



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**Análisis de las causas de fragmentación de ADN en
células procariontes y eucariontes**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Pineda Escobar María Eugenia

Matrícula: 2162034364

ASESORES

**Dra. Martha Rodríguez Gutiérrez (3059)
Laboratorio de Reproducción, Genética y Sanidad Acuícola**

**Dra. Mariela González Rentería (2163805465)
Doctorado en CBS de la UAM-X**

Ciudad de México

Fecha: agosto 18, 2021

Agradecimientos

Al ADN, a la tierra por permitirnos la sobrevivencia y a las circunstancias por crearnos carácter. Gracias a la hermosa naturaleza.

A la Dra. Martha Rodríguez Gutiérrez, por inspirarme desde el primer día que tome clases con ella en Historias de Vida, por su forma de hablar de a biología; por llevarme de la mano en los inicios de mi vida profesional, por abrirme las puertas de su laboratorio, por hacerme participe en sus proyectos actualmente, por la confianza en mí, por compartirme su conocimiento y sabiduría, por su tiempo para aclarar mis dudas, por permitirme seguir aprendiendo y creando conocimiento.

A la Dra. Mariela Gonzales Rentería por ser parte de este proyecto, por su gran apoyo, sabiduría y conocimientos brindados, desde el inicio hasta hoy día, por su tiempo para orientarme, para aclarar mis dudas, por su paciencia e interés, por transmitirme confianza, seguridad y fortaleza en el ámbito profesional y por permitirme conocerle su lado humano.

A mi madre María Teresa, por ser una mujer valiente, noble y amorosa, por transmitirme todo ese enorme amor y sencillez, por enseñarme a ser sincera y responsable; porque desde chiquita escuchaba mis sueños y me impulsa día a día a lograrlos, por siempre estar conmigo en mis complicaciones de salud, por consentirme y abrazarme en mis momentos más difíciles; por ser mi apoyo incondicional. Siempre estaré para ti, y siempre vivirás en mí, quiero verte fuerte y disfrutando la vida, juntas.

A mi padre Eugenio, por poseer un corazón enorme, nobleza y sencillez, por ser trabajador, honesto, respetuoso, amoroso; porque desde pequeña ha sido mi cómplice y comparte mi amor por la naturaleza, por las caminatas para ir a buscar hongos, por enseñarme de plantas, de árboles, de animales; por abrazarme cuando más frágil me he sentido, por creer en mí y tener su apoyo y amor incondicional en todos mis caminos. Siempre estaré para ti, y siempre vivirás en mí, amo verte feliz y con muchos sueños por delante.

A mi hermano José Arturo Pineda Escobar, por llegar a mi vida como tanto anhelaba, por tener un valor humano inigualable, por tener un corazón tan noble y por ser tan valiente; por creer en mí, por estar siempre conmigo, por ser mi confidente, y por hacerme café en mis momentos de desvelos. Mereces y lograras todo lo que sueñas, lucha por ello.

A mis abuelitos Isauro y Alfredo, por sus raíces y sus historias de experiencias de vida que me han compartido por ser tan fuertes, y por brindarme amor siempre que los veo, los amo con todo mi corazón; a mis Abuelitas: Mena, Macrina y Teresa, por siempre darme amor, por ser unas mujeres valientes, trabajadoras, humildes, sencillas y muy amorosas, un beso hasta el cielo mis guerreras.

A mis mascotas: Nala y Rex por pasar conmigo a un lado de la computadora o en mis piernas muchas noches de desvelo, por siempre estar.

A mi familia en general y mis amigos de vida, Andrea, Alejandra, Alfredo por confiar, apoyarme desde el inicio en este camino y que siguen conmigo festejando mis logros y acompañándome en mis fracasos. Quiero que siempre estén conmigo.

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por abrirme sus puertas, por permitir seguir siendo parte de ella; a mis profesores de carrera por transmitir siempre su conocimiento con amor, en especial a aquellos de quien aprendí a formarme con ética y con conocimientos biológicos, en el aula, en laboratorio y sobre todo en campo, y a los que me permitieron conocerlos más que profesores, su lado humano.

A mis amigos que conocí en la universidad, por su apoyo incondicional, por los días de estudio, por tiempos de estrés por sacar los proyectos, por construir el conocimiento y también aprender de cada uno de ellos, académicamente y como personas; por aquellas carcajadas, principalmente en el caracol, por las hermosas prácticas de campo y las experiencias en laboratorio que fomento que nos convirtiéramos en una pequeña familia: por las grandes experiencias y alegrías como cantos, baile y grandes platicas; por compartir ese amor hacia la biología, y por aquellos momentos únicos, por formar parte de este camino e impulsarme tener confianza propia y ser mejor profesional, sobre todo gracias a los que permanecen en mí vida, siempre estaremos. Nos quedan más viajes por ir a biología, seguir aprendiendo y compartir experiencias de vida.

"Si realmente amas la naturaleza, encontraras belleza en todas partes"

Vicent Van Gó

"Biológicamente, tenemos una dependencia total, la independencia de la biosfera significa la muerte." Lynn Margulís

Resumen

En ciencias biológicas, implementar evaluaciones de la fragmentación del ADN en cualquier tipo celular, es indispensable para asegurar que esta cumpla su función vital en cualquier nivel de organización, debido a regularmente están sujetas a daño su ADN, derivado de las condiciones ambientales que cada vez se ven afectadas por el incremento de contaminación y los desechos tóxicos, que en su mayoría son causados actividades antrópicas. Hay poco interés en evaluar la fragmentación del ADN, a excepción de células humanas, y además poco conocimiento de las técnicas que se pueden implementar en células de organismos, animales y plantas, e inclusive otros con funciones indispensables para la estabilidad de los ecosistemas. El objetivo general fue determinar y analizar las causas que producen fragmentación de ADN en células procariontes y eucariontes, y las principales metodologías para su evaluación. Se realizó la búsqueda de artículos y tesis de los últimos cinco años (2017-2021) que evaluaron la fragmentación del ADN, en diferentes áreas de estudio como: el uso inadecuado de los antibióticos, ecotoxicidad, enfermedades, reproducción, de acuerdo con los criterios de inclusión, mediante un análisis comparativo. Como resultado, se recopiló 43 investigaciones que evalúan la fragmentación de ADN, de las cuales, organismos procariontes fueron 11, se observa que la principal causa de fragmentación es el uso inadecuado de los antibióticos. En el área de la ecotoxicidad este tipo de estudios no se ha implementado en procariontes; mientras que para las células eucariontes se registraron 32 estudios donde predominan las evaluaciones en humanos, las áreas de estudio fueron: enfermedades degenerativas, reproducción y ecotoxicidad, el tema mayor estudiado fue fragmentación espermática. La técnica más utilizada con 21 evaluaciones fue el ensayo cometa, seguida de TUNEL con 14 estudios, aplicado a la evaluación del ADN espermático. Se concluye que la principal causa de fragmentación se debe al incremento del estrés oxidativo, producto del incremento de la exposición a tóxicos que derivan del incremento de la contaminación; se sugiere efectuar análisis del daño del ADN en diversos niveles de organización, y finalmente utilizar la técnica del Ensayo Cometa debido a que evalúa célula a célula y se ajusta a cualquier tipo celular, además de ser que es accesible y rentable.

Palabras clave: *daño en ADN, tipos celulares, metodologías, factores, consecuencias.*

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. 1. Ácido desoxirribonucleico	2
II. 1. 1. ADN en la célula procarionte	2
II. 1. 2. ADN en la célula eucarionte	3
II. 2. Causas que determinan la fragmentación del ADN	4
II. 2. 1. Impacto sobre la fragmentación del ADN bacteriano generado por los antibióticos	4
II. 2. 2. Impacto de la fragmentación del ADN bacteriano generado por ecotoxicidad en los ecosistemas	6
II. 2. 3. Enfermedades en eucariontes derivadas de la fragmentación de ADN en diversas células	6
II. 2. 4. Importancia del estudio de la fragmentación del ADN para la reproducción de los organismos eucariontes	7
II. 2. 5. Organismos indicadores ambientales (Genotoxicidad-Ecotoxicidad)	7
II. 2. 6. La integridad de ADN para la conservación de la biodiversidad	8
II. 3. Principales Técnicas para la evaluación de fragmentación del ADN	8
II. 3. 1. Ensayo Cometa	8
II. 3. 2. Ensayo TUNEL	10
II. 3. 3. DBD-FISH	11
II. 3. 4. Ensayo de Micronúcleos (MN)	12
III. Objetivos	14
III. 1. Objetivo general	14
III. 2. Objetivos particulares	14
IV. Metodología	15
V. Resultados	16
VI. Discusión	23
VII. Conclusiones	30
VIII. Bibliografía	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según su acción	5
Tabla 2. La fragmentación del ADN y su implicación con respecto al uso de los antibióticos.	17
Tabla 3. Fragmentación de ADN de células eucariotas y su implicación con enfermedades de interés en la medicina humana y veterinaria	18
Tabla 4. La fragmentación del ADN en espermatozoides.	19
Tabla 5. Fragmentación de ADN en óvulos.	20
Tabla 6. Fragmentación de ADN en gametos.	20
Tabla 7. La fragmentación del ADN de células eucariotas y su implicación con la ecotoxicidad	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de célula procariota	2
Figura 2. Estructura de células eucariotas: a) animal, b) vegetal	3
Figura 3. Metodología estándar del Ensayo Cometa	9
Figura 4. Clasificación morfológica de los núcleos por el nivel de daño del ADN	9
Figura 5. Ejemplo del ADN espermático por medio de Ensayo TUNEL: etiquetados negativos (1, 2 y 3) y positivos (a – g) que indican que están intactos y fragmentados respectivamente	11
Figura 6. Ejemplo de espermatozoides degradados después de la detección de rotura de ADN-fluorescencia in situ hibridación (DBD-FISH) utilizando sonda entera (a) y secuencias específicas (b, c). Los loci de ADN satelital clásicos de 5 bp (b) exhiben un etiquetado DBD-FISH de referencia notablemente más fuerte que las secuencias alfoides (c)	12
Figura 7. Ejemplo de la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos	13
Figura 8. Fragmentación ADN, tipo celular, área y metodología empleadas (Elaboración propia de Simon et al., 2019).	16
Figura 9. Número de metodologías que evalúan la fragmentación del ADN en las investigaciones consultadas.	22

