-nos bàsicament el dany oxidatiu provocat per l'òxid d'estirè i que no es detecta amb el comet sense incubació amb l'Endo III, en el que els resultats de l'exposició i reparació no són tan marcats. Aquesta ràpida recuperació fins als nivells basals, es podria relacionar d'alguna manera amb el que veien Vodička et al.(2001a), en una exposició de ratolins NMRI durant diversos dies a SO per inhalació, en el que obtenen una ràpida desaparició dels nivells de SO en sang després de 30 minuts del tractament, canvia però, en una exposició repetitiva durant diversos dies, on es torna a donar un increment de la quantitat de SO en sang, segurament degut a la seva alliberació a partir de l'acumulació d'aquest en els greixos de l'animal. S'ha de tenir en compte però, que seria difícil relacionar aquestes observacions amb el nostre experiment, ja que la via d'exposició i concentracions, són molt diferents, com també la

dosificació, etc..., així també la resposta que pot tenir l'organisme a la diferent manera d'exposició pot ser diversa.

Els tòxics poden afectar de manera diferents els teixits o tipus cel·lulars d'un organisme, així doncs, es van recollir mostres de fetge dels mateixos animals, i es va fer el mateix que pels limfòcits, el comet test amb i sense tractament de l'enzim Endo III, obtenint els valors que es mostren a la gràfica següent:

**Fig.4.4.** Resultats del comet test amb la incubació de l'enzim Endo III i sense, sobre hepatòcits de ratolins que se'ls ha administrat intraperitonealment 1mM d'òxid d'estirè.



En el cas del fetge, es pot veure un valor baix de dany al control a les tres hores (3h C), mentre que hi ha una quantitat gran de dany en el control de les 24 hores (24h C, que es podria considerar dany oxidatiu, ja que es veu com a no detectat per el comet sense la incubació amb l'enzim). Però, segurament hi va haver algun problema d'estrès, de l'estat dels ratolins, del procediment de la tècnica, o algun altre paràmetre que podia haver alterat els resultats. Així, aquest dany no té perquè ser interpretat tan sols com a dany oxidatiu, (sí que ho seria si poguéssim descartar les errades que hi hagin pogut haver, i ho comparéssim amb els que no s'ha realitzat la incubació amb l'enzim), però també podem esperar que hi hagi hagut altres factors que intervinguin en aquests resultats o dany d'aquestes mostres concretes.

Si continuem observant els valors dels controls a les 3 hores (amb i sense Endo III) i a les 24h (sense Endo III), que podem considerar com a valor de dany basal, com també si ens fixem amb els altres intervals de temps on es pot destacar el valor de dany degut a l'exposició a SO, al comparar amb els resultats en limfòcits (Fig.4.3) per als mateixos casos, podem notar que són valors una mica majors per al fetge que pels limfòcits (Fig.4.3). Més que dir que la injecció de SO podria causar un major efecte al fetge que als limfòcits, partint però, d'un dany basal més elevat en fetge, podríem dir que reaccionen diferent o que els afecta de manera diferent, cal tenir en compte moltes coses, com són la manera d'injectar el tòxic, la seva distribució a l'organisme, etc... Ja havia comentat, que el fetge és un dels òrgans amb més activitat destoxicadora del SO,

podem veure també, una disminució en el dany a partir de les 12 hores del tractament, mentre en limfòcits era anterior i molt més evident, en aquest interval.

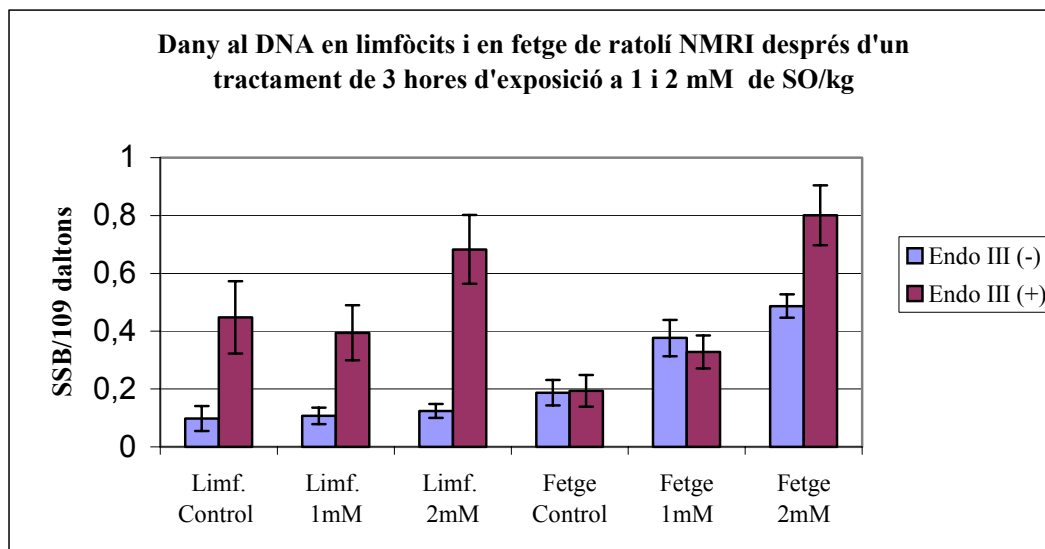
Es pot observar a la figura 4.4, un augment del dany a partir de les tres hores fins a les 12 hores, que començaria a disminuir de forma poc notable a les 24 i 48 hores mantenint-se més o menys estable, i essent superiors als valors control, pel que en podríem considerar que són lesions no reparables o que caldria més temps per a ser reparades. A diferència del que trobàvem en limfòcits (Fig.4.3), on quedarien afectats de forma més ràpida, notant valors de danys a les tres hores, que serien més ràpidament reparats, mostrant ja valors més baixos de dany a les 12h degut als processos de reparació.

En un experiment posterior es van veure valors similars en aquests intervals de temps, o sigui que els valors de dany al fetge serien elevats, segurament perquè aquest tòxic afectaria de manera diferent (i potser més) al fetge que als limfòcits, tot i que també es va poder veure un valor basal més elevat en fetge, que és important tenir-lo en compte en la interpretació dels resultat. La reparació del dany causat induït per SO en el cas del fetge seria menys marcada que en el cas dels limfòcits en els intervals estudiats.

En aquest gràfic també es pot observar la diferència entre els valors del comet en les mostres incubades amb l'enzim i les que no, indicant doncs que l'ús d'aquest enzim ens incrementaria la sensibilitat del comet al poder detectar més tipus de mutacions, en aquest cas, de tipus oxidatiu.

Si comparem amb un altre experiment on es va repetir el mateix per a una dosi de 2 mM de SO en ratolins, en que es recullen les mostres de limfòcits i fetge a les tres hores de la injecció, per a la realització del comet test amb i sense la incubació amb l'endonucleasa III; amb els resultats obtinguts en l'anterior experiment a dosi de 1mM i els controls, reflexats en les figures 4.3 i 4.4 per a limfòcits i fetge respectivament, obtenim el següent gràfic:

Fig.4.5.



(Aquest gràfic mostra els valors de les mitjanes dels trencaments SSB  $\pm$  SE, com les altres gràfiques d'aquest capítol).

Mirant aquest gràfic el control en limfòcits en la dosi de 1mM, agafat de l'experiment anterior (Fig.4.3), podem recordar que va donar un valor molt elevat a les 3 hores d'exposició per a l'endonucleasa III, (podent haver hagut algun error en la tècnica en aquest punt o ser degut a algun tipus d'estrès que més endavant podria ser reparat, cosa que ens ho faria pensar si observem els valors dels controls a les 24 hores - fig.4.3 - que eren inferiors i indicarien aquesta possible reparació. Aquests valors tan grans podrien ser deguts a algun altre factor, com ja he comentat abans, no sols algun error en el procediment de la tècnica, sinó que cal recordar que els limfòcits són alterables per molts factors, podent sofrir un dany ràpidament, que per altra banda, podrà ser reparat en poc temps). De tota manera, encara que partim de valors elevats en el control per al comet incubat amb Endo III en limfòcits, es pot veure en aquest gràfic, com amb una concentració superior de SO, el dany augmenta; un augment de dany en limfòcits que no haguera estat detectat en aquest cas, si no s'hagués realitzat la incubació amb l'enzim per augmentar la sensibilitat del test, i el que ens podria estar indicant és que aquest dany es de tipus oxidatiu. Ja que els valors sense la incubació amb l'Endo III, en aquest cas dels limfòcits, són tots molt baixos per a les dues dosis. Aquests valors baixos, no concorden gaire, si els comparem amb altres resultats obtinguts anteriorment en altres experiments (no mostrats) on per a les 3h d'exposició a 1mM de concentració hi havia una quantitat de dany pels limfòcits de 0.3, i per a 2mM, 0.54, mentre que en aquesta gràfica tenim valors de l'ordre de 0.1 per a dosi 1mM, i d'aproximadament 0.12 per la dosi de 2mM. Es pot haver donat doncs, algun error en la preparació, en el comptatge o en el procediment, o no, caldria aclarir aquest punt.

Pel cas del fetge s'observa també un increment del dany amb l'augment de concentració del genotòxic, i una mica més, per a la incubació amb l'enzim, detectant doncs, més tipus de dany, fent més sensible la tècnica, encara que la diferència de valors donats amb o sense l'enzim, no sigui gaire elevada ni tan marcada com pel cas dels limfòcits en aquest cas. Es podria pensar, en un diferent tipus de dany (causat per SO) detectat en aquests dos tipus cel·lulars, o que el dany

estaria provocat d'una manera diferent, o inclús, que seria reparat desigualment, (unes lesions podrien estar reparades més ràpidament al fetge degut a la seva elevada capacitat detoxicadora, que en limfòcits). Així la interpretació és difícil, es podria dir, en aquest cas, que el tipus de dany induït per SO detectat pel SCGE+Endo III en limfòcits, per exemple, seria més de tipus oxidatiu (parlant sempre de lesions sensibles a l'endonucleasa III, ja que pot haver altres tipus de mutacions que no serien detectades per aquesta, podent ser danys oxidatius o no, i que amb la utilització d'un altre enzim hagueren pogut ser detectats potser), comparat amb el del fetge pels resultats obtinguts en aquest cas; o que aquests, justament haurien sigut reparats de seguida en el teixit hepàtic, no podent ser detectats, o no s'hi haurien produït; al fetge es podria haver donat altres tipus de danys, oxidatius o no, que no fossin sensibles per aquest enzim; (hauria estat interessant provar també de veure les lesions específiques detectades per l'enzim FPG). Tot això, són un cop més només idees del que podria passar, seria interessant fer més experiments i poder conèixer una mica més el que succeeix.

Un vegada més, podem veure un major valor basal de SSBs en el fetge que en limfòcits. Això, segurament és degut a la diferent dinàmica, i tipus de funció, entre d'altres característiques, d'aquests dos tipus cel·lulars. Tot i que aquest valor no necessàriament hauria de ser interpretat com a dany al DNA.

Els tòxics poden afectar de diferent manera els diversos tipus cel·lulars. En aquest cas es va escollir justament per a mostrejar el fetge, via important en la destoxicació (o activació) de determinades substàncies tòxiques, i per tant, un dels principals òrgans diana per aquests tipus de reaccions i oxidacions. Com també es va escollir els limfòcits per a la seva importància, no sols en ser una via important de transport dels possibles tòxics, sinó també per la importància d'aquest tipus cel·lular en quan a la funció en l'organisme, i amb tot fa que sigui un indicador dels possibles efectes en l'organisme exposat a determinades substàncies tòxiques.

---



**4.3.d. Conclusions :**

1. En un experiment *in vivo* s'ha pogut observar (igualment com en els apartats anteriors en cultius cel·lulars), que hi ha un augment del dany al DNA mesurable amb el comet test, a l'incrementar la concentració d'òxid d'estirè, i per als dos tipus cel·lulars utilitzats, mostres de limfòcits i de fetge de ratolins.
2. Hi ha uns valors de nombre de comets basals diferents pels dos tipus cel·lulars, essent més elevats en el cas del fetge.
3. S'ha trobat en alguns casos, valors elevats en els controls, mesurats per al comet test amb la utilització de l'enzim Endo III, podent explicar el cas, com una acumulació temporal de dany oxidatiu, provocat per una situació d'estrès, o d'alteració, que seria reparat més endavant, o per algun problema en el processament de les mostres, o en l'estat dels individus mostrejats.
4. És detectable major nombre de dany amb l'ús de l'enzim Endonucleasa III en el comet test, que pel procediment normal de la tècnica, a les dues dosis provades, i en els dos tipus cel·lulars. Essent més elevada la diferència entre el comet amb Endo III i sense (on la diferència entre els dos valors donaria el nombre de dany sensible a l'enzim, oxidacions de bases pirimidíniques), pel cas dels limfòcits, i menor en el cas del fetge.
5. Ja a les tres hores es pot observar que el SO indueix dany al DNA, incrementant a l'augmentar la dosi, tan en fetge com en limfòcits (en una exposició intraperitoneal d'aquesta substància en ratolins). Hi ha una disminució del dany atribuïble a la reparació al cap de les 12-24 hores, més marcada en el cas dels limfòcits. (En limfòcits a les 12 hores ja ha disminuït el valors de dany arribant a valors similars als control, mentre que és a les 24 hores en el cas dels hepatòcits, i encara queda una mica lluny dels valors control).

**•4.4. Algunes consideracions a la tècnica.**

Quan es posa en marxa una tècnica nova, en la que a més no hi ha un protocol estandarditzat, (on en cada laboratori s'utilitza amb algunes petites variants particulars), hi ha una sèrie de proves per a millorar la tècnica i també hi ha moltes errades fins que no es domina una mica. Cal mencionar a vegades aquests tipus d'errors ja que pot servir per als que continuen avançant en la tècnica, no repetir-ho, i veure també el que passaria. Així doncs s'ha considerat important en aquest capítol fer un apartat dedicat als errors (fallades tècniques que es van produir en experiments que segueixen la línia de les proves anteriors, o sigui, en l'administració de SO a ratolins per a mesurar la reparació), considerant-los interessants a comentar, d'entre els diversos que s'han anat produint durant el transcurs i realització de la tesi.

---

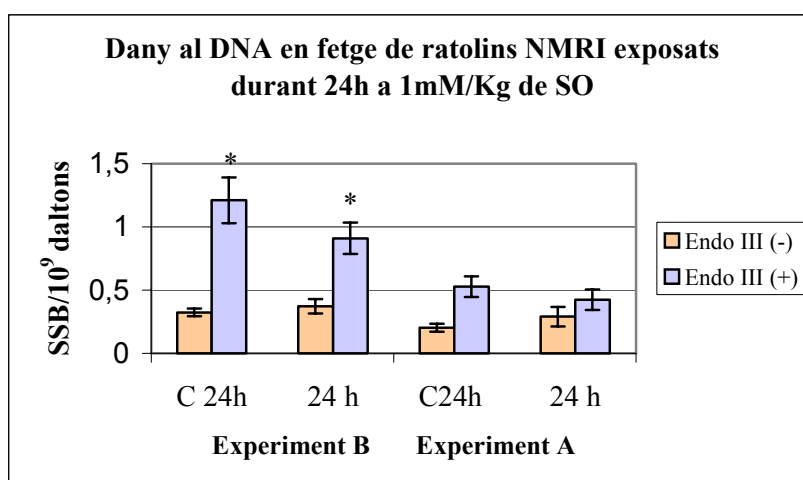
Presento doncs dos diferents casos, i un incís sobre les variacions de la tècnica.

Seguint els experiments anteriors fets amb els ratolins que se'ls administra òxid d'estirè (SO,1mM/Kg) i altres en que no, actuant de controls. I recollint les mostres a diferents temps per a veure la reparació. Utilitzant una barreja d'oli d'oliva + 10% DMSO i SO pels tractats i només oli d'oliva i DMSO pels controls. Ens trobem amb dos diferents tipus d'errades tècniques interessants de comentar :

▪ 4.4.1.

Prova realitzada al cap de 24 hores de la injecció intraperitoneal de 1mM en ratolins (a la que anomenarem: **Experiment B**). On el problema es va donar durant la realització del Comet test en cèl·lules del fetge: les mostres per les que es fa la incubació amb Endo III, després de la incubació amb aquesta, es van estar una hora i mitja en tampó per a Endo III abans no es va dur a terme el desenrotllament i l'electroforesi, degut a un problema amb el tampó que s'utilitza en aquests passos i que va fer que no fos possible dur a terme el desenrotllament i l'electroforesi de seguida després de la incubació amb l'enzim com es fa normalment. En el gràfic següent es mostren els valors d'aquesta prova, i es comparen amb els obtinguts en l'apartat 4.3 d'aquest capítol (Fig 4.4) al que hem anomenat **Experiment A** al gràfic, per diferenciar-lo, i el qual està fet de la manera correcte que requereix el protocol:

Fig.4.6



Es pot observar en les mostres que es van mantenir en el tampó per Endo III durant una hora i mitja (Experiment B) uns valors més elevats de dany (\*) respecte als valors obtinguts anteriorment per un experiment realitzat seguint el protocol establert pel tractament amb l'enzim (Experiment A), en el que no es va cometre aquest error. Les mostres incubades amb l'enzim, es va suposar que al posar-les en aquest tampó per Endo, aturaria l'efecte de l'enzim, i les mantindria, es va decidir aquesta opció al trobar-nos amb el problema de no poder posar les mostres en el tanc d'electroforesi amb el tampó per al desenrotllament i posteriorment, l'electroforesi després dels 45 minuts de la incubació amb aquest. Llavors al

veure que van sortir aquests valors tan elevats de dany, i pensant en el que acabo de comentar, el dany no es deuria a una major acció de l'enzim, (ja que llavors es podria pensar en incrementar el temps de la incubació per incrementar la detecció dels llocs sensibles a l'enzim), sinó que podria ser degut a un increment de dany a les mostres causat o provocat durant la conservació en aquest tampó abans del desenrotllament.

No puc, però, explicar com el valor dels controls (C 24h) és superior, encara que lleugerament, en dany, al valor dels tractats amb una dosi d'òxid d'estirè (24h) en aquest experiment B. Es podria però, comparar amb els valors de l'experiment A, en el qual està seguit correctament el protocol de la tècnica i on es pot apreciar també un valor lleugerament superior en el control que en el tractat al cap de les 24 hores d'exposició a SO, tot i que són molt similars, aquesta similitud es consideraria degut a la reparació del dany al cap de les 24 hores de la injecció, i la diferència, (tot i ser una mica major pel valor control) es podria considerar no significativa, considerant doncs, que s'haurien reparat quasi tots els danys.

De tota manera en aquesta prova només es pretén veure que no es pot realitzar aquesta "aturada" en el protocol (el fet de mantenir les mostres en tampó per Endo III després de la incubació amb l'enzim i abans del pas de desenrotllament) perquè varia els resultats, veient la comparació entre els valors tractats com també pels controls d'aquest experiment amb els valors obtinguts per l'experiment A en el que s'ha seguit correctament el protocol.

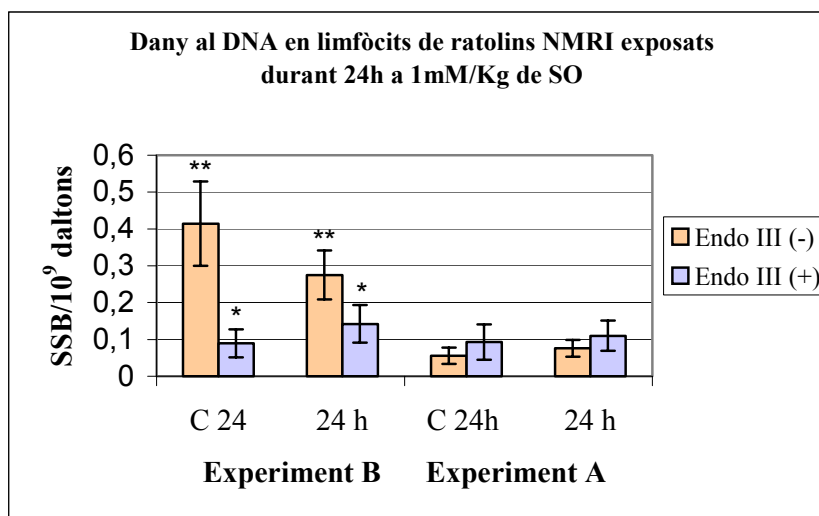
### **Conclusions:**

- De vegades durant el procediment de realització d'un assaig, cal conèixer en quins moments es pot aturar el procés en cas de necessitat sense que influeixi en els resultats i en quins no. Aquest error que se'ns va produir, ens podria fer pensar en un punt per aturar el procés en un cas si convenia, investigant al mateix temps, els resultats que es donarien. Es pot veure però, en aquest cas, que no és correcte aturar el protocol en aquest pas, no és bo mantenir les mostres (de cèl·lules pertanyents al teixit hepàtic de ratolins, en aquest cas) en tampó per Endo III després de la incubació amb l'enzim i abans del desenrotllament i l'electroforesi, perquè s'alteren els resultats, sortint més elevats que els trobats altres vegades en experiments realitzats seguint el protocol establert, i on no podem atribuir el major dany detectat a un augment de sensibilitat de l'enzim, sinó més aviat a un increment del dany degut a altres factors que ens farien interpretar erròniament aquests resultats.
-

▪ 4.4.2.

En un segon cas, durant el procés del comet test en mostres de limfòcits de ratolins injectats amb 1mM d'òxid d'estirè al cap de 24 hores, es va donar un error en la preparació del tampó per a l'electroforesi i desenrotllament, es va preparar amb tan sols la quantitat corresponent d'EDTA i sense la sosa. La sosa faria aconseguir el pH alcalí que es necessita per a provocar el desenrotllament i relaxació de la doble cadena, i també seria necessària per a funcionar l'electroforesi posteriorment. Així doncs, abans de descobrir l'error, es van mantenir durant un cert temps les mostres en aquest líquid, per posteriorment, un cop alertats de l'error, continuar el procediment del comet test normalment utilitzat, es va dur a terme la fase de desenrotllament amb el tampó preparat correctament i es va continuar el protocol seguint els passos esmentats en els apartats anteriors d'aquest capítol. Es va pensar que el fet de mantenir en fred i fosc les mostres, en aigua destil·lada i la petita quantitat d'EDTA sòdic no les alteraria significativament, ja que la solució està a un pH neutre i en principi no tindria perquè danyar les mostres. Però es va poder veure que no es va donar l'esperat, tal com es reflexa en la gràfica següent (Fig.4.7), on es va anomenar aquest **Experiment B**, i es va comparar amb resultats obtinguts d'un experiment en el que es va seguir el protocol establert correctament (**Experiment A**) que coincideix amb el comentat en l'apartat 4.3 d'aquest capítol (Fig 4.3).

Fig.4.7



En l'experiment B separarem també en dos diferents temps durant el quals es van mantenir les mostres en aquesta aigua amb EDTA: les mostres que no es van incubar amb l'enzim (corresponent a les marcades com a Endo III (-) ) es van estar en aquesta aigua durant una hora i mitja, obtenint valors molt elevats de dany (\*\*), mentre que les mostres incubades amb l'enzim, es van mantenir en aquesta aigua durant tres quarts d'hora (\*). Es pot observar que els valors de l'experiment B, en quan als que van estar més temps(\*\*), són molt superiors als de l'experiment A, això ens indicaria doncs, que hi ha algun dany que es produeix a les mostres de DNA dels limfòcits de ratolins durant aquest temps en aquesta solució. Però en canvi, els valors per les mostres de l'experiment B en que es va incubar amb l'enzim Endo III

i que es van mantenir 45 minuts en aquesta solució (\*), són tan sols lleugerament més elevades que les mostres de l'experiment A, això ens podria indicar que durant 45 minuts, encara no es produeix el dany degut a l'estar immerss en aquesta solució, però si el temps es duplica, els valors de dany augmenten d'una manera espectacular.