I. Introducción

En los diferentes niveles de organización, la principal intención de las especies es su conservación genética, que los nuevos organismos sean aptos para resistir al ambiente y prevalezcan lo largo de generaciones (Rocha y Gasca, 2007).

Tras los hitos del ADN y desde su elucidación realizada por Watson y Crick en 1953, se ha determinado que la uniformidad de los organismos, debido a la estructura primaria del ADN, la cual se encarga de transmitir la información genética a próximas generaciones (Mora-Gallardo y Van, 2019).

Con base en el conocimiento de la estructura del ADN, cadena de doble hélice, ha permitido contribuido a que muchos investigadores, lo implementen con descubrimientos que repercuten en diversas Áreas de conocimiento científico como son: biología, química, medicina, física e ingenierías como la bioinformática (Arnold *et al.*, 2016).

La integridad del ADN permite el funcionamiento óptimo de la célula para que esta cumpla su función; sin embargo, se sabe que el material genético es susceptible a ser dañado por numerosos agentes y/o procesos provocados por las condiciones del medio celular (Zúñiga-Venegas, 2009).

El conocimiento en las células procariotas y eucariotas de la forma y distribución del ADN es importante para determinar y realizar la forma de evaluación de su fragmentación. Por ejemplo, en las células, procariontes, que carecen de histonas, la metodología a utilizar para determinar el daño en el ADN debe ser ajustado, a diferencia de los métodos ya establecidos para eucariotas (Zúñiga-Venegas, 2009; Salomón, 2013; Ahammed, 2019).

La fragmentación del ADN en diversas células ocasiona las mutaciones, transformación carcinogénica, muerte celular, entre otros, provocado por diferentes agentes endógenos entre ellos los radicales libres de oxígeno provenientes de la respiración celular, por agentes exógenos, un ejemplo como luz ultravioleta, además los factores contaminantes que han incrementado; en conjunto, inducen dímeros de pirimidina y la radiación ionizante que produce gran variedad de daños sobre las bases nitrogenadas (Cardona-Tafurt y Marin-Morales, 2014).

Lo anterior, ha despertado el interés en la comunidad científica para implementar metodologías que evalúan el daño al ADN; razón por la que la presente investigación analiza las principales causas de la fragmentación del ADN en células procariontes y eucariontes, la aplicación de técnicas que contribuyen al conocimiento en las áreas donde se han implementado su evaluación como: la medicina humana y veterinaria, la reproducción de los organismos, ecosistemas contaminados, que tienen aplicación directa y en conjunto contribuyen en la conservación de la biodiversidad.

II. Marco teórico

II. 1. Ácido desoxirribonucleico

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información genética necesaria para el funcionamiento de un organismo; es un polinucleótido con longitud indefinida, cada nucleótido se compone de tres unidades separadas: un azúcar de cinco carbonos desoxirribosa, una base nitrogenada: adenina, guanina, citosina o timina, y un grupo fosfato (PO_4). Los ácidos nucleicos son moléculas largas, en que los nucleótidos están unidos por puentes de hidrógeno con una secuencia definida, es decir que, para cada adenina le corresponde una timina, y para cada citosina una guanina; de lo cual depende la replicación semiconservativa, cada una de las dos cadenas del ADN bicatenario, funciona como molde para producir nuevas cadenas (Lewin, 2008; Salomón, 2013).

El ADN contiene la información genética y determina las características hereditarias, debido a que está a nivel molecular y compactada a través de una compleja serie de interacciones entre sus bases nitrogenadas, dicha secuencia se utiliza para producir todas las proteínas del organismo y tienen la capacidad de construir estructuras y de llevar a cabo las reacciones metabólicas necesarias para la vida (Schrödinger, 1944; Lewin, 2008).

II. 1. 1. ADN en la célula procarionte

Las células procariontes, antes del núcleo, se caracterizan por presentar una cápsula, pared celular y membrana plasmática que la protege, el ADN se encuentra regado en el citoplasma al igual que los ribosomas, en ocasiones puede presentar flagelos como se observa en la figura 1 (Karp, 2009).

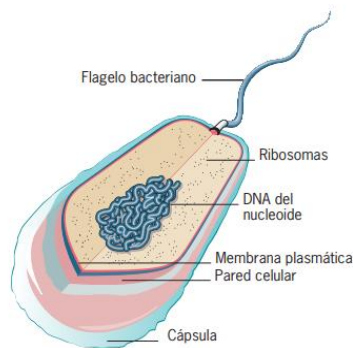


Figura 1. Estructura de célula procarionte (Karp, 2009).

En las células procariontes, el material genético se caracteriza por ser una molécula grande y circular que está débilmente asociado con diversas proteínas y carece de una membrana que lo rodee (Curtis, 2008). El genoma se encuentra libre en el citoplasma en forma de un agregado de moléculas de ADN dúplex circulares, en bacterias, no existen proteínas asociadas al ADN con una función equivalente al de las histonas (Platter y Hentsche, 2001).

El tamaño del ADN se ajusta en el citoplasma, esto se debe a la ausencia de compartimentación interior dentro de ella. En las bacterias a diferencia de las células eucariotas, son capaces de replicar su ADN a lo largo de todo su ciclo celular (Platter y Hentschel, 2001; Salomón, 2013).

El ADN plasmático, es genoma autónomo de ADN circular y cerrado, constituido por un replicón independiente, es decir, que se replica una sola vez al mismo tiempo que el cromosoma bacteriano, y son capaces de replicarse durante un ciclo infeccioso y crean inmunidad bacteriana (Lewin, 2008).

Cabe mencionar que las mutaciones presentes en microorganismos son derivadas de operaciones celulares normales, o bien causadas por alteraciones aleatorias del ambiente, además de ser provocadas por la ineficacia y uso desmedido de los antibióticos como profilácticos y terapéuticos en el control de enfermedades provocadas por bacterias, causando resistencia en ellas (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016; OMS, 2021).

II. 1. 2. ADN en la célula eucarionte

Las células eucariotas, núcleo verdadero, tienen una estructura más compleja como se observa en la figura 2: a) eucariote animal, se observa el núcleo, que contiene el nucleoplasma y el nucléolo; el retículo endoplasmático rugoso; el peroxisoma; el centriolo; los microtúbulos; la vesícula; el citosol; la membrana plasmática; los microfilamentos; el retículo endoplasmático liso; el aparato de Golgi; la mitocondria y los ribosoma, mientras que en b) eucariota vegetal se observa el núcleo, que contiene al neoplasma y el nucléolo; además, el retículo endoplasmático rugoso; la pared o membrana plasmática; el plasmodesmo; la mitocondria; los ribosomas; la vesícula; el citosol; el cloroplasto; el retículo endoplasmático liso; el peroxisoma; el aparato de Golgi; la vacuola y los microtúbulos, asíéndola más compleja (Gómez-Álvarez, 2007; Karp, 2009).

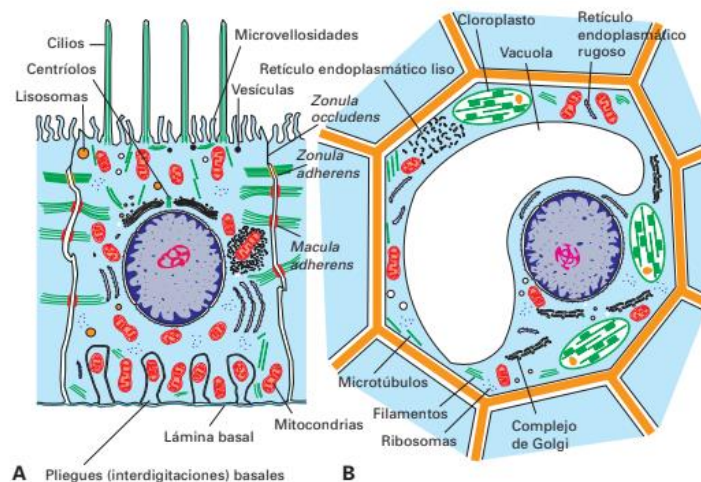


Figura 2. Estructura de células eucariotas: a) animal, b) vegetal (Gómez-Álvarez, 2007).