Si recordem que el tractament enzimàtic durant la realització del SCGE fa que es detecti més quantitat de dany que en les mostres processades pel comet test utilitzat de forma normal sense la incubació amb aquest enzim, s'esperaria que en aquest cas detectéssim també valors més elevats de dany en les mostres tractades amb Endo III, i si a aquests valors superiors, els afegim els obtinguts pel dany causat pel fet d'estar un determinat temps en una solució d'aigua amb EDTA després de la incubació de l'Endo III, hauria de ser un nombre més elevat de trencaments els que detectaríem, quan justament aquest no és el cas, sinó al contrari, detectem molt més dany en el cas del comet sense Endo III, que amb l'enzim. Així doncs, un cop més, indica la importància del temps, en aquest cas, que podria portar a que potser hauria fet malbé les mostres d'alguna manera, produint algun tipus de dany al DNA.

Curiosament però, comentant l'experiment B, trobem un major valor de dany en el control a les 24 h que no pas en el tractat a les 24 hores, pel cas del SCGE sense Endo III, quan semblaria que hauria de ser el contrari, ja que les mostres tractades tindrien un dany addicional a l'estar exposades a SO, tot i que al cap de les 24 hores s'haurien reparat quasi ja totes, tal com hem vist en l'apartat 4.3, Fig.4.3., mentre que el control podria haver acumulat lesions per algun altre factor que farien que en aquest cas fos major el valor, o el fet que aquestes mostres per alguna raó fossin més sensibles al dany que pugui causar el fet d'estar en aquesta solució durant aquest cert temps. Si observem l'experiment A, veurem que els valors del control i els tractats a les 24 hores són molt similars, la qual cosa es pot atribuir a la reparació, i llavors haguera sigut el més esperable en aquest cas B també, però no un valor tan elevat en control respecte a les 24 hores d'exposició a SO, tot i que es pot explicar pel fet que són individus diferents i potser el dany basal hauria estat diferent o les seves condicions, partint ja d'un major dany que els altres, tot el que pugui dir-ne, però, poden ser sols especulacions sobre un experiment que no es pot considerar vàlid pel fet de no haver seguit el protocol correctament i el de veure valors més elevats als obtinguts en altres experiments duts a terme de manera correcte. De tota manera, he pogut observar diversos problemes amb els controls en diferents experiments, i moltes vegades, no són explicables, perquè els controls mostren valors superiors als individus o mostres tractades amb una determinada substància.

En aquesta discussió de l'experiment, però, no es pretenia ni es considera més important la comparació de les diferents mostres tractades amb òxid d'estirè al cap de 24 hores de l'exposició (24h) amb els controls (C24h), cas similar, ja discutit en l'experiment de l'apartat 4.3, sinó que es volia comparar els resultats erronis obtinguts amb aquesta variant del protocol degut a un error en el procés de la tècnica.

---

**Conclusions:**

- Tot i que en la nostra hipòtesi es va pensar que el fet de deixar les mostres de limfòcits de ratolins en aquesta solució (d'aigua destil·lada i EDTA) no alteraria els resultats de l'experiment, es va poder comprovar que sí els afecta, sobretot quan més temps es deixen en aquesta solució, es detecta un major dany al DNA, mesurat en nombre de trencaments de cadena.

**▪ 4.4.3. Un Incís:**

En altres experiments que es van dur a terme durant la realització de la tesi, s'han provat diferents opcions o s'han trobat diferents problemes que ens han servit per donar-nos compte de les possibilitats de variació o no de la tècnica. Es pot comentar casos com mantenir les mostres en desenrotllament més temps dels 20 o 40 minuts, o mantenir-les en electroforesi més temps dels 20 o 30 minuts màxims (degut a un fusible fos de la font d'alimentació, o degut a un tall de corrent durant l'electroforesi, un trencament del fil de platí del tanc, etc...), que fa que en els resultats s'obtinguin tot de formes amb cometes, indicant que hi ha un efecte perjudicial en aquest procediment, més que un augment de sensibilitat del test al tenir en aquests passos de desenrotllament o electroforesi més temps de l'indicat. Tot i que cal comentar que per a cada laboratori hi ha les petites diferències en el protocol en quan a petits canvis en la preparació de reactius o en els temps de passos com la lisi, el desenrotllament, l'electroforesi, o en voltatge i amperatge de l'electroforesi, són petits canvis que no afectarien potser massa els resultats (sempre i quan es faci de la mateixa manera per cada grup d'investigació, cal explicar com es fa) i que s'adapten a les condicions de cada laboratori, i potser en diferents laboratoris no es pot fer de la mateixa manera exactament perquè el que no afectaria en un lloc, afecta en l'altre, pot ser degut a les diferents marques de reactius, l'aigua utilitzada en la preparació de les solucions, la temperatura del laboratori, etc... Per posar un petit exemple dels molts que podria anomenar, en l'estudi dut a terme per Yendle et al.(1997), van fer estudis sobre el temps de desenrotllament, en el que van veure que de 18 minuts fins a dues hores, no variava massa els resultats, mesurats en longitud de la cua i %DNA, però a partir de les quatre hores, sí es veia diferències, cues més llargues i més quantitat de DNA a la cua, on la diferència augmentava molt entre els controls i les mostres exposades a un tòxic.

Per altra banda, ens trobem inclús en laboratoris en que el temps de desenrotllament i electroforesi són menors, fins a 10 minuts i 15 minuts respectivament (Sasaki et al. 1997a-b; Miyamae et al 1998, entre d'altres), però cal un temps mínim pel desenrotllament (Tice et al.2000). Altres autors l'augmenten en segons quins casos, considerant que el temps de desenrotllament pot afectar la sensibilitat del SCGE (*in vivo* per exemple, tal com comenta Sasaki et al.1997b), i pot fer llavors, que no es detectin algunes lesions alcalino-làbils en aquest pas si és de poca durada,(el mateix autor però, diu que, en ocasions són necessaris 60 minuts de desenrotllament alcalí, enlloc de 20, perquè en aquest temps, no totes les lesions alcalino-làbils són expressades com a SSB). Així temps curts, podrien potser fer baixar la sensibilitat del test. Ja havia comentat en capítols anteriors que hi ha varis estudis respecte a

tots els temps dels diferents passos, i diversos autors ho comenten (un altre exemple, Vijayalaxmi et al.1992).

Pels nostres casos, al treballar al nostre laboratori, amb els temps de 20 minuts pel desenrotllament, i 20 per l'electroforesi, si els deixàvem més estona, trobàvem més nombre de cometes, es podria dir doncs, que hi ha un augment de la sensibilitat, però, hi havia massa nombre de cometes, així que vam aplicar des del principi sempre aquests temps, i així es va fer, per a poder comparar els diferents experiments realitzats també. Però, al treballar en un altre laboratori, en que seguien un protocol una mica diferent, fent 30 i 40 minuts respectivament, es van fer els experiments seguint els seus protocols. Ja he comentat que hi ha uns rangs de variació entre els temps, igualment com entre la manera de preparar els reactius, acceptables per a tots els casos, i que poden estar adaptats en ocasions al que es vol trobar, d'aquesta manera torna a reflexar la necessitat d'explicar com es dur a terme el comet test, per a comparar entre els diferents laboratoris.

Ja havia fet referència anteriorment al temps de lisi, tot i que és permès fins a tota una nit sense observar canvis, o 18 hores (Yendle et al 1997), sense augmentar el nombre de cometes, per a la nostra experiència, no seria recomanable més de 6 hores (hi ha un augment de cometes si la lisi s'allarga més de 6 hores; tal com també comenta Banáth et al.2001; i Štětina, comunicació personal), però hi ha autors que el fan allargar fins a setmanes (Da Silva, 2000a,b,c).

Es pot considerar que algunes de les variacions entre laboratoris són petites i no afecten els resultats (hi hauria un rang de variació), mentre que és possible que siguin inclús necessàries en molts casos, cal però, explicar en cada cas com s'ha realitzat el comet test, tots els seus passos, i la composició dels reactius, per tal de poder comparar entre els diversos grups.

No sols hi ha doncs, tot de variacions entre els diferents llocs, i caldria una estandardització de la tècnica, sinó que com ja he comentat, hi ha cada cop més, la introducció de modificacions per ampliar l'àmbit d'estudi amb aquesta tècnica, i el fet que es pugui variar tant, també permet adaptar-la a allò que es vol veure, a les diferents mostres, i diferents llocs. Però és necessari poder establir un protocol comú entre tots els laboratoris i posar-se d'acord en les mesures a utilitzar pels comptatges, i en tots els altres subjectes de problemàtica de la tècnica; poder validar l'assaig, i finalment que pugui ser reconegut com a una tècnica de mesura de la genotoxicitat aplicable de forma usual en les bateries de tests utilitzades per aquestes finalitats. Mantenint la seva expansió en altres àmbits, i acceptant les modificacions per aquest fi.

### **Conclusió:**

- Seria necessària una estandardització de la tècnica. Mentrestant, cal explicar tots els passos del protocol amb detall, i també la preparació dels reactius, per a poder comparar entre diferents laboratoris.
-

---

**\* Conclusions:**

1. El *Comet test* realitzat en mostres de sang circulant d'*Apodemus sylvaticus* i en cel·lomòcits d'*Allolobophora caliginosa*, demostra que pot ser utilitzat com a un indicador de la contaminació de tipus genotòxic de zones properes o pertanyents a un abocador de residus urbans.
  2. *Apodemus sylvaticus* i *Allolobophora caliginosa*, serien uns bons sentinelles per a la detecció dels efectes contaminants de tipus genotòxic en àrees afectades per un abocador respecte a unes control.
  3. Les mostres de les àrees d'influència de l'abocador mostren valors més elevats de dany al DNA que les controls. Valors mesurats amb el *Comet Test* i Test dels Micronuclis en *A.sylvaticus*, i amb el SCGE en *A.caliginosa*. De la mateixa manera, trobem diferències respecte els controls, en l'anàlisi realitzat amb el comet test en cel·lomòcits d'*A.caliginosa* exposats a mostres de terres contaminades - majoritàriament per metalls pesants – pel vessament de la mina d'Aznalcóllar.
  4. L'augment de divisió cel·lular causat per una regeneració, pot fer augmentar el valor dels resultats del *Comet test* com a falsos positius d'una detecció de dany al DNA. Tot i que les altres proves realitzades *in vitro* i *in vivo*, per a veure la possible influència de la divisió cel·lular en els resultats del comet test no ens han permès establir amb exactitud una relació quantitativa dosi/efecte, aquesta es pot intuir d'alguna manera a través dels resultats obtinguts.
  5. No queda clara, segons els nostres experiments, la possible interferència de l'apoptosi en els resultats de la tècnica. Cal un estudi més a fons del significat de l'apoptosi i necrosi com a causa de possibles imatges que emmascarin els resultats de la tècnica. D'altra banda, també seria necessari un coneixement més aprofundit de la pròpia tècnica per a poder establir si aquesta resulta una eina útil per a la detecció i diferenciació d'ambdues formes de mort cel·lular. Semblaria però, que d'alguna manera, els resultats del comet test es podrien veure influïts per l'aparició de cèl·lules en primers estadis d'apoptosi.
  6. El valor basal de comets detectat pel SCGE per a diferents espècies animals és diferent.
  7. El *Comet test* proporciona una correlació positiva dosi-efecte quan s'administren diverses concentracions de determinades substàncies, com l'òxid d'estirè.
  8. L'ús d'enzims de reparació (en el nostre cas l'Endonucleasa III), són una contribució important per a millorar la sensibilitat i especificitat de la tècnica.
-



9. L'estudi de la cinètica de reparació obra una sèrie de noves possibilitats en l'aplicació de la tècnica, com la seva utilitat en millorar la mesura dels efectes de les determinades substàncies genotòxiques i la interpretació d'aquests.
  10. Degut a que el SCGE és una tècnica recent, caldria efectuar estudis més amplis sobre el seu mecanisme i funcionament, no ben coneguts encara, tot i el seu gran i creixent ús en estudis de genotoxicitat, i la seva expansió a diferents àmbits i aplicacions. Seria necessària una estandardització de la tècnica i de les seves aplicacions, a la seva futura acceptació per part dels organismes reguladors.
-

**\* Bibliografía:**

- **Abdul A.M.M., Bouché M.B. (1992).** Earthworm contribution to ecotoxicological assessment. *Acta Zoologica Fennica*, 196:307-310.
  - **Álvarez Sánchez J. (1971).** Los oligoquetos terrícolas de la Península Ibérica. (Tesis doctoral). Serie A, nº149. Facultad de Ciencias. Sección de Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
  - **Alzalaga R., Mesas A., Ortiz L., Bayona J.M. (1999).** Characterization of organic compounds in soil and water affected by pyrite tailing spillage. *The Science of the Total Environment*, 242:167-178.
  - **Anderson D., Yu T.W., Phillips B.J., Schmezer P.(1994).** The effects of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human Lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, 307:261-271.
  - **Andreoli C., Rossi S., Leopardi P., Crebelli R. (1999).** DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Mutation Research*, 438:37-45.
  - **Angelis K.J., Dušinská M., Collins A.R. (1999).** Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 20:2133-2138.
  - **Ashby J., Tinwell H., Gulati D., Heddle J.A. (1990).** Overview on the study in relation to protocol design for the rodent bone-marrow micronucleus test. *Mutation Research*, 234(3-4):233-248.
  - **Ashby J., Tinwell H., Lefevre P.A., Browne M.A. (1995).** The single cell gel electrophoresis assay for induced DNA damage (comet assay): measurement of tail length and moment. *Mutagenesis*, 10(2):85-90.
  - **Aziz N.A., Morgan A.J., Kille P. (1999).** Metal resistance in earthworms; genetic adaptation or physiological acclimation. *Pedobiologia*, 43:594-601
  - **Baisch H., Bollman H., Bornkessel S. (1999).** Degradation of apoptotic cells and fragments in HL-60 suspension cultures after induction of apoptosis by camptothecin and ethanol. *Cell proliferation*, 32(5):303-319.
  - **Banáth J.P., Kim A., Olive P.L. (2001).** Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline comet assay. *Radiation Research*, 155:564-571.
  - **Belpaeme K., Cooreman K., Kirsch-Volders M. (1998).** Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutation Research*, 415:167-184.
  - **Bengtsson G., Gunnarsson T., Rundgren S. (1986).** Effects of metal pollution on the earthworm *Dendrobaena rubida* (Sav.) in acidified soils. *Water, Air and Soil Pollution*, 28:361-383.
  - **Beyer W.N., Chaney R.L., Mulhern B.M. (1982).** Heavy metals concentrations in earthworms from soil amended with sewage sludge. *Journal of Environmental Quality*, 11(3):381-385.
  - **Beyer W.N., Cromartie E.J. (1987).** A survey of Pb, Cu, Zn, Cd, Cr, As and Se in earthworms and soil from diverse sites. *Environmental Monitoring and Assessment*, 8:27-36.
-

- **Bhanoori M.**, Venkateswerlu G. (1998). The alkaline single cell gel electrophoresis: a new test for assessing DNA strand breaks in *Neurospora crassa*. *Mutation Research*, 405:29-34.
  - **Binderup M.L.**, Jørgensen V., Scott-Fordsmann J. (2001). Earthworms (*Eisenia veneta*) used in biomonitoring studies of soil pollution. International Comet Assay Workshop, July 2001, Ulm.
  - **Blastová T.**, Vodička P., Peterková K., Hemminki K., Lambert B. (1995). Styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA-adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis-Oxford*, 16(10):2357-2362.
  - **Bock C.** Dittmar H., Geimeinhardt H., Bauer E., Greulich D.O. (1998). Comet assay detects cold repair of UV-A damages in a human B-lymphoblast cell line. *Mutation Research*, 408:111-120.
  - **Bock C.**, Dube A., Greulich K.O., Gupta P.K. (1999). Identification by microscopically controlled comet assay of peritoneal macrophages in a mixture of peritoneal exudate for DNA strand break analysis. *Mutation Research*, 439:171-181.
  - **Borràs M.** (1986). Formol-saline as a cell conserving medium in the micronucleus test. *Stain Technology*, 57(4):59-60.
  - **Borràs M.**, Llacuna S., Flò D., Sánchez A., Górriz A. (1998a). Effect of sex hormones on iron distribution in the liver and spleen of overloaded male rats. *Laboratory Animals*, 32:290-297.
  - **Borràs M.**, Llacuna S., Górriz A., Nadal J. (1998b). Hematological and biochemical parameters in pollution-exposed mice. *Archives of Toxicology*, suppl.20,pp.189-195.
  - **Bouché M.B.** Lumbriciens de la France. (1972). Ecologie et systématique. Institut National de la Recherche Agronomique.(Paris). Annales de Zoologie.Écologie animale.
  - **Briónes M<sup>a</sup>J.I.**, Mariño F., Trigo D., Díaz Cosín D.J. (1991). Lombrices de tierra de Asturias, León, Zamora y Salamanca. I. Géneros *Allolobophora* y *Dendrobaena*. *Bol.R. Soc. Esp. Hist.Nat.(sec.Biol.)*, 87(1-4):151-173.
  - **Brotons L.**, Magrans M., Ferrús L., Nadal J. (1998). Direct and indirect effects of pollution on the foraging behaviour of forest passerines during the breeding season. *Canadian Journal of Zoology*, 76(3):556-565.
  - **Burch S.W.**, Fitzpatrick L.C., Goven A.J., Venables B.J., Giggelman M.A. (1999). In vitro earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial toxicity identification evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* , 62:547-554.
  - **Cabrera GL.**, Rodríguez DMG. (1999). Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutation Research*, 426:207-210.
  - **Červinka M.**, Půža V. (1995). Cellular and molecular stress regulation and Apoptosis. Apoptosis and necrosis: Dynamics of structural changes in cells cultivated in vitro after treatment with xenobiotics. *Toxicology in vitro*, 9(4):387-396.
  - **Chakrabarti S.**, Zhang X.X., Richer C.L. (1997). Influence of duration of exposure to styrene oxide on sister chromatid exchanges and cell-cycle kinetics in cultured human blood lymphocytes in vitro. *Mutation Research*, 395:37-45.
  - **Chmielewská E.**, Medved J., Kaderová E. (1998). A study of heavy metal accumulation in earthworms exposed to immissions along the south-eastern side slovnafit refinery. *Ekológia(Bratislava)*, 17(4):440-448.
-

- **Choucroun P.**, Gillet D., Dorange G., Sawicki B., Dewitte J.D. (2001). Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research*, 478:89-96.
  - **Collins A.R.**, Dušinská M., Gedik C.M., Štětina R. (1996). Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?. *Environmental Health Perspectives*, 104 (3): 465-469.
  - **Collins A.R.**, Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. (1997a). The comet assay and molecular mechanisms of mutagenesis. The comet assay: what can it really tell us?. *Mutation Research*, 375 : 183-193.
  - **Collins A.**, Dušinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlová K., Vaughan N. (1997b). Comet Assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation, and Applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis* , 30:139-146.
  - **Collins A.R.**, Olmedilla B., Southon S., Granado F., Duthie S.J. (1998). Serum carotenoids and oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 19(12):2159-2162.
  - **Collins A.** (2000). Measuring in vivo Oxidative damage: A practical approach. Lunec J. and Griffiths H.R. (Eds). John Wiley & Sons.
  - **Cooper E.L.** (1996). Earthworm immunity. En: Invertebrate immunology. Rinkevich B., Müller W.E.G. (Eds.). Springer-Verlag. (Berlin). pp. 10-45.
  - **Cotelle S.**, Ferard J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34(4): 246-55.
  - **Da Silva J.**, De Freitas T.R.O., Heuser V., Marinho J., Erdtmann B. (2000a). Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:270-278.
  - **Da Silva J.**, De Freitas T.R.O., Maninho JR., Speit G., Erdtmann B. (2000b). An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1):241-245.
  - **Da Silva J.**, De Freitas T.R.O., Heuser V., Marinho J.R., Bittencourt F., Cerski C.T.S., Kliemann L.M., Erdtmann B. (2000c). Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. *Mutation Research*, 470:39-51.
  - **Degrassi F.**, Tanzarella C., Ieradi L.A., Zima J., Cappai A., Lascialfari A., Allegra F., Cristaldi M. (1999). CREST staining of micronuclei from free-living rodents to detect environmental contamination *in situ*. *Mutagenesis*, 14(4):391-396.
  - **Delain E.**, Fourcade A., Poulin J.C., Barbin A., Coulaud D., Le Cam E., Paris E. (1992). Comparative observations of biological specimens, especially DNA and filamentous actin molecules in atomic force tunnelling and electron microscopes. *Microscopy, Microanalysis, Microstructures*, 3:457-470.
  - **Delaney C.A.**, Pavlovic D., Hoorens A., Pipeleers D.G., Eizirik D.L. (1997). Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*, 138(6):2610-2614.
  - **Delgado E.**, Borràs M., Nadal J. (2000). Genotoxic assessment of urban dumping sites: Comet test in wood mouse circulating lymphocytes. *Toxicology Letters*, 116. Suppl.1:91. (Abstract).
  - **Depta B.**, Kościelniak A., Rožen A. (1999). Food selection as a mechanism of heavy metal resistance in earthworms. *Pedobiologia*, 43:608-614.
-

- **Díaz Cosín D.J.**, Jesús J.B., Moreno A.G. (1981). Earthworms taxocoenosis of Chelva (Valencia, Spain). *Pedobiología*, 21:125-131.
  - **Díaz Cosín D.J.**, Moreno A.G. (1985). Lombrices de tierra de algunas zonas de la provincia de Madrid (España). *Trabajos Compostelanos de Biología*, 12:41-55.
  - **Díaz Cosín D.J.**, Trigo D., Mascato R. (1992). Earthworms of the Iberian Peninsula. Species list and some biogeographical considerations. *Soil Biology & Biochemistry*, 24(12):1351-1356.
  - **Diògene J.**, Dufou M., Poirier G.G., Nadeau D. (1997). Extrusion of earthworm coelomocytes: comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida* and *Octalasion tyrtaeum*. *Laboratory Animals*, 31(4):326-336.
  - **Duprat P.**, Bouc-Lassalle A.M. (1967). Mise au point et étude du liquide coelomique du lombricien *Eisenia foetida sav.* *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 92: 767-778.
  - **Dušinská M.**, Collins A. (1996). Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the Comet Assay. *Atla*, 24:405-411.
  - **Eason C.T.**, Svendsen C., O'Halloran K., Weeds J.M. (1999). An assessment of the lysosomal neutral red retention test and immune function assay in earthworms (*Eisenia andrei*) following exposure to chropyrifos, benzo-a-pyrene (BaP) and contaminated soil. *Pedobiología*, 43:641-645.
  - **Edwards C.A.** (Ed.).(1998). Earthworm ecology. Soil and water conservation society, Ankeny, Iowa. St Lucie Press.
  - **Edwards C.A.**, Bohlen P.J. (1996). En: Biology and ecology of earthworms. Third Edition. Chapman & Hall (Eds). (London).UK.
  - **Eizirik D.L.**, Hoorens A. (1999).  $\beta$ -cell dysfunction and death. *Advances in Molecular and Cell Biology*, 29:47-73.
  - **Elvira C.**, Domínguez J., Briones MJ. (1996). Growth and reproduction of *Eisenia andrei* and *E. Fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in different organic residues. *Pedobiología*, 40(4):377-384.
  - **Eyambe G.S.**, Goven A.J., Fitzpatrick L.C., Venables B.J., Cooper E.L. (1991). A non invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals*, 25: 61-67.
  - **Fairbairn D.W.**, O'Neill K.L. (1995). Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. (Letter to the editor). *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 31:171-173.
  - **Fairbairn D.W.**, Olive P., O'Neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339:37-59.
  - **Fairbairn D.W.**, Walburger D.K., Fairbairn J.J., O'Neill K.L. (1996). Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning*, 18:407-416.
  - **Fawcett D.W.** (1995). Tratado de Histología. (12ª edición). McGraw-Hill Interamericana.
  - **Fenech M.** (1993). The cytoquinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, 285:35-44.
-