Las células eucariotas contienen más ADN que en las células procariontas, y al ser más complejo y compacto, requiere la unión con histonas a lo que se le denomina nucleosoma, solo, en los espermatozoides el ADN se compacta con la protamina, lo cual determina que las células en interfase solo se observe el núcleo (Salomón, 2013; Sybenga, 2020).

II. 2. Causas que determinan la fragmentación del ADN

La fragmentación de ADN consiste en las roturas de estructura fosfodiéster y se escinde por la actividad de la endonucleasa, es la característica principal de la muerte celular, por tanto, determina como un marcador de apoptosis, en este sentido, el ADN fragmentado repercute el funcionamiento celular y acontece en respuesta a varios estímulos ambientales en las variedades de tipos celulares (Nagata, 2000; Majtnerová y Roušar, 2018).

Los organismos están expuestos a agentes liberados al ambiente, principalmente por actividades son los físicos que incluyen las radiaciones en todos sus espectros, los compuestos químicos inorgánicos expuestos en el medio, y los biológicos dado por parásitos, bacterias, hongos e inclusive por virus y en conjunto generan genotoxicidad, que afecta el metabolismo celular e incluso del organismo; de igual manera los hábitats potencialmente tóxicos generan altos o bajos niveles de oxígeno y desencadenan estrés osmótico. En conjunto puede generar consecuencias severas como la extinción de especies, de poblaciones, comunidades e incluso del mismo ecosistema (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015; Corrales *et al.*, 2015; Marca-Yupanqui, 2017).

La fragmentación del ADN en organismos procariontes y eucariontes está causada por la alteración de los hábitats y en las primeras, por el uso indiscriminado de los antibióticos y en ambos casos afectan la conservación de la biodiversidad con diferentes impactos.

II. 2. 1. Impacto sobre la fragmentación del ADN bacteriano generado por los antibióticos

El uso de agentes antimicrobianos es el área terapéutica de la medicina humana y animal es indispensable para evitar la proliferación de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos y son necesarios para producir la muerte celular; cabe mencionar que también fragmentan el ADN de los microorganismos debido a que la mayoría de los antibióticos actúan de manera inespecífica (Hoyo- Santisteban, 2017).

Los agentes bactericidas generan acción terapéutica irreversible y los agentes bacteriostáticos inhiben el desarrollo y reproducción; el efecto del antibiótico depende del medicamento aplicado, la dosis administrada y el tipo de microorganismo (Cobertura de Salud, 2017).

Por otro lado, Perdomo-Hernández (2014) clasifica a los antibióticos según su acción en la célula bacteriana, como se observa en la tabla 1; es indispensable mencionar a los antibióticos que realizan la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos como la Rifampicina, actinomicina D, ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina.

Tabla 1. Clasificación de los antibióticos según su acción (Perdomo-Hernández, 2014).

ANTIBIÓTICO	MODO DE ACCIÓN
Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina, Oxacilina, Nafcilina, Bacitracina	Inhibición de las síntesis de la pared celular
Polimixinas, Nistatina, Anfotericín B.	Lesión de la síntesis de la pared celular
Cloranfenicol, Aminoglucósidos, Eritromicina, Tetraciclina	Inhibición de la síntesis proteica
Rifampicina, Actinomicina D, Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina, Norfloxacina.	Inhibición de síntesis la de ácidos nucleicos
Trimetopim, Sulfonaminas	Antimetabolitos
Sulbactam, Clavulanato, Tazobactam	Inhibidores de betalactamasas

No obstante, Golan *et al.* (2012) mencionan que los mecanismos de acción de los fármacos dependen de la genética bacteriana, debido a que actúan en dianas moleculares, y se genera la resistencia por las mutaciones que se encuentran dentro del gen que codifica el objetivo, además que existen tres de fármacos que actúan sobre la replicación, transcripción y traducción del ADN bacteriano:

1. Quinolonas: Inhiben determinadas topoisomerasas y las convierten en fármacos que lesionan el ADN.
2. Los derivados de la rifamicina se unen al ARN polimerasa bacteriana y la inhiben.
3. Los fármacos dirigidos a los ribosomas bacterianos: Inhiben la síntesis de proteína y actúan en organismos Gram positivos y en Gram negativos.

II. 2. 2. Impacto de la fragmentación del ADN bacteriano generado por ecotoxicidad en los ecosistemas

Las bacterias aerobias como anaerobias son indispensables para la salud ecosistémica y a su vez contribuyen al mantenimiento de la biósfera. Sí las condiciones de los hábitats de las bacterias sobrepasan los niveles permisibles de los índices tóxicos de contaminación, se produce fragmentación del ADN, que en consecuencia, desencadena desequilibrio en los ecosistemas; debido a que los microorganismos ya sean terrestres o acuáticos, tienen un alto porcentaje en la participación de la producción primaria y están involucrados en todas las etapas de la degradación de la materia, finalmente son clave para contrarrestar los contaminantes con huella antrópica (Lugioyo *et al.*, 2018).

Uno de los principales problemas que contaminan los ecosistemas, y daña a la población bacteriana de los ecosistemas, son las industrias farmacéuticas, cada vez, se están desarrollando más medicamentos con ineficacia y mayor dependencia, adicción a ellos, que han inducido al incremento de su fabricación, no obstante, se ha demostrado que generan contaminación, principalmente en ecosistemas acuáticos, por la inadecuada gestión de los residuos, y por ende, afecta a la salud de los ecosistemas (Mackliff-Jaramillo *et al.*, 2020). Las especies bacterianas de los sistemas acuáticos están mucho más expuestas a los desechos de los antibióticos y les causan toxicidades (González-Pleiter *et al.*, 2013).

Otra de las causas de contaminación más severas es la presencia de hidrocarburos, metales pesados, en el suelo y principalmente en cuerpos de agua, y puede ocasionar genotoxicidad a las bacterias nativas de los ecosistemas lo que se traduce a la inestabilidad genómica, no obstante, los avances científicos han sugerido la implementación de bacterias que degradan el petróleo, y los contaminantes, (Cardona-Tafurt y Marin-Morales, 2014).

II. 2. 3. Enfermedades en eucariontes derivadas de la fragmentación de ADN en diversas células

En el área de la medicina humana y veterinaria, el estudio de la fragmentación de ADN celular, es indispensable debido a que es un factor que provoca infinidad de enfermedades, por el declive del funcionamiento de dicha molécula quien constantemente está expuesta a agentes tóxicos, endógenos y exógenos, que provocan alteraciones celulares y la modificación del material genético causantes de múltiples impedimentos de funciones esenciales (Prados-Carvajal, 2009; Tonina *et al.* 2017).

Las características de los trastornos que ocasionan los fragmentos de ADN, dependen del tipo de célula y su función en el organismo, al ser más complejos en este nivel jerárquico, se van

especializando de acuerdo a la estructura y función característica de la célula somática, por ende, se desencadenan múltiples enfermedades específicas en torno a su función, contribuye a la apoptosis e inclusive necrosis (Luevano-Martínez, 2017).

Aunado a esto, Zúñiga-Venegas (2009) indica que la reparación del ADN es la segunda línea de defensa contra los efectos de los agentes genotóxicos, y la mayoría de las veces los daños en el ADN son reparados antes de que la célula entre al proceso de la replicación, y da como resultado a las mutaciones, no obstante, la capacidad de reparación puede influir el riesgo de cáncer principalmente y de otras enfermedades raras con defectos en los genes que codifican para proteínas de reparación.

II. 2. 4. Importancia del estudio de la fragmentación del ADN para la reproducción de los organismos eucariontes

La biología de la reproducción de organismos eucariontes, ha ido incorporando una serie de estrategias reproductivas entre ellas predomina la reproducción sexual, la cual se lleva a cabo mediante la fusión de los gametos; sin embargo, no siempre ocurre de manera perfecta, se ha evaluado que la fragmentación de ADN en los espermatozoides es el principal factor de infertilidad masculina (Simon *et al.*, 2019).

En concreto, la integridad espermática interviene en el momento de producir descendencia, en la conservación de una especie determinada y en la expresión de la información genética, por consiguiente, en los últimos años se ha puesto en prioridad el estudio de su fragmentación (Wiweko y Utami, 2017).

II. 2. 5. Organismos indicadores ambientales (Genotoxicidad-Ecotoxicidad)

Laffon *et al.* (2006) aluden que la contaminación del ecosistema, ya sea acuático o terrestre, se produce cuando este pierde sus propiedades y su capacidad de mantener los procesos biológicos esenciales, que ocasionan enfermedades, afectaciones en su reproducción de las especies, que puede llegar a su extinción, en cierto modo, afectan a las comunidades de un ecosistema determinado. De tal manera se considera indispensable analizar la genotoxicidad de los factores bióticos como indicadores ambientales presentes en un ecosistema contaminado.