- **Fenech M.**, Crott J., Turner J., Brown S. (1999). Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, 14(6):605-612.
  - **Fenech M.**, Kovalkovicova N., Sutiakova I., Mlynarcikova H., Pistl J., Mikula I., Legath J., Sulik E., Kirsch-Volders M. (2000) The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*; 455:81-95.
  - **Filipic M.** (1995). Mutagenicity and toxicity of water extracts from Sora river area. *Mutation Research*, 342:1-8.
  - **Florent M.**, Godard T., Ballet J.J., Gauduchon P., Sola B. (1999). Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biology and Toxicology*, 15:185-192.
  - **Freire-Maia D.V.**, Saldiva P.H.N., Lemos M., Soares S.R.C. (2001). DNA damage detected by the comet assay, in mice chronically exposed to the São Paulo atmospheric air pollution. International Comet Assay Workshop, July 2001, Ulm.
  - **Frenzilli G.**, Bosco E., Antonelli A., Barale R. (2000). Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutation Research*, 468:93-108.
  - **Friedberg E.**, Walker G., Siede W. (1995). DNA repair and Mutagenesis. American society for Microbiology. Washington.
  - **Garaj-Vrhovac V.**, Kopjar N. (1998). Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to antineoplastic drugs. *Radiology and Oncology*, 32(4):385-392.
  - **Gichner T.**, Plewa M.J. (1998). Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutation Research*, 401:143-152.
  - **Gichner T.**, Ptáček O., Stavreva D.A., Plewa M.J. (1999). Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33:279-286.
  - **Godard T.**, Poulain L., Deslandes E., Vigreux C., Lebailly P., Duigou F., Staedel C., Ben Youssef A., Poul J.M., Sichel F., Gauduchon P. (1997). Detection of staurosporine - and etoposide - induced apoptosis on CHO cells with the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 379(1), suppl.1, page S130.
  - **Godard T.**, Deslandes E., Lebailly C., Sichel F., Gauduchon J.M.P.P. (1999). Early detection of staurosporine-induced apoptosis by comet and annexin V assays. *Histochemistry and Cell Biology*, 112:155-161.
  - **Gopalakrishna P.**, Khar A. (1995). Comet Assay to measure DNA damage in apoptotic cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 30:69-73.
  - **Górriz A.**, Llacuna S., Durfort M., Nadal J. (1994). A study of the ciliar tracheal epithelium on passerine birds and small mammals subjected to air pollution: Ultrastructural study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 27:137-142.
  - **Górriz A.**, Llacuna S., Riera M., Nadal J. (1996). Effects of air pollution on hematological and plasma parameters in *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31:153-158.
-

- **Gosàlbez** Noguera J. (1987). Insectívors i rosegadors de Catalunya. Metodologia d'estudi i catàleg faunístic. Ketres Editora S.A.(Barcelona).
  - **Goyer** R.A., Cherian M.G. (Eds.). (1995) . Handbook of experimental pharmacology. Toxicology of metals. Vol.115. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.Germany.
  - **Granchi** D., Cenni E., Ciapetti G., Savarino L., Stea S., Gamberini S., Gori A., Pizzoferrato A. (1998). Cell death induced by metal ions: necrosis or apoptosis?. *Journal of materials science :materials in medicine*,9:31-37.
  - **Gutiérrez** S., Carbonell E., Galofré P., Creus A., Marcos R. (1998a). Application of the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay to the detection fo DNA damage induced by <sup>131</sup>I treatment in hyperthyroidism patients. *Mutagenesis*, 13(1):95-98.
  - **Gutiérrez** S., Carbonell E., Galofré P., Creus A., Marcos R. (1998b). The alkaline single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay applied to the analysis of radiation-induced DNA damage in thyroid cancer patients treated with <sup>131</sup>I. *Mutation Research*, 413:111-119.
  - **Hahn** A., Hock B. (1999). Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis, comet assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(7):1421-1424.
  - **Haimi** J., Paavola S. (1998). Responses of two earthworm populations with different exposure histories to chlorophenol contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(6):1114-1117.
  - **Hartmann** A., Nieß A.M., Günter-Fuchs M-, Poch B., Speit G. (1995). Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Research*, 346:195-202.
  - **Hartmann** A., Elhajouji A., Kiskinis E., Poetter F., Martus H., Fjällman A. Frieauff W., Suter W. (2001a). Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening. Comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chemical Toxicology*, 39(8):843-858.
  - **Hartmann** A., Kiskinis E., Fjällman A., Suter W. (2001b). Influence of cytotoxicity and compounds precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutation Research*, 497:199-212.
  - **Hellman** B., Vaghef H., Früs L., Edling C. (1997). Alkaline single cell gel electrophoresis assay of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers. *Int. Arch.Occup.EnvIRON.Health*, 69:185-192.
  - **Hemminki** K., Vodička P. (1995). Styrene: from characterisation of DNA adducts to application in styrene-exposed lamination workers. *Toxicology Letters*,77:153-161.
  - **Henderson** L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. (1998). The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13(1):89-94.
  - **HNPC** (Enciclopèdia de la Història Natural dels Països Catalans) Vol.8: Invertebrats no artròpodes. Vol.13:Amfibis, rèptils i mamífers.
  - **Holz** O., Jöres R., Kästner A., Krause T., Magnussen H. (1995). Reproducibility of basal and induced DNA single-strand breaks detected by the single-cell gel electrophoresis assay in human peripheral mononuclear leukocytes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 67:305-310.
  - **Hooghe** R.J., Verschaeve L., Vankerkom J. (1995). DNA comets for monitoring pollution. *European Microscopy and Analysis*,9: 19-20.
-

- **Ieradi L.A.**, Moreno S., Bolívar J.P., Cappai A., Di Benedetto A., Cristaldi M. (1998). Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environmental Pollution*, 102: 265-268.
  - **Johnson M.S.**, Leah R.T., Connor L., Rae C., Saunders S. (1996). Polychlorinated biphenyls in small mammals from contaminated landfill sites. *Environmental Pollution*, 92(2):185-191.
  - **Judd K.W.**, Mason C.F. (1995). Earthworm population of a restored landfill site. *Pedobiologia*, 39:107-115.
  - **Kaeck M.R.**, Briggs S., Thompson H.J. (1993). Alkaline elution analysis do DNA fragmentation induced during apoptosis. *Analytical Biochemistry*, 208:393-396.
  - **Kammann U.**, Riggers C.J., Theobald N., Steinhart H. (2000). Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Research*, 467:161-168.
  - **Kassie F.**, Parzefall W., Knasmüller S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 463:13-31.
  - **Kašuba V.**, Kusic Z., Garaj-Vrhovac V. (1999). Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes of patients following iodine-131 radiotherapy. *Radiology and Oncology*, 33(1):35-41.
  - **Keck G.** (1991). Les “substances déchets” dans l’environnement impacts sur les animaux et les channes alimentaires. *Revue Médecine Vétérinaire*, 142:7.
  - **Kille P.**, Stürzenbaum S.R., Galay M., Winters C., Morgan A.J. (1999). Molecular diagnosis of pollution impact in earthworms- towards integrated biomonitoring. *Pedobiologia*, 43:602-607.
  - **Klaude M.**, Eriksson S., Nygren J., Ahnström G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, 363:89-96.
  - **Konopacka M.**, Widel M., Rzeszowska-Wolny J. (1998). Modifying effect of vitamin C,E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. *Mutation Research*, 417:85-94.
  - **Koppen G.**, Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* roots cells. *Mutation Research*, 360:193-200.
  - **Koskinen M.**, Calebiro D., Hemminki K. (2000a). Styrene oxide-induced 2'-deoxycytidine adducts: implications for the mutagenicity of styrene oxide. *Chemico-Biological Interactions*, 126:201-213.
  - **Koskinen M.**, Vodička P., Hemminki K. (2000b). Adenine N3 is a main alkylation site of styrene oxide in double-stranded DNA. *Chemico-Biological Interactions*, 124:13-27.
  - **Krishna G.**, Urda G., Tefera W., Lalwani N.D., Theiss J. (1995). Simultaneous evaluation of dexamethasone-induced apoptosis and micronuclei in rat primary spleen cell cultures. *Mutation Research*, 332:1-8.
  - **Krown K.A.**, Page M.T., Nguyen C., Zechner D., Gutiérrez V., Comstock K.L., Glembotski C.C., Quintana P.J.E., Sabbadini R.A. (1996). Tumor necrosis factor alpha induced apoptosis in cardiac myocytes: Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *Journal of Clinical Investigation*, 98(12):2854-2865.
  - **Laffon B.**, Pasaro E., Méndez J. (2001). Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Mutation Research*, 491(1-2):163-172.
-



- **Lee K.E.** (Ed). (1995). Earthworms. Their ecology and relationship with soils and land use. Harcourt Brace Jovanovich Publishers. Academic Press. (Australia).
  - **Linthicum D.S.**, Stein E.A., Marks D.H., Cooper E.L. (1977). Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell. Tissue Research*, 185: 315-330.
  - **Llacuna S.**, Górriz A., Nadal J. (1993). Study on the diversity of bird populations under conditions of atmospheric pollution from the Cercs coal-fired power plant (Northeast Spain). *Historia Animalium*, 2:117-123.
  - **Llacuna S.**, Górriz A., Sanpera C., Nadal J. (1995). Metal accumulation in three species of passerine birds (*Emberiza cia*, *Parus major*, and *Turdus merula*) subjected to air pollution from a coal-fired power plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28:298-303.
  - **Llacuna S.**, Górriz A., Riera M., Nadal J. (1996). Effects of air pollution on hematological parameters in passerine birds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 31:148-152.
  - **Lucero L.**, Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T., Creus A., Marcos R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research*, 464:255-262.
  - **Ma W.**, Edelman th., Van Beersum I., Jans Th. (1983). Uptake of cadmium, zinc, lead, and copper by earthworm near a zinc-smelting complex: influence of soil pH and organic matter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 30:424-427.
  - **Ma W.**, Van Kleunen A., Immerzeel J., Maagd P.G.J. (1998). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: assessment of equilibrium partitioning theory in situ studies and water experiments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(9):1730-1737.
  - **Marczynski B.**, Peel M., Baur X. (1997). Changes in high molecular weight DNA fragmentation following human blood exposure to styrene-7,8-oxide. *Toxicology*, 120:111-117.
  - **Mareková M.**, Vávrová J., Vokurková D. (2000). Ethanol induced apoptosis in Human HL-60 cells. *General Physiology and Biophysics*, 19:181-194.
  - **Mariño F.**, Mascato R., Díaz Cosín D.J. (1987). Estudio de las lombrices de tierra de La Capelada, Cuadramon y el valle de Sil (España). *Bol.R.Soc.Esp.Hist.Nat.(sec.Biol.)*, 83(1-4):141-148.
  - **Mariño F.**, Ligeró A., Díaz Cosín D.J. (1992). Heavy metals and earthworms on the border of a road next to Santiago (Galicia, Northwest of Spain). Initial results. *Soil Biology & Chemistry*, 24(12):1705-1709.
  - **Mariño F.**, Ligeró A., Díaz Cosín D.J. (1994). Variaciones de la concentración de metales pesados en diferentes especies de lombrices de tierra en cinco minas en Galicia(NO España). *Miscelania Zoológica*, 17:75-85.
  - **Mariño F.**, Ligeró A., Díaz Cosín D.J. (1995). Metales pesados en varias especies de lombrices de tierra de suelos desarrollados sobre serpentinitas. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 5:245-250.
  - **Mariño F.**, Ligeró A., Díaz Cosín D.J. (1996). Metales pesados en lombrices de tierra y suelos de los alrededores de la central térmica de As Pontes (La Coruña, NO España). *Bol.R.Soc.Esp.Hist.Nat. (sec.Biol.)*, 92(1-4):65-73.
-

- **Mariño F.**, Winters C., Morgan A.J. (1999). Heat shock protein (hop60,hsp70,hsop90) expression in earthworms exposed to metal stressors in the field and laboratory. *Pedobiologia*, 43:615-624.
  - **Marsteinstredet U.**, Wiger R., Brunborg G., Hongslo J., Holme J.A. (1997). Apoptosis in HL-60 cells induced by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX). *Chemico-Biological Interactions*, 106:89-107.
  - **Matsuoka A.**, Matsuura K., Sakamoto H., Hayashi M., Sofuni T. (1999). A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the *in vitro* micronucleus test. *Environmental Mutagen Society/Oxford University Press*.pp 385-389.
  - **McKelvey-Martin V.J.**, Green M.H.L., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Méo M.P., Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288:47-63.
  - **Meier J.R.**, Chang L.W., Jacobs S., Torsella J., Meckes M., Smith M.K. (1997). Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5):928-938.
  - **Merk O.**, Speit G. (1999). Detection of crosslinks with the Comet Assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 33:167-172.
  - **Merk O.**, Reiser K., Speit G. (2000). Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay. *Mutation Research*, 471:71-80.
  - **Mitchelmore C.L.**, Chipman J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399: 135-147.
  - **Miyamae Y.**, Yamamoto M., Sasaki Y.F., Kobayashi H., Igarashi-Soga M., Shimoi K., Hayashi M. (1998). Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutation Research*, 418:131-140.
  - **Myllyperkiö M.H.**, Koski T.R.A., Vilpo L.M., Vilpo J.A.(2000). Kinetics of excision repair of UV-induced DNA damage, measured using the comet assay. *Mutation Research*, 448:1-9.
  - **Möller P.**, Knudsen L.E., Loft S., Wallin H. (2000). The comet assay as rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9:1005-1015.
  - **Morgan A.J.**, Stürzenbaum S.R., Kille P. (1999). A short overview of molecular biomarker strategies with particular regard to recent developments in earthworms. *Pedobiologia*, 43:574-584.
  - **Mueller B.R.**, Roth M., Rittner P. (1993). Influence of compost and lime on population structure and element concentrations of forest soil invertebrates. *Biology and Fertility Soils*, 5:165-173.
  - **Muñoz A.** (1997). In: Genes y Nuevas Terapias. Edit. Hélice.(Madrid).
  - **Nagata S.** (2000). Minireview: Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256:12-18.
  - **Navarrete M.H.**, Carrera P., de Miguel M., de la Torre C. (1997). A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutation Research*, 389:271-277.
-

- **Navarro A.**, Rosell A., Villanueva J., Grimalt O. (1991). Monitoring of hazardous waste dumps by the study of metals and solvent-soluble organic chemicals. *Chemosphere*, 22 (9-10):913-928.
  - **Nelms B.E.**, Moravec R., Riss T. (1997). Measuring apoptosis in individual cells with the Comet Assay. *Promega Notes*, 64:13
  - **Neuhauser E.I.**, Cukic Z.V., Malecki M.R.; Loehr R.C., Durkin P.R. (1995). Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution*, 89(3):293-301.
  - **O'Halloran K.O.**, Booth L.H., Hodge S., Thomsen S., Wratten S.D. (1999). Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to organophosphates: Hierarchical tests. *Pedobiologia*, 43:646-651.
  - **Olive P.L.**, Wlodek D., Banáth J.P. (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research*, 51: 4671-4676.
  - **Olive P.L.**, Banáth J. (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutation Research, DNA Repair*, 294:275-283.
  - **Olive P.L.**, Frazer G., Banáth J.P. (1993). Radiation-Induced apoptosis measured in TK6 Human B Lymphoblast cells using the Comet Assay. (Rapid communication). *Radiation Research*, 136:130-136.
  - **Olive P.L.**, Banáth J.P., Fjell C.D. (1994). DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline Comet Assay. *Cytometry*, 16:305-312.
  - **Olive P.L.**, Banáth J.P. (1995). Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the Comet Assay and DNA Crosslinking Agent. *Experimental Cell Research*, 221:19-26.
  - **Olive P.L.** (1999). DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. (Review). *International Journal of Radiation Biology*, 75(4):395-405.
  - **Onoa G.B.**, Cervantes G., Moreno V., Prieto M.J. (1998). Study of the interaction of DNA with cisplatin and other Pd(II) and Pt(II) complexes by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, 26(6):1473-1480.
  - **Palanques A.**, Puig P., Guillén J., Querol X., Alastuey A. (1999). Zinc contamination in the bottom and suspended sediments of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar spill (south-western Spain). Control of hydrodynamic processes. *The Science of the Total Environment*, 242:211-220.
  - **Panneerselvam N.**; Sinha S.; Shanmugam G. (1995). Genotoxicity of the herbicide fluchloralin on human lymphocytes in vitro: chromosomal aberration and micronucleus tests. *Mutation Research*, 344:69-72.
  - **Parry M.J.** (1976). Evidence of mitotic division of coelomocytes in the normal, wounded and grafted earthworm *Eisenia foetida*. *Experientia*, 32:449-451.
  - **Pastor N.**, López-Lázaro M., Tella J.L. Baos R., Hiraldo F., Cortés F. (2001). Assessment of genotoxic damage by the comet assay in white storks (*Ciconia ciconia*) after the Doñana ecological disaster. *Mutagenesis*, 16(3):219-223.
  - **Pfuhler S.**, Wolf H.U. (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the Alkaline Comet Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27:196-201.
-

- **Piperakis** S.M., Visvardis E.E., Tassiou A. (1999). En: Methods in Enzymology.(vol.300): Oxidants and antioxidants , part B. Lester Paker (Ed.). Academic Press. USA. (pp.184-194).
  - **Pitarque** M., Creus A., Marcos R., Hughes JA., Anderson D. (1999a). Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research*, 440:195-204.
  - **Pitarque** M., Vaglenov A., Nosko M., Hirvonen A., Norppa H., Creus A., Marcos R. (1999b). Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research*, 441:115-127.
  - **Pižl** V., Josens G. (1995a). The influence of traffic pollution on earthworms and their heavy metal contents in an urban ecosystem. *Pedobiologia*, 39:442-453.
  - **Pižl** V., Josens G. (1995b). Earthworm communities along a gradient of urbanization. *Environmental Pollution*, 90(1):7-14.
  - **Poli** P., Buschini A., Restivo F.A., Ficarelli A., Cassoni F., Ferrero I., Rossi C. (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast test. *Mutagenesis*, 14(6):547-555.
  - **Prat** N., Toja J., Solà C., Burgos MD., Plans M., Rieradevall M. (1999). Effect of dumping and cleaning activities on the aquatic ecosystems of the Guadiamar River following a toxic flood. *The Science of the Total Environment*, 242:231-248.
  - **Putman** C.A.J., de Grooth B.G., Hansma P.K., van Hulst N.F., Greve J. (1993). Immunogold labels:cell-surface markers in atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 48:177-182.
  - **Querol** S., Alastuey A., López-Soler A., Plana F., Mesas A., Ortiz L., Alzaga R., Bayona J., de la Rosa J. (1999). Physico-chemical characterization of atmospheric aerosols in a rural area affected by the Aznalcollar toxic spills, South-west Spain, during the soil reclamation activities. *The Science of the Total Environment*, 242:89-104.
  - **Radmacher** M., Tillmann R.W., Fritz-Stephan M., Gaub H.E. (1992). From molecules to cells: Imaging soft samples with the atomic force microscopy. *Science*, 257:1900-1905.
  - **Ralph** S., Petras M. (1998). Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutation Research*, 413:235-250.
  - **Reinecke** S.A., Reinecke A.J. (1999). Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by long-term experimental exposure to heavy metals. *Pedobiologia*,43:585-593.
  - **Ribas** G., Frenzilli G., Barale R., Marcos R. (1995). Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*, 344:41-54.
  - **Rojas** E., López M.C., Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.Review. *Journal of Chromatography B*, 722: 225-254.
  - **Roser** S., Pool-Zobel B.L., Rechkemmer G. (2001). Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutation Research*,497:169-175.
  - **Ross** G.M., McMillan T.J., Wilcox Ph., Collins A. (1995). The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. *Mutation Research*, 337: 57-60.
-

- **Rudolf E.**, Peychl J., Červinka M. (2000a). The dynamics of the hexavalent chromium induced apoptotic patterns in vitro. *Acta Medica* (Hradec Králové), 43(3):83-89.
  - **Rudolf E.**, Peychl J., Novak J., Červinka M. (2000b). Apoptosis: when the cells begin to dance. *Frontiers in Bioscience*, 5 (2):  
<http://www.bioscience.org/2000/v5/f/rudolf/fulltext.htm>
  - **Šalagovič J.**, Gilles J., Verschaeve L., Kalini I. (1996). The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworm: a promising tool for assessing the biological hazards of pollution sites. *Folia Biologica* (Praga), 42:17-21.
  - **Šalagovič J.**, Maes A., Van Gorp U., Verschaeve L., Kalina I. (1997). The cell cycle positions influence DNA migration as measured with the Alkaline Comet Assay in stimulated human lymphocytes. *Folia Biologica* (Praga), 43:79-82.
  - **Salanitro J.P.**, Dorn P.B., Huesemann M.H., Moore K.O., Rhodes I.A., Rice Jackson L.M., Vipond T.E., Western M.M., Wisniewski H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science & Technology*, 31:1769-1776.
  - **Salgado J.**, Górriz A., Llacuna S., Borràs M., Nadal J. (1997). Efectos de la contaminación atmosférica procedente de las emisiones de la central térmica de Cercs (Catalunya, NE de España) sobre la biodiversidad de artrópodos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, vol.XLVII.
  - **Salgado J.M.**, Llacuna S., Górriz A., Borràs M., Nadal J. (1996). Effects of a coal-fired power plant on arthropod biodiversity. *Toxicology Letters*, suppl 1/88,95.
  - **Salmon S.E.**, Sartorelli A.C. (1999). Quimioterapia del cáncer. En: Farmacología básica clínica. Bertram G.Katzung (Ed.). El manual moderno. México, D.F.-Santafé de Bogotá. Capítulo 55:
  - **Sánchez E.G.**, Muñoz B., Garvín M.H., Jesús J.B., Díaz Cosín D.J. (1997). Ecological preferences of some earthworm species in southwest Spain. *Soil Biology & Biochemistry*, 29(3/4):313-316.
  - **Sasaki Y.F.**, Izumiyama F., Nishidate E., Matsusaka N., Tsuda S. (1997a). Detection of liver carcinogen genotoxicity by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutation Research*, 391:201-214.
  - **Sasaki Y.F.**, Nishidate E., Izumiyama F., Matsusaka N., Tsuda S. (1997b). Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow). *Mutation Research*, 391:215-231.
  - **Sasaki Y.F.**, Fujikawa K., Ishida K., Kawamura N., Nishikawa Y., Ohta S., Satoh M., Madarame H., Ueno S., Susa N., Matsusaka N., Tsuda S. (1999). The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S.NTP. *Mutation Research*, 440:1-18.
  - **Sasaki Y.F.**, Kaoru S., Izumiyama F., Nishidate E., Saga A., Ishida K., Tsuda S. (2000). The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet Assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from IARC and U.S. NTP carcinogenicity database. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(6):629-799.
  - **Schwartz LM.**, Osborne BA. (Eds). (1995). Methods in cell biology. Vol.46. Cell death. San Diego. Academic Press. (p.172-173).
-