Los organismos claves que se determinan como indicadores genotóxicos ambientales dependen del interés del investigador y en el ecosistema *in situ*, las evaluaciones de la integridad del ADN de dichos organismos, son importantes por el incremento de contaminación que afecta la salud de los componentes del ecosistema y del mismo, que se refleja a su vez en la salud humana; y que en conjunto afectan a las generaciones futuras (Valencia-Quintana *et al.*, 2013).

Por ello, el monitoreo de contaminantes en el ambiente a nivel genético tiene dos propósitos: el primero, analizar su riesgo para los organismos que habitan el ecosistema y el segundo la evaluación del riesgo a su exposición para los humanos (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015). Finalmente, la aplicación de estudios de genotoxicidad se da en organismos bioindicadores porque evalúa la presencia y acción de contaminantes en el medio donde la especie vive (Luevano-Martínez, 2017).

II. 2. 6. La integridad de ADN para la conservación de la biodiversidad

Se habla de conservación de la biodiversidad en relación al ADN fragmentado porque tiene relación con las condiciones ambientales donde el organismo habita. Debido a que el ADN, es quien contiene la información genética necesaria para el correcto desarrollo, funcionamiento y estabilidad de la biota de los ecosistemas (Prados-Carvajal, 2019). Es decir, el mantenimiento óptimo de la molécula responde a las adversidades ambientales, asegura la adaptación de las especies en los diferentes niveles jerárquicos, además de su éxito reproductivo, que se traduce a la transmisión genética entre generaciones con la finalidad de que la especie prevalezcan en la biosfera.

II. 3. Principales Técnicas para la evaluación de fragmentación del ADN

II. 3. 1. Ensayo Cometa

Rodríguez-Rey *et al.* (2016) define que el ensayo cometa, también conocido como electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos.

El Ensayo Cometa o electroforesis de célula única ha sido descrito como un nuevo método para la detección del daño del ADN por Sing (1988) en su artículo titulado "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell's", publicado en la revista, *Experimental Cell Research*, en el que se plantea la cuantificación del daño en células individuales; análisis linfocitos humanos expuestos a rayos X y midió el grado de migración del ADN a través de la electroforesis de microgel de celda única en condiciones alcalinas, al obtener los resultados esperados, reporta que la técnica es sensible y útil para detectar daños y reparar células individuales.

Por consiguiente, Zúñiga-Venegas (2009) describe el protocolo estándar del Ensayo Cometa, el cual se realiza en condiciones de pH alcalinas con ligeras modificaciones del original, consiste en las siguientes etapas (Figura 3); sin embargo, la técnica es sometida a modificaciones necesarias dependiendo del tipo de célula.

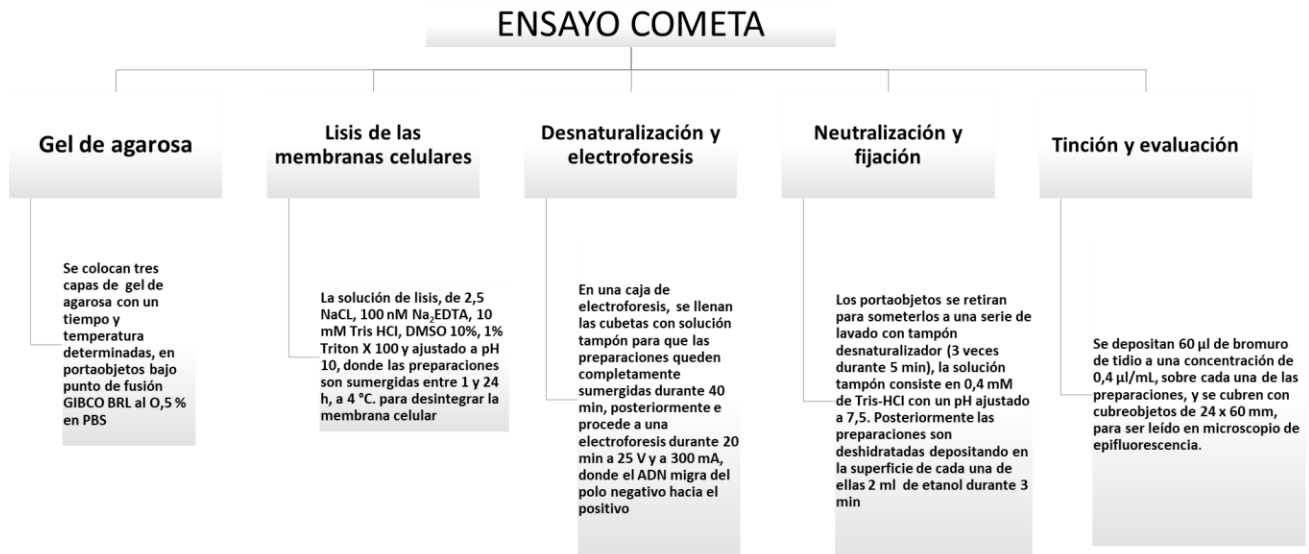


Figura 3. Metodología estándar del Ensayo Cometa (Elaboración propia con información de Zúñiga-Venegas, 2009).

Finalmente, los cometas se evalúan por el nivel de daño como se observa en la siguiente figura (Muñoz-Aristizábal, 2009).

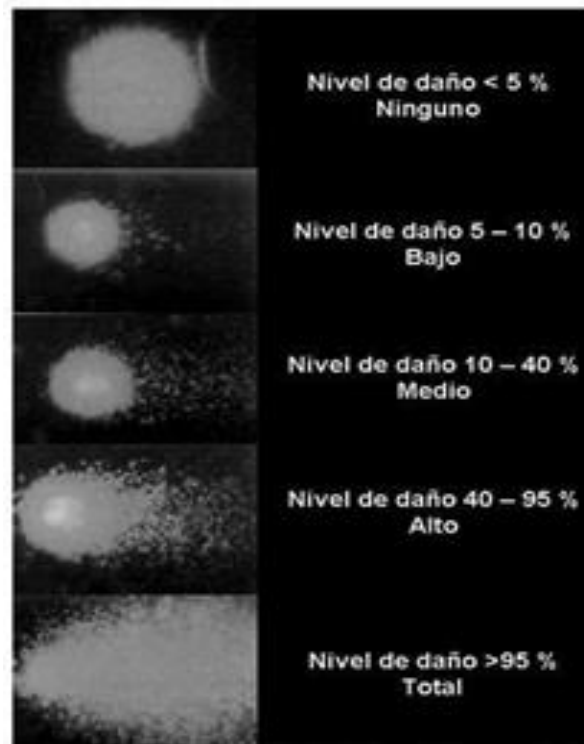


Figura 4. Clasificación morfológica de los núcleos por el nivel de daño del ADN (Muñoz-Aristizábal, 2009).

Como consecuencia el Ensayo Cometa, ha sido a lo largo del tiempo adaptado a múltiples especies, además de los humanos, que viven en lugares contaminados como: plantas, protozoarios, pequeños crustáceos, insectos, lombrices de tierra, moluscos, peces, anfibios y mamíferos silvestres (Ansoar-Rodríguez *et al.*, 2015). En resumidas cuentas, se ha convertido en un método establecido para el estudio del daño del ADN de células individuales con múltiples aplicaciones, además es peculiar por su simplicidad, sensibilidad, versatilidad rapidez y economía (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

II. 3. 2. Ensayo TUNEL

El Ensayo TUNEL evalúa la fragmentación del ADN que se asocia con la muerte celular, el método se basa en la identificación de los extremos rotos del desoxinucleotidilo transferasa (dUTP) (TUNEL) (Moore *et al.*, 2021). Fue Gorczyca *et al.*, (1992) quienes estandarizaron el Ensayo TUNEL con el interés de evaluar células sanguíneas, HL-60, características de leucemia, y determinaron que las roturas de ADN medidos por Ensayo TUNEL se asocian con las endonucleasas.

Es preciso añadir que el principio de la técnica del Ensayo TUNEL, se basa en el etiquetado de 3'OH termina por una enzima de ADN específica de 3'OH, del (dUTP). El uso de polimerasa de ADN en lugar de TdT puede ayudar a determinar el tipo de extremos de 3'OH (nicks, gaps, o oligos colgantes) porque las polimerasas de ADN necesitan la hebra de ADN opuesta, además la producción de 3'OH ADN no es exclusiva de endonucleasas apoptóticas, 3'OH los extremos del ADN, son una señal importante de la mayoría de las enzimas en eucariotas (Moore *et al.*, 2021).

La cinética de tinción de dicho Ensayo, depende de la concentración del reactivo, la fijación del tejido, extensión de la proteólisis y accesibilidad de la cadena de ADN que varía entre los tipos de tejidos, por ello, la importancia de estandarizar una técnica utilizando secciones de tejido con tratamiento de ADNasa como control positivo y sin tratamiento con TdT como control negativo de apoptosis para evitar resultados falsos, como se muestra en la figura 5 (Ming-Wen y Kent-Lloyd, 2020).

De acuerdo con Moore *et al.* (2021) consideran que el Ensayo TUNEL es sensible, rápido y el más utilizado a nivel mundial, además se puede utilizar en células y tejidos cultivados y para todos los mecanismos de muerte celular, finalmente añade que es preciso, cuantitativo, fácilmente vinculado a células particulares o compartimentos de tejido, y se puede combinar con inmunohistoquímica para permitir una identificación confiable de los tipos celulares o mecanismos de lesiones celulares.

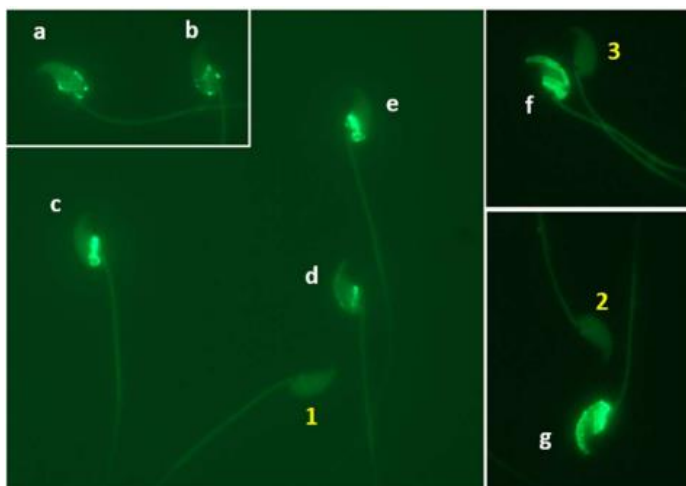


Figura 5. Ejemplo del ADN espermático por medio de Ensayo TUNEL: etiquetados negativos (1, 2 y 3) y positivos (a – g) que indican que están intactos y fragmentados respectivamente (Ming-Wen y Kent-Lloyd, 2020).

Aunado a lo anterior, la técnica se aplica a diferentes tipos células somáticas y genéticas que intervienen en las líneas de investigación, además se considera como uno de los métodos histoquímicos estándar para detectar y cuantificar células apoptóticas de suspensiones celulares, líneas celulares adherentes y tejidos en etapas posteriores de muerte celular programada, además es aceptado para establecer apoptosis *in vitro* e *in situ*, de igual manera, es capaz de detectar la fragmentación de ADN no sólo en células apoptóticas (Majtnerová y Roušar, 2018).

II. 3. 3. DBD-FISH

DBD-FISH (detección de rotura de ADN-FISH) detecta y cuantifica la fragmentación del ADN celular dentro del genoma o en áreas de secuencia de ADN específicas, esta técnica se caracteriza por los procedimientos de encamado de microgel, ensayos de desenrollamiento de álcalis y FISH; posteriormente las células atrapadas dentro de una matriz de agarosa sobre un portaobjetos se sumergen en una solución de desenrollado alcalina que produce ADN monocatenario (ssDNA), comienza en los extremos de la molécula o se rompe la hebra interna, pasa el proceso de la neutralización y eliminación de proteínas en soluciones de lisis, el microgel se deshidrata y las células se incuban con sondas de ADN. La cantidad de sonda hibridada en una secuencia diana se relaciona con la cantidad de ssDNA generado por el paso de desenrollado y es proporcional al grado de rotura local del ADN (Fernández y Gosálvez, 2002).

El DBD-FISH, se considera como una técnica sencilla y fácil de aplicar, además de realizar en análisis *in situ* de la fragmentación de ADN, se puede realizar en todo el genoma, sino también en regiones específicas de cromatina, lo que permite la heterogeneidad intra - genómica e inter -

celular. En cuanto mayor sea el fragmento de ADN, se observa en la figura 6, mayor cantidad de teñido de fluorescencia (Fernández y Gosálvez, 2002; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2016).

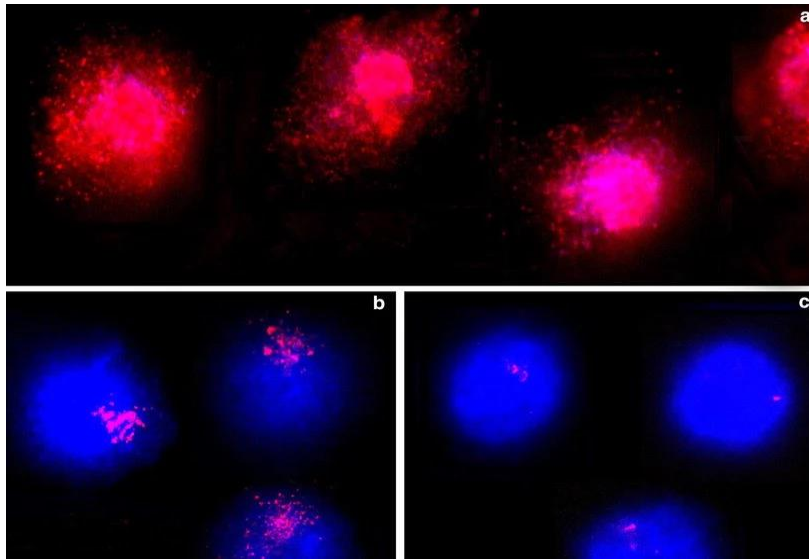


Figura 6. Ejemplo de espermatozoides degradados después de la detección de rotura de ADN-fluorescencia in situ hibridación (DBD-FISH) utilizando sonda entera (a) y secuencias específicas (b, c). Los loci de ADN satelital clásicos de 5 bp (b) exhiben un etiquetado DBD-FISH de referencia notablemente más fuerte que las secuencias aloides (c) (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2016).

Así mismo, la técnica DBD-FISH se emplea con frecuencia en diferentes campos de investigación como la genética clínica, la neurociencia, la medicina reproductiva, la toxicología, la ecología microbiana, biología evolutiva, la genómica comparativa, la genómica celular y biología del cromosoma (Martínez, 2017).

II. 3. 4. Ensayo de Micronúcleos (MN)

Para comprender en qué consiste la técnica, es importante conocer que los micronúcleos son resultado de errores, ocasionados por alteraciones durante la replicación, y división celular, en el material genético durante la división celular; al ocurrir esto, el material genético se desprende y queda excluido porque no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija y origina un núcleo de menor tamaño, denominado micronúcleo (Carranza-López, 2011).

Los autores Countryman y Heddle (1976) estandarizaron la técnica de MN en linfocitos humanos para evaluar la elección de tipos celulares con mayor actividad mitótica, posteriormente dicho ensayo lo mejoró Fenech y Morley en (1985), consiguieron interrumpir el proceso de división celular cuando la célula sólo sufre una división mitótica CBMN: *cytokinesis-block micronucleus*, de esta forma impide la citocinesis celular. Además, está validada internacionalmente como bioensayo de genotoxicidad de sustancias, exposiciones agudas y crónicas, se aplica principalmente para identificar agentes cancerígenos (Castillo *et al.*, 2011).

La metodología de MN en sangre periférica consiste en aislar linfocitos y se siembra, con la finalidad de que se realice la proliferación celular, tras transcurrir 44 horas, el cultivo celular se somete a la acción de citocalasina B se lleva a cabo el bloqueo celular porque las células se someten a un choque hipotónico favoreciendo que se hinchen los citoplasmas, se fijan las células con metanol y finalmente se tiñen las preparaciones para poder verlas al microscopio óptico; el conteo de MN se realiza sobre 1.000 células binucleadas por cultivo e individuo, como se observa en la figura 7 (Zalacain, 2005).

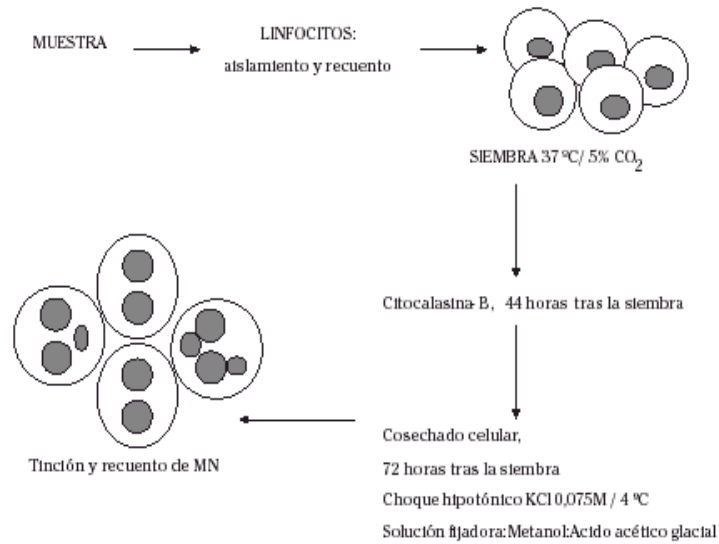


Figura 7. Ejemplo de la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos (Zalacain, 2005).

III. Objetivos

III. 1. Objetivo general

Determinar y analizar las causas que producen fragmentación de ADN en células procariontes y eucariontes, y las principales metodologías para su evaluación.

III. 2. Objetivos particulares

- Determinar los principales factores que causan fragmentación de ADN por área de investigación biológica.
-
- Determinar las principales metodologías para evaluar la fragmentación del ADN en células procariontes y eucariontes.

IV. Metodología

Se consultaron las bases de datos electrónicas de Pub Med y Google Académico, entre el 2017 y 2021, los últimos cinco años, donde se buscó los avances en el estudio de la fragmentación del ADN en células procariontes y eucariontes. Las palabras claves que se utilizaron fueron: fragmentación, ADN, bacteria, enfermedades, espermático, óvulos, gametos, genotoxicidad, ecotoxicidad, evaluación.

Los criterios de inclusión utilizados fueron, buscar las palabras claves por tipo celular, y por área de implementación, primero por células procariontes: antibióticos y ecotoxicidad y para las células eucariontes: enfermedades, reproducción y ecotoxicidad. La inclusión de los datos fue limitada a usar las primeras dos investigaciones por año donde se identificó el tipo de célula de estudio, organismo evaluado, la técnica utilizada y que explicara la causa de estudio.

V. Resultados

En la actualidad la perturbación que tienen los ecosistemas con la utilización de insecticidas, fertilizantes, o agroquímicos en general y en lo particular el uso y abuso de fármacos, así como el cambio climático inciden en alteraciones al ADN de organismos de diferentes grupos taxonómicos, por lo cual el tema de la evaluación de la fragmentación del ADN está teniendo un incremento significativo, ya que permitirá identificar el impacto, y mantener la salud de los organismos y ecosistemas.

Se ha demostrado los efectos que tienen los contaminantes en estos ecosistemas, en salud humana y veterinaria. Pueden provocar genotoxicidad y afectaciones en la reproducción de los organismos. De las investigaciones analizadas se reportan 43 investigaciones, las cuales se observan en las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7, clasificados por área de estudio como se observa en la figura 8.

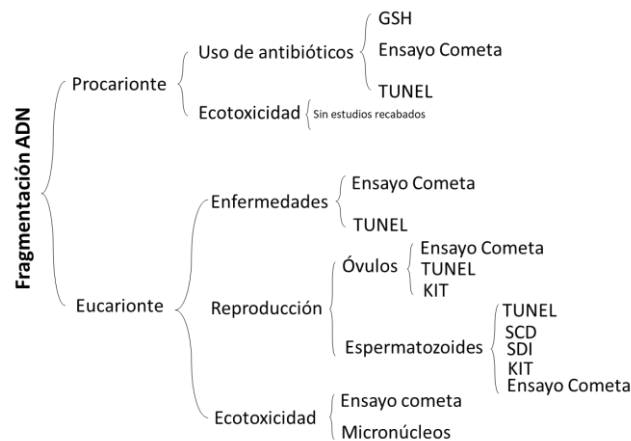


Figura 8. Fragmentación ADN, tipo celular, área y metodología empleadas Elaboración propia con información de (Ajiboye et al., 2018; Anifandis et al., 2018; Simon et al., 2019; Rodríguez – Narváez, 2020 y Ho et al., 2021).

En la tabla 2, se muestra la información de la fragmentación causada por el uso de antibióticos, en el área de la salud humana y veterinaria; sin embargo, a pesar de su importancia, no se determinaron evaluaciones de microorganismos en los ecosistemas como indicadores de alteraciones ambientales.

En cuanto a los organismos eucariontes, la primera área de interés fue la medicina humana y veterinaria, se obtuvieron alrededor de 2, 770, de los cuales se detectó mayormente información sobre la medicina humana en diversos tipos celulares, en la Tabla 3 se observa de manera específica que los linfocitos de sangre periférica, fueron las células más evaluadas.

En la tabla 4, se observan las evaluaciones de la fragmentación del ADN espermático, la cual indica que la técnica más utilizada es Ensayo TUNEL, cabe resaltar que, para esta área, los investigadores

han desarrollado técnicas específicas para evaluaciones de ADN espermático: el ensayo de la estabilidad de la cromatina espermática (SCSA) y dispersión de cromatina espermática (SCD) y que además en los últimos años, se han realizado recopilación bibliográfica de estas evaluaciones, por su importancia e impacto en el área de la reproducción humana.

Tabla 2. La fragmentación del ADN y su implicación con respecto al uso de los antibióticos.

Tipo de bacteria analizada	Causa de análisis	Área de implicación	Metodología	Autor
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas Aeromonas</i> , <i>Aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	Estrés oxidativo causado por el uso de los antibióticos	Médica	GSH	Oloyede <i>et al.</i> (2017).
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , and <i>Staphylococcus aureus</i>	Estrés oxidativo causado por residuos tóxicos presentes en el ambiente	Ecotoxicidad	GSH	Ajiboye <i>et al.</i> (2017).
<i>Acinetobacter baumannii</i> (gram-negativas)	Estrés oxidativo dado por antibióticos	Médica	GSH	Ajiboye <i>et al.</i> (2018).
<i>Escherichia coli</i>	Antibióticos	Médico Ecotoxicidad	Electroforesis en gel	Marathe <i>et al.</i> (2018)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Antibióticos	Médico	Ensayo de desplazamiento de gel de agarosa y TUNEL	Ahammed <i>et al.</i> (2019).
<i>Escherichia coli</i>	Estrés oxidativo dado por efecto de Antibióticos	Médico	TUNEL	Kim y Lee (2019).
<i>Actinobacteria</i>	Residuos a los antibióticos	Ecotoxicidad	Ensayo de desplazamiento (electroforesis)	Ouyang <i>et al.</i> (2019).
<i>E. coli</i>	Resistencia a los antibióticos	Médico	TUNEL	Lee <i>et al.</i> (2020).
Gram positivas <i>Staphylococcus aeurus</i> ,	Resistencia a los antibióticos	Médica	TUNEL	Zheng <i>et al.</i> (2020)
<i>Enterococcus</i>	Antibióticos en cuerpo de agua	Ecotoxicidad y microbiota del ecosistema	TUNEL	Ho <i>et al.</i> (2021)
<i>Escherichia coli</i>	Resistencia a los antibióticos	Médico	TUNEL	Kim y Lee <i>et al.</i> (2021).

Tabla 3. Fragmentación de ADN de células eucariotas y su implicación con enfermedades.

Tipo de célula eucarionte	Organismo	Causa de análisis	Método de evaluación	Autor
Leucocitos (sangre periférica)	Humanos	Herbicida glifosato	Ensayo cometa	Barbosa <i>et al.</i> (2017).
linfocitos (sangre periférica)	Humanos	Cloroquina	Ensayo cometa	Amesquita <i>et al.</i> (2017).
Linfocitos (sangre periférica)	Humanos	Genotoxicidad por glifosato en formulación Roundup	Ensayo cometa	Almeida-Sierra (2018).
Linfocitos (sangre periférica)	Humanos	Daño oxidativo y por metilación	Ensayo cometa	Londoño-Velasco <i>et al.</i> (2018).
Fibroblastos de riñón, queratinocitos del epitelio,	Humanos	Disolventes tóxicos derivados de la biomasa	Electroforesis en gel de agarosa	Zuriaga-Marco (2019).
Células hepáticas	Ratas	Estrés oxidativo ocasionado por la diabetes mellitus	Ensayo cometa	Mendoza <i>et al.</i> (2019).
Epiteliales	Ratón	Radiación UVA, UVB y UVC	Ensayo cometa	Olarte-Saucedo <i>et al.</i> (2020).
Sangre periférica	Humanos	Arsénico en el agua de consumo	Ensayo cometa	Quiroga <i>et al.</i> (2020).
Leucocitos periféricos	Humanos	Daño del ADN con pacientes con cáncer tratado	Ensayo cometa	Pupo-Balboa (2021).
MCF-7 células cancerígenas	Humanos	Efecto de <i>Valeriana rígida</i> y <i>Valeriana decussata</i> en la apoptosis tardía de células cancerígenas	TUNEL	Lizano-Guzmán (2021).

Tabla 4. La fragmentación del ADN en espermatozoides.

Tipo de célula eucarionte	Organismo evaluado	Causa de análisis	Método de evaluación	Autor
Espermatozoide	Humanos	Infertilidad masculina	TUNEL	Ribeiro <i>et al.</i> (2017).
Espermatozoide	Humanos	Infertilidad masculina	TUNEL y SDI	Franco (2017).
Espermatozoide	Humanos	Infertilidad masculina	TUNEL	Kim (2018).
Espermatozoide	Humanos	Infertilidad masculina inducida por el herbicida glifosato	kit Halosperm®	Anifandis <i>et al.</i> (2018).
Espermatozoides	Humanos	Infertilidad	Ensayo cometa, Tunel Assay, Ensayo de estructura de cromatina de espermatozoides (SCD) ensayo de dispersión de cromatina de espermatozoides	Simon <i>et al</i> (2019).
Espermatozoides	Humanos	Infertilidad	Reseña de evaluaciones de técnicas	Hamilton y D'Avila (2020).
Espermatozoides	Humanos	Resultado de la inseminación intrauterina, que implica en la infertilidad.	Ensayo cometa, Tunel Assay, Ensayo de estructura de cromatina de espermatozoides (SCD) ensayo de dispersión de cromatina de espermatozoides	Sugihara <i>et al.</i> (2020).
Espermatozoides	Ratón	Infertilidad después de la criopreservación	TUNEL	Ming-Wen y Knet-Lloyd (2020).
Espermatozoides	Humanos	Infertilidad masculina	TUNEL	Sharma <i>et al.</i> (2021).
Espermatozoides	Humanos	Biomarcador para la pérdida temprana de embarazo	Ensayo cometa	Haddock <i>et al.</i> (2021).

En cuanto a las evaluaciones en las células ováricas, se reportan tres artículos si evaluaron la fragmentación de ADN en óvulos como se observa en la tabla 5, en su mayoría con el Ensayo TUNEL, con interés en la reproducción humana.

Tabla 5. Fragmentación de ADN en óvulos.

Tipo de célula eucarionte	Organismo evaluado	Causa de análisis	Método de evaluación	Autor
Ovocito	Porcino	Interrupción en la maduración nuclear, por la toxicidad	Ensayo cometa	Santos <i>et al.</i> (2017).
Óvulo	Humano	Estrés oxidativo dado por el cultivo <i>in vitro</i>	electroforesis y Kit de TUNEL	Tiwari <i>et al.</i> (2017).
Óvulo	Humano	pacientes sometidas con fertilización <i>in vitro</i>	TUNEL	Ruvolo <i>et al.</i> (2019).

Se reportaron evaluaciones de la fragmentación de ADN espermático principalmente en humanos, en su excepción, se encontró una evaluación de la fragmentación de ADN espermático en la comunidad ictiofaunística. Se utilizaron en Ensayo Cometa y se relaciona con la ecotoxicidad de su hábitat; además con la pérdida de la biodiversidad representado en la tabla 6.

Tabla 6. Fragmentación de ADN en gametos.

Tipo de célula eucarionte	Conjunto de organismo evaluados	Causa de análisis	Método de evaluación	Autor
Espermatozoide	Ictiofauna	Producción de especies nativas	Ensayo cometa	López- Hernández <i>et al.</i> (2018).

Las evaluaciones que se han realizado de toxicidad en organismos bioindicadores de contaminación fueron 659, de las cuales, la célula mayor evaluada es la sangre periférica y muestra un equilibrio en el interés de un organismo de la biota de vida silvestre, como se observa en la tabla 7, en este caso, si realizan evaluaciones en eucariotas vegetales, sin embargo, no dejan de lado a la salud humana; en su mayoría realizan las evaluaciones con el ensayo cometa y con la técnica de micronúcleos.

Tabla 7. La fragmentación del ADN de células eucariotas y su implicación con la ecotoxicidad

Tipo de célula eucarionte	Organismo evaluado	Causa de análisis	Método de evaluación	Autor
Linfocitos de sangre periférica	Humanos	Presencia de hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en el aire	Ensayo cometa	Quijano-Vargas (2017).
Linfocito y células de <i>Leishmania spp</i>	Humanos y <i>Leishmania spp</i>	Genotoxicidad que genera el Látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. "plátano" variedades "seda" e "isla en su uso medicinal.	Ensayo cometa	Mendoza-Almeida (2017).
Eritrocitos de branquias	<i>Tilapia nilotica</i>	Contaminación de agua por materiales pesados	Micronúcleos	Tello-Vallejo (2018).
Sangre periférica	ratones	genotoxicidad provocada por Aceites esenciales provenientes del género <i>Lippia</i>	Ensayo cometa y micronúcleos	Neira <i>et al.</i> (2018).
Sangre periférica	ratón	Acumulación de materiales pesados de <i>Lyomys irroratus</i>	Ensayo cometa	de la Cruz - Guarneros (2018).
Sangre periférica	humano	Contaminación del aire en ambientes internos de viviendas	Ensayo cometa	Tames (2019).
Celulosa	<i>Allium cepa</i>	Ecotoxicidad de agua residual	Micronúcleos	Rodríguez - Narváez (2020).
Células de la mucosa bucal	humanos	Pesticidas	Micronúcleos	Bianco-Sadil <i>et al.</i> (2020).

En la búsqueda de conservación de la biodiversidad, no se encontraron datos que realizaran evaluaciones de la fragmentación de ADN en especies, o conjunto o poblaciones.

Finalmente, en el análisis de las técnicas de evaluación, se observa que la técnica más frecuente para evaluar la fragmentación del ADN es Ensayo cometa, ya que 21 (48%) de investigaciones la ocuparon, seguido del ensayo TUNEL con 14 (32%), la cual se usó principalmente en evaluaciones de fragmentación de ADN espermático, seguido de SCD (4%) y SDI (2%). Además se observa que los demás porcentaje corresponden a evaluaciones de micronúcleos (9 %), GSH (7%) en procariontes y finalmente el implemento de kits (4%).

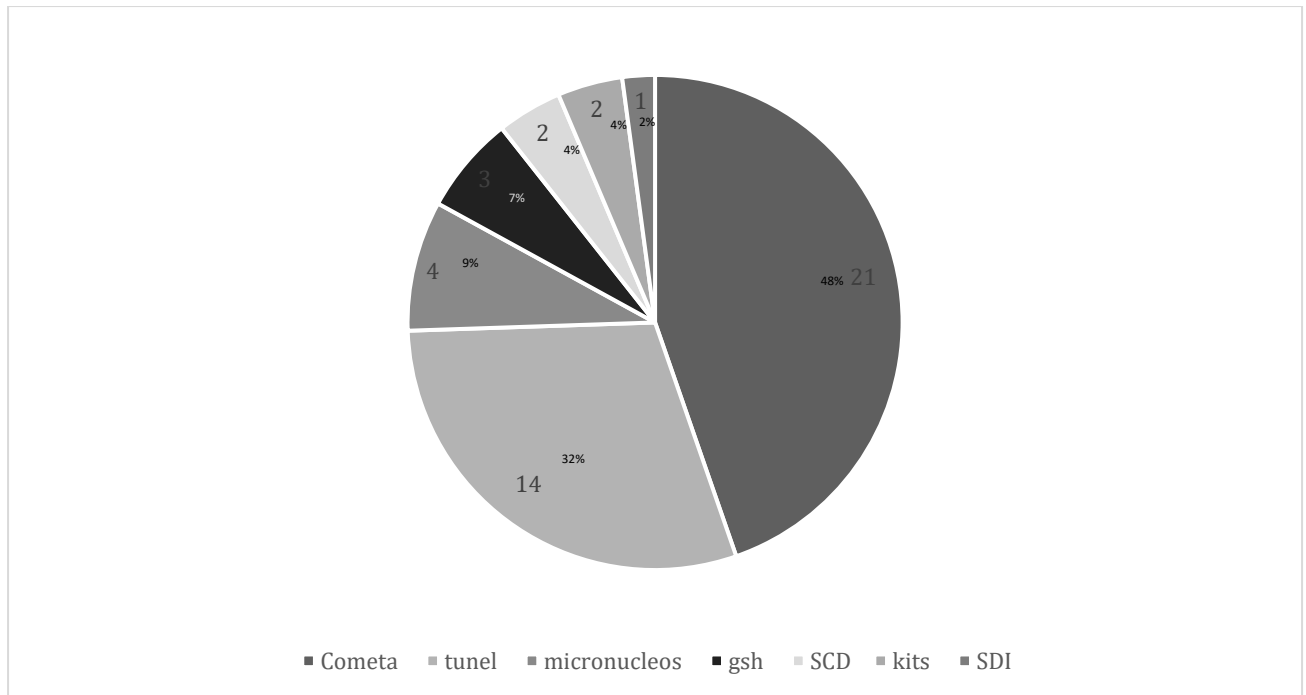


Figura 9. Número de metodologías que evalúan la fragmentación del ADN en las investigaciones consultadas.

VI. Discusión

De acuerdo con Nardelli y Túnez (2017) todos los seres vivos modifican su entorno durante su ciclo de vida, y realizan los intercambios de materia y energía para mantener sus funciones vitales, sin embargo, algunas de las actividades antrópicas generan residuos tóxicos y los organismos son afectados en la fragmentación del ADN, como respuesta a la exposición de los genotóxicos.

En cuanto a los organismos procariontes, la primera área de impacto fue en respuesta al uso de los antibióticos, con mayor interés en la medicina humana, bacterias patógenas, las cuales a lo largo de la historia han producido enfermedades infecciosas siendo causantes de muerte (Hoyo- Santisteban, 2017). Desde el siglo pasado los científicos las han combatido mediante el uso de antibióticos, sin embargo, el exceso y el uso inadecuado que han generado resistencia bacteriana. Según la OMS (2021) hoy día, es una de las 10 principales amenazas de salud pública a nivel mundial e incrementa los costos de los tratamientos de enfermedades y repercuten en la economía y muerte.

Asociado a esto, la evaluación de fragmentación de ADN también se ha reportado para la microbiota de los ecosistemas en respuesta a los efectos de toxicidad en su hábitat que ejercen los antibióticos que son desechados en suelos y cuerpos de agua principalmente (Ouyang, 2019). La microbiota ambiental también genera resistencia bacteriana, sin embargo, la presencia de antimicrobianos principalmente en el suelo, pueden afectar la microbiota y además ser absorbidos por las plantas, por lo tanto, genera una pérdida de la población, que en general, afecta la regulación propia de los ecosistemas (Correia y Marcano, 2015; Marathe *et al.*, 2018).

Con relación con estas implicaciones de ecotoxicidad, surge el interés de realizar las evaluaciones de la fragmentación del ADN de la microbiota presente en los ecosistemas, para evaluar la respuesta a contaminantes, algunos generados por actividades antrópicas: por ejemplo, la agricultura, la ganadería, aguas residuales, las plantas de tratamiento, las cuales repercuten en la estructura química del ADN y lo fragmentan (Di-Marzio *et al.*, 2020).

En consecuencia, los antibióticos para el uso médico, repercuten de manera abrupta para la salud humana, veterinaria, sin dejar de lado la microbiota de los organismos (Hoyo- Santisteban, 2017), y también interrumpen la estabilidad dinámica de las poblaciones bacterianas propias de los ecosistemas, llevándolas al declive, de tal manera que la implementación de nuevas técnicas de evaluación de fragmentación del ADN para los componentes mencionados será de utilidad a futuro.

Por ejemplo, una de las técnicas que se han reportado es la de GSH; Denzoin–Vulcano (2013) menciona que GSH es una molécula única, la cual participa en aspectos esenciales de la

homeostasis celular, teniendo un rol central en la defensa contra el daño oxidativo, por ende, implica en la sobrevivencia celular, modulación de la muerte celular, tanto en el proceso de necrosis, como en el de apoptosis. Por ello, autores como Ajiboye *et al.* (2017) aplican esta técnica para evaluar la fragmentación del ADN con sus modificaciones adecuadas en célula procarionte.

No obstante, los resultados indican que el Ensayo TUNEL es el segundo más utilizado en los últimos tiempos, con el 33% con respecto a los artículos analizados, principalmente lo implementan para evaluar la fragmentación del ADN espermático, aunque los autores como Majtnerová y Roušar (2018); Moore *et al.* (2021) aseguran que es una técnica con ventaja, porque está basado en los extremos del ADN en lugar de analizar los fragmentos, además es rápida, sencilla y fácilmente se ha adaptado a los diferentes tipos celulares; sin embargo, se considera que no es tan exacta para los organismos procariontes porque justo no evalúa células individuales, en cambio con la técnica de Ensayo Cometa se realiza célula a célula, como señala el estudio de estandarización general que realizó Zuñiga-Venegas (2009), la cual, representa el primer lugar de las investigaciones consultadas con el 49 %, principalmente ocupado en células eucariontes.

La necesidad de realizar la estandarización de protocolos de fragmentación de ADN y por ende, su evaluación con respecto a los desechos de los antibióticos, también se sugiere con respecto a que en la actualidad han surgido “farmacias verdes”; de acuerdo con Mackliff-Jaramillo *et al.* (2020) asegura que los productos naturales, favorecen al área de la medicina y ecosistémica, haciéndola una opción sustentable con el medio ambiente, debido a que reduce el empleo de sustancias tóxicas; sin embargo, esto no implica que sean totalmente inocuos, estos también tienen que ser evaluados y sometidos a regulación (Pérez-Vásquez *et al.*, 2019). Aunado a esto, se considera necesario implementar técnicas de evaluación de la fragmentación del ADN de la biota para ver su eficacia en la salud y erradicar la pérdida de la biodiversidad ecosistémica por la contaminación de sus hábitats.

En primera instancia, para las células eucariotas con respecto a enfermedades, se prioriza con el 100 % evaluaciones de fragmentación del ADN con beneficio en la salud humana, a pesar de que hay dos estudios en ratas, las evalúan con el fin médico humano; principalmente las realizan en células de sangre periférica, seguida por células epiteliales y posteriormente en células cancerígenas; el ser humano interactúa con la naturaleza, es decir, también interactúa con el medio biótico y depende del abiótico del lugar donde habita, por ello, no está exento de la exposición de los componentes contaminantes que son nocivos para la salud (Quiroga *et al.*, 2020).

De manera que se generan radicales libres y las especies reactivas al oxígeno, provocan estrés oxidativo, afectando a los lípidos, proteínas y al ADN, y en el último específicamente, provocan

senescencia celular, la aparición de enfermedades cardiovasculares, neurológicas y neoplásicas (León-Regal, 2018).

En consecuencia, el estrés oxidativo es la causa principal para realizar las evaluaciones de la fragmentación del ADN, principalmente se realizan en células sanguíneas periféricas, se atribuye por la facilidad de la extracción de las células, y en este sentido, es de suma importancia el análisis para el sistema inmunológico, de acuerdo con Londoño-Velasco *et al.* (2019) quienes utilizan células de sangre periférica de pintores expuestos a solventes orgánicos, los cuales, pueden llegar a desarrollar enfermedades entre ellas cáncer que se asocian con la inestabilidad genética.

Algo semejante ocurre con lo reportado por Almeida-Sierra (2018) en leucocitos humanos, pero en respuesta al herbicida glifosato en su formulación comercial (Roundup), además menciona que hay reportes en tejidos, y orina, no obstante, considera que el herbicida, también tiene efectos secundarios en plantas y animales, y pone su salud en deterioro. Finalmente, Amésquita *et al.* (2018) asegura que los linfocitos humanos más maduros, presentan mayor resistencia al daño de estrés oxidativo.

De la misma forma, en diferentes tipos celulares se evalúa la fragmentación del ADN con el interés de detectar alguna enfermedad, incluso usando organismos para realizar las pruebas con interés médico, como por ejemplo para proteger el hígado en pacientes con diabetes mellitus con dosificaciones de vitamina C, Mendoza *et al.* (2019), por ejemplo, utilizaron el riñón de ratas para evaluar dicha relación lo que les resulta beneficioso, debido que la vitamina C evita el daño en el ADN; otro ejemplo se presenta en células epiteliales, también en ratones de laboratorio, con el fin de evaluar el daño del ADN que ocasiona la radiación UVA, UVB y UVC en células de mamíferos y confirman que les genera daño en el ADN.

Finalmente, la fragmentación del ADN de diversas células, es uno de los principales factores para desencadenar células cancerígenas, y por ello, se ha tomado el interés médico el evaluar células cancerígenas, cabe recordar que es una de las consecuencias de la fragmentación del ADN, de acuerdo con Lizano-Guzmán (2021) considera que el cáncer se deriva de células apoptóticas, y opta por realizar estas evaluaciones con el fin de evitar la metástasis en diferentes órganos y/o tejidos, para todas las células eucariotas en mamíferos.

En este sentido, evaluar las células eucariotas de los mamíferos de vida silvestre, es de suma importancia para la salud médica y veterinaria, debido a que se encuentran amenazadas o sujetas a una fuerte presión por el incremento de las malas condiciones de sus hábitats, tendiendo a

enfermarse, con una fuerte carga parasitaria, y que en consecuencia, por ser parte de la cadena trófica, puede llegar a causar zoonosis (González-Salas *et al.*, 2020). Como se observa en los resultados, los diversos autores han priorizado la salud humana, no obstante, se considera que es recomendable para combatir enfermedades para los otros animales, también los resultados muestran que el Ensayo Cometa, es la técnica que se adapta a la evaluación de cualquier tejido y organismo para detectar el daño del ADN como: sangre, médula ósea, tejido cerebral, mucosa gastrointestinal, hígado, pulmón, riñón, mucosa nasal, piel, bazo, gónadas y gametos (Zúñiga-Venegas, 2009).

Uno de los componentes más relevantes para realizar las valoraciones de fragmentación de ADN son gametos, esencial para evaluar la reproducción en cuanto a la genética poblacional, debido a que la evolución por selección natural de los organismos se debe al cambio de frecuencia de alelos de una población determinada, debido al éxito reproductivo de los organismos que aportan alelos diferentes, entonces, se entiende que la eficacia biológica de un organismos se mide por su éxito reproductivo (Audesirk *et al.*, 2008).

Con relación a este tema, la población humana no es la excepción, el 71% de los resultados se enfocaron a evaluar la fragmentación en su ADN espermático, atribuyendo que la principal causa de análisis es la infertilidad masculina, Ramírez-Colunga (2021) la define como la incapacidad de concebir después de doce meses de relaciones sexuales sin protección, y considera que es un problema a nivel mundial porque el 12% de los hombres en edad reproductiva lo padecen y se debe a problemas en la expulsión del semen, ausencia o bajos niveles de espermatozoides, formas anormales y problemas en su movimiento.

Es posible que la principal causa de infertilidad, es el estrés