- **Sgonc R., Gruber J. (1998).** Apoptosis detection: An overview. (Mini-review). *Experimental Gerontology*, 33(6):525-533.
  - **Shmid W. (1973).** Chemical mutagen testing on *in vivo* somatic mammalian cells. *Agents and Actions*. 3(2):77-85.
  - **Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988).** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental cell research*, 175:184-191.
  - **Singh N.P. (2000).** A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, 256(1):328-337.
  - **Slameňová D., Gábelová A., Ružeková L., Chalupa I., Horváthová E., Farkašová T., Bozsakyová E., Štětina R. (1997).** Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA chromosomal aberrations. *Mutation Research*, 383:243-252.
  - **Solà C., Plans M., Toja J., Burgos M<sup>a</sup>D., Prat N. (2000).** In: De las catástrofes ambientales a la cotidianidad urbana: la gestión de la seguridad y el riesgo. II Coloquio Hispano-canadiense de Barcelona. ( Geo-crítica, testos de apoyo). Publ.Universitat de Barcelona. Requena J.&Campins M.(Coord.).
  - **Somorovská M., Jahnová E., Tulinská J., Zámečníková M., Šarmanová J., Terenová A., Vodičková L., Líšková A., Vallová B., Souček P., Hemminki K., Norppa H., Hirvonen A., Tates A.D., Fuortes L., Dušinská M., Vodička P. (1999).** Biomonitoring of occupational exposure to styrene in a plastics lamination plant. *Mutation Research*, 428:255-269.
  - **Speit G., Hartmann A. (1999).** The Comet Assay ( single-cell gel test) – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. En: *Methods in Molecular Biology. DNA Repair Protocols : Eukaryotic Systems*, Henderson, DS (Ed.), vol113. Totowa.Human Press, pp.203-212.
  - **Speit G., Trenz K., Schütz P., Rothfuß A., Merk O. (1999).** The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicology letters*, 110:73-78.
  - **Spurgeon D.J., Hopkin S.P. (1995).** Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, 4:190-205.
  - **Spurgeon D.J., Hopkin S.P. (1996).** Risk assessment of the threat of secondary poisoning by metals to predators of earthworms in the vicinity of a primary smelting works. *The Science of the Total Environment*, 187:167-183.
  - **Spurgeon D.J., Hopkin S.P. (1999).** Life-history patterns in reference and metal-exposed earthworm populations. *Ecotoxicology*, 8:133-141.
  - **Stavreva D.A., Ptáček O., Plewa M.J., Gichner T. (1998).** Single cell gel electrophoresis analysis of genomic damage induced by ethyl methanesulfonate in cultured tobacco cells. *Mutation Research*, 422: 323-330.
  - **Stein E., Avtalion R.R., Cooper E.L. (1977).** The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: Morphology and phagocytosis properties. *Journal of Morphology*, 153: 467-478.
  - **Steinkellner H., Kassie F., Knasmüller S. (1999).** *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. *Mutation Research*, 426:113-116.
-

- **Štětina R.**, Vodička P. (1998). DNA damage induced by methylating and alkylating compounds in vitro. A comparative study. *Toxicology letters*, 95, suppl.1,p.39. (Abstract).
  - **Štětina R.**, Barta I., Šmerák P., Delgado E. (2001a). DNA damage induced after chronic treatment of Chinese hamsters with different mycotoxines and their combinations. International Comet Assay Workshop, July 2001, Ulm.
  - **Štětina R.**, Rudolf E., Delgado E. (2001b). DNA damage in cells and tissues treated with different types of mutagens and agents inducing apoptosis or necrosis. International Comet Assay Workshop, July 2001, Ulm.
  - **Straalen N.M.**, Bergema W.F. (1995). Ecological risks of increased bioavailability of metals under soil acidification. *Pedobiologia*, 39:1-9.
  - **Suzuki M.M.**, Cooper E.L., Eyambe G.S., Goven A.J., Fitzpatrick L.C., Venables B.J. (1995). Polychlorinated biphenyls (PCBs) depress allogeneic natural cytotoxicity by earthworm coelomocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(10):1697-1700.
  - **Swann E.**, Kuenzi A.J., Morrison M.L., DeStefano S. (1997). Effects of sampling blood on survival of small mammals. *Journal of Mammalogy*, 78(3):908-913.
  - **Taddel F.**, Scarcelli V., Frenzilli G., Nigro M. (2001). Genotoxic hazard of pollutants in cetaceans: DNA damage and repair evaluated in the Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) by the comet assay. *Marine Pollution Bulletin*, 42(4):324-328.
  - **Tebbs R.S.**, Cleaver J.E., Pedersen R.A., Hartmann A. (1999). Modification of the Comet Assay for the detection of DNA strand breaks in extremely small tissue samples. *Mutagenesis*, 14(4):437-438.
  - **Tice R.R.**, Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206-221.
  - **Tomei L.D.**, Cope F.O. (1991).(Eds.). Apoptosis: The molecular basis of cell death. Current communications in cell & molecular biology.(3). Cold Spring Harbor Laboratory Press. NY.(pp.1-321).
  - **Trigo D.**, Souto B.F., Díaz Cosín D.J. (1989). Lombrices de tierra de la colección del museo de zoología de Barcelona. *Misc.Zool.*, 13:27-35.
  - **Trigo D.**, Díaz Cosín D.J. (1992). Estudio comparado de la fracción mineral dels suelo de cultivo y de las heces de *Allolobophora molleri* (Lumbricidae) Rosa,1889. *Suelo y Planta*, 2:423-431.
  - **Tsuda S.**, Matsusaka N., Madarame H., Miyamae Y., Ishida K., Satoh M., Sedihashi K., Sasaki Y.F. (2000). The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs : resulting with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosoamines) and 10 DNA crosslinkers. *Mutation Research*, 467:83-98.
  - **Tucker J.D.**, Preston R.J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research*.365:147-159.
  - **Turner S.D.**, Wijnhoven S.W.P., Tinwell H., Lashford L.S., Rafferty J.A., Ashby J., Vrieling H., Fairbairn L.J. (2001). Assays to predict the genotoxicity of the chromosomal mutagen etoposide-focussing on the best assay. *Mutation Research*,493:139-147.
  - **Ulitzur S.** (1986). Bioluminescence test for genotoxic agents. *Methods Enzymol.*, 133:264-274.
-

- **Valembois P. (1971)**. Étude ultrastructurale des coelomocytes du lombricien *Eisenia foetida* sav. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 96 : 59-72
  - **Van Geen A., Takesue R., Chase Z. (1999)**. Acid mine tailing in southern Spain. *The Science of the Total Environment*, 242:221-229.
  - **Van Gestel C.A.M., Dirven-Van Breemen E.M., Baerselman R. (1993)**. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* ( Oligochaeta, Annelida). *The Science of the Total Environment*, suppl. 1993, 585-597.
  - **Van Gestel C.A.M., Ma W. (1988)**. Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15:289-297.
  - **Van Goethem F., Lison D., Kirsch-Volders M. (1997)**. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Research*, 392:31-43.
  - **Van Herck H., Baumans V., Brandt C.J.W.M., Boere H.A.G., Hesp A.P.M., Van Lith H.A., Schurink M., Beynen A.C. (2001)**. Blood sampling from the retro-orbital plexus, the saphenous vein and the tail vein in rats: comparative effects on selected behavioural and blood variables. *Laboratory Animals*, 35:131-139.
  - **Verschaeve L., Gilles J. (1995)**. Single cell electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54:112-119.
  - **Vidal M., López-Sánchez J.F., Sastre J., Jiménez G., Dagnac T., Rubio R., Rauret G. (1999)**. Prediction of the impact of the Aznalcóllar toxic spill on the trace element contamination of agricultural soils. *The Science of the Total Environment*, 242:131-148.
  - **Vijayalaxmi, Tice R.R., Strauss G.H.S. (1992)**. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutation Research*, 271:243-252.
  - **Villani P., Altavista P.L., Castaldi L., Leter G., Cordelli E. (2000)**. Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. *Mutation Research*, 464:229-237.
  - **Villanueva J., Rosell A., Grimalt O. (1991)**. Chemical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in uncontrolled hazardous waste dumps. *Chemosphere*, 22(3-4):317-326.
  - **Visvardis E.E., Tassiou A.M., Piperakis S.M. (1997)**. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $\gamma$ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutation Research*, 383:71-80.
  - **Vodička P., Koskinen M., Vodičková L., Štětina R., Šmerák P., Bárta I., Hemminki K. (2001a)**. DNA adducts, strand breaks and micronucleus in mice exposed to styrene by inhalation. *Chemico-Biological Interactions*, 137:213-227.
  - **Vodicka P., Soucek P., Tates Ad.D., Dusinska M., Sarmanova J., Zamecnikova M., Vodickova L. Koskinen M., Zwart F.A., Natarajan A.T., Hemminki K. (2001b)**. Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers. *Mutation Research*, 482:89-103.
  - **Von Ledebur M., Schmid W. (1973)**. The micronucleus test: methodological aspects. *Mutation Reserach*.19:109-117.
-



- **Vrzoc M., Petras M.L. (1997)**. Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutation Research*, 381:31-40.
- **Walker C.H., Hopkin S.P., Silby R.M., Peakall D.B. (1997)**. En: Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis (Eds.). (UK)
- **Weltje L. (1998)**. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (*Oligochaeta*) in laboratory and field soils: a critical evaluation of data. *Chemosphere*, 36(12):264-2660.
- **Wojewódzka M., Kruszewski M., Szumiel I. (1997)**. Effect of signal transduction inhibition in adapted lymphocytes: micronuclei frequency and DNA repair. *Int.J.Radiat.Biol.*, 71(3):245-252.
- **Yeardley R.B., Lazorchak J.M., Gast L.C. (1996)**. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9):1532-1537.
- **Yendle J.E., Tinwell H., Elliot B.M., Ashby J. (1997)**. The genetic toxicity of time:Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutation Research*, 375:125-136.
- **Zhong Y., Feng S.L., Luo Y., Zhang G.D., Kong Z.M. (2001)**. Evaluating the genotoxicity of surface water of Yangzhong City using the *Vicia faba* Micronucleus Test and the Comet Assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67:217-224.
- **Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Luna-Aguirre J., González-Rodríguez A., Zamora-Pérez A., Gómez-Meda B.C., Ventura-Aguilar A.J., Ramos-Ibarra M.L., Ramos-Mora A., Ortiz G.G., Gallegos-Arreola M.P. (2000)**. Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptils and birds): part two. *Mutation Research* (Short communication), 467:99-103.

(1):Institut d'Edicions de la Diputació de Barcelona, 1993. Estudis i Monografies 16: La Gestió Municipal de residus sòlids urbans I. Diputació de Barcelona, juny 1992.

(2): Edició de L'Àrea Metropolitana de Barcelona. Entitat de Medi Ambient, 2000. "Programa Metropolita de Gestión de residuos municipales, 1997".

[1]:[http:// www.geocities.com/cometassay](http://www.geocities.com/cometassay)

[2]:[http:// www.bcn.es/estadistica/catala/dades/anu98/c1801118.htm](http://www.bcn.es/estadistica/catala/dades/anu98/c1801118.htm)

[3]:[http:// www.junres.es/estaddin/Municipals/](http://www.junres.es/estaddin/Municipals/)

[4]:[http:// www.biochem.roche.com/apoptosis/sciinf05.htm](http://www.biochem.roche.com/apoptosis/sciinf05.htm). O més general:  
[http:// www.biochem.roche.com/prodinfo\\_fst.htm?/apoptosis/index.htm](http://www.biochem.roche.com/prodinfo_fst.htm?/apoptosis/index.htm)

[5]:[http:// www.lakes-environmental.com/toxics/STYRENE\\_OXIDE.HTML](http://www.lakes-environmental.com/toxics/STYRENE_OXIDE.HTML)

[6]:[http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Results\\_status/ResstatS/1046T.html](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Results_status/ResstatS/1046T.html)

[7]:[http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem\\_H&S/NTP\\_Chem9/Radian96-09-3.html](http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Chem_H&S/NTP_Chem9/Radian96-09-3.html)

[8]: <http://www.epa.gov/ttn/uatw/hlthef/styreneo.html>

## \* Agraïments

Hi ha tantes persones a qui m'agradaria agrair-los la seva ajuda i suport durant aquests anys de realització de la tesi, que faria aquest capítol més llarg que tota la memòria d'aquesta sencera. Així doncs, hauré de fer-ho una mica general, esperant que tots aquells que ja saben com m'han ajudat, si no els anomeno particularment, no es pensin que no he pensat en ells, ja que a tots ells els ho agraeixo moltíssim, i de tot cor; si em coneixen, ja saben que ho dic de debò. Al mateix temps vull agrair a totes les persones que he tingut molt a prop, i al meu voltant, durant tot aquest temps, per la seva paciència i per donar-me ànims i suport.

Així doncs, primer de tot, voldria agrair a tots els membres del tribunal per haver acceptat formar part d'aquest.

Seguidament vull mencionar en especial:

Als meus pares, per ser els meus pares, pel seu suport, i afecte, per aguantar les meves enrabiades i totes les vegades que rondinava (que no han estat poques...), i també pel seu ajut, en tots els sentits. Per intentar ajudar-me també en la tesi, el pare cavant per trobar cucs, la mare tenint-ne cura. Als meus germans, també per la seva paciència i suport.

A la Cati i en Ferran, per haver-me donat recolzament, per acollir-me a casa seva com una filla durant tots aquests anys, pel seu afecte, per ser els meus segons pares.

A tots ells un agraïment molt afectuós, ja que sense ells no hauria pogut arribar a on he arribat.

Al Dr. Nadal, per acceptar-me al seu grup i ser el director de la meua tesi. Per la seva gran paciència, confiança, ajut, recolzament i consells.

A tots els companys de captures:

Molt especialment a en Miquel, la Noèlia i els seus cosins (els quals van ser molt eficients i em van dur molta sort en les captures), en Santi i l'Assumpta, en Sergi, l'Àlvaro, l'Esther, en Jordi Peig, l'Ivà, l'Ignasi Torre, i en Jordi Torres.

I a tots els companys de grup, molt especialment un cop més, a en Miquel (ja t'he comentat moltes vegades, que d'aquesta et faran Sant, mai hi hauran prou paraules per agrair-te el teu ajut), la Roser (gràcies pel teu suport i ajut), la Diana i la Noèlia (amb les que he anat de captures de ratolins i rat-penats, recordo especialment el dia que vam anar a la pastisseria a caçar-ne i aquell pastís de poma...; amb les que hem rigut tantes vegades i ens hem explicat les nostres penes que teníem a vegades..., animant-nos unes a les altres, i per ser unes bones amigues amb les que hem passat també, unes bones estones fora de la facultat), en Sergi (amb qui vam començar junts, moltes gràcies per tot Sergi, pel teu ajut, les captures... etc..., recordo molt especialment el dia que vàreu venir amb l'Olga a casa, el dia de les fotos al departament, i el dia de Montpel·lier, un cop més disculpa'm pel retard), en Lluís (gràcies pels consells, i també gràcies a la Laia, a qui haig d'agrair molt aquelles xerrades, sobretot la de Montpel·lier, felicitats per en Jan), la Rosa (gracias por tus palabras y apoyo, sobretodo cuando estuve en Hradec K.), l'Àlvaro (gracias por tus consejos y ánimos), en Jordi (gràcies pel teu bon humor, i el teu suport),

---

en Quim (amb qui vam començar junts la carrera, i ens tornem a trobar, gràcies també pel teu suport), a l'Assumpta (per tot el teu suport i ajut, i perquè va ser un plaer treballar amb tu, em va agradar molt i em vas motivar molt, gràcies també per les teves converses, sempre em recordaves la meva germana), i en Santi (gràcies per la teva ajuda cada cop que l'he necessitada, per buscar les zones de mostreig, per ensenyar-me a capturar "bitxos", i acompanyar-me a agafar-los). Amb tots ells he compartit tantes hores de feina, de penes i glòries, en els experiments, cursos i captures, amb ells he compartit estones tan boniques..., i... tots ells, a més de molt bons companys, han estat molt bons amics, ajudant-me sempre que ha calgut, no sols en la feina, sinó també moralment.

A tots els companys de departament, en especial a la Mari (molts ànims Mari!), en Nacho, l'Adriana (ánimos y suerte), i en Jacob.

Molt en especial també, a l'Anna, companya d'aventures, i de "guerra", i sobretot una bona amiga, amb qui vaig compartir tantes estones, d'estudi, i de xerrades, a qui vaig conèixer a primer de carrera, a la primera fila, i que junt amb la Cristina ens van batejar com "les tres maries", i des de llavors, que sempre vam continuar juntes les dues durant tots aquests anys.... "les de Girona"...

A la Susanna, també pel seu suport, amistat i totes les aventures. La més sonada, la del treball de tercer a casa seva, recollint mostres a una de les platges de Roses i analitzant-les al microscopi a la seva habitació.

A l'Eva, per les competicions d'aigua mentre estàvem al departament, (ens convé beure aigua...), i pel seu suport.

A en Javier Méndez, (del departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB), pel seu ajut amb el microscopi de fluorescència, amb temes d'ordinador i programes, el seu suport i consells, sobretot en casos de "depre". Per ser un bon company, i per la seva amistat.

A l'Empar i l'Anna, no sols pel seu suport moral, sinó també pel seu ajut amb la balança, el microones, pH-metre...

A en Guillem, pel seu ajut en temes d'informàtica.

A l'Isabel i a en Mateu per deixar-me anar a casa seva cada diumenge a cavar i a barallar-me amb les gallines per a recollir els cucs, i per ajudar-me a cavar també.

En especial també a en Josep, per la seva amistat i el seu suport durant tots aquests anys.

A en César, per ser la meva parella de ball durant aquests mesos, i compartir estones de riure, pel seu ajut en temes d'ordinadors, i la seva amistat.

A la Marta, la Neus, en Joaquín, l'Albert, i l'Eli, pel seu suport i ànims també.

Al Dr. Štětina, per donar-me l'oportunitat de viatjar a un país tan bonic i treballar al seu laboratori, aprendre molt, poder assistir a dos congressos i conèixer persones d'interès en el

---

tema; per la seva amabilitat i hospitalitat (junt amb la seva família), i pel seu ajut i suport. Va ser un plaer treballar amb ell com també amb la Věra, (a qui molt especialment haig d'agrair la seva amistat i ajuda), la Radka (gràcies pel diccionari i la teva ajuda), la Renata, la Petra, i la Majka. Děkuji.

A en Petr, li he d'agrair la seva amistat i ajuda des de Suïssa (Děkuji). A la Katka, per guiar-me per Praga i Nymburk (gracias Caterina). A la Daniela i a en Zbyněk, per la seva amabilitat i els bons moments a Londres (děkuji). A la Hanka, i en Robert, moltes gràcies per la seva amistat i amabilitat, m'ho vaig passar molt bé amb ells, (muchas gracias).

A l'Emil, pel seu suport i ajut, per la seva amistat, i ensenyar-me a veure la vida d'una altra manera.(Gracias por tu amistad, apoyo y confianza en la distancia).

A en Marià Pitarque i la Sara Gutiérrez,(de la UAB) pels seus consells i el seu ajut totes les vegades que he necessitat, amb l'ús d'aquesta tècnica, i com a companys també.

A la Raquel Valdés i als seus directors (Dr.Pastor i Dr.Casado) del departament de Bioquímica de la Facultat de Biologia de la UB. Pel seu ajut i deixar-me treballar amb el seu grup. Molt especial vull agrair a la Raquel sobretot pel seu suport i la seva amistat, i també per introduir-me en el món dels experiments *in vitro*, ensenyar-me a treballar amb cultius cel·lulars, pel seu ajut en la citometria flux i en tot el que vaig necessitar per dur a terme els experiments al seu departament, també per deixar-me la cubeta electroforesi quan em va caldre, etc... Així mateix vull agrair també a les seves companyes de grup, que em donessin també un cop de mà. Ànims Raquel!, i molta sort en la teva nova feina a l'estranger.

Un agraïment molt especial també al Dr. Darío Díaz Cosín, Dr. Joan de Jesús, i al seu grup de la de la Facultat de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, per ensenyar-me a classificar els cucs de terra, pel seu gran ajut, atenció i amabilitat. Muchas gracias por su ayuda y amabilidad.

Vull agrair molt especialment a la Dra.Roser Rubio, al Dr. Miquel Vidal, i al seu equip (sobretot a en Jordi S. i a la Mònica P.), del Departament de Química Analítica de la Facultat de Química de la UB, per proporcionar-me les mostres de sòl de Doñana, i permetre'm la utilització de les seves dades,(les anàlisi químiques de les terres), i per tot el seu ajut i amabilitat.

Als Serveis Científico-Tècnics: Molt especialment a la Susanna, la Laura i l'Elisenda de la Unitat de microscòpia confocal. A en Jaume de citometria de flux. La Marisol i l'Àlex del servei d'informàtica. A l'Almudena, l'Anna, la Núria, l'Eva, i els seus becaris. A en Ramon, l'Anna, M<sup>a</sup>José, i l'Antonia de la unitat de microscòpia electrònica. Als Davids, pel seu ajut en problemes tècnics quan més ho vaig necessitar. A la Yolanda, l'Elionor i en Santi de metalls pesants.

I del microscopi de força atòmica dels Serveis Científico-Tècnics, també vull agrair a en Pau G. i a l'Albert V., com també al Dr.Sanz (de la Facultat de Química de la UB) la seva amabilitat, i ajut en deixar-nos realitzar unes proves.

A en Ricardo Simonaeau, i a en Josep M<sup>a</sup>. (del Servei de camps experimentals de la UB). Per proporcionar-me terra per als cucs.

A la Dra. M<sup>a</sup>Jesús Briones del departamento de Recursos Naturales y Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo. Per proporcionar-me *Eisenia foetida* i *E.andrei* pels experiments.

A Humulir, Crta de Valldoriolf s/n. 08400-Granollers. Gràcies a Joan Argemí (Dept.Comercial), per cedir-nos una quantitat de *E.foetida* per les nostres proves i per la seva amabilitat.

Al Sr. Barroso de l'abocador de Garraf, per la seva amabilitat.

A la Dra. Solanas i en Jordi, del departament de Microbiologia de la Facultat de Biologia de la UB.

Al Servei de dibuix i disseny gràfic de Geologia: especialment a en Quique, i a en Joan Ros.

Al Servei tècnic de la UB. Evelio Lantigua. Per la rapidesa en les reparacions i el bon servei.

A l'Emilio, l'encarregat del servei de restaurant de la Facultat de Biologia per proporcionar-me les torrades pels ratolins, i per la seva amabilitat.

El Dr.Riera del departament de Fisiologia Animal , pel seu ajut en els meus inicis en el tractament de sang.

Al Dr. X. Ferrer per deixar-me utilitzar la fotografia de l'*Apodemus sylvaticus* pel pòster i per la memòria de la tesi.

A la Georgina Castellà i la Núria Castells de l'Oficina del Servei de Llengua Catalana de la UB, pel seu ajut en les meves consultes sobre terminologia en català.

També a la beca FPI del MEC.

I ara uns agraïments més:

Al meu segon ordinador, per no haver-me fet la punyeta com el primer...i permetre'm treballar.

A l'Isaac, en Xip i en Tolino, per la seva companyia i el seu gran afecte. Per acompanyar-me en les passejades.

---

El millor i més bonic que m'ha passat en tot aquest període són les persones que he conegut, i les persones amb qui he tingut el plaer de treballar, o de conviure; penso, que he tingut molta sort. L'oportunitat de viatjar, aprendre, i les moltes i noves experiències que he viscut, també en són una part important.

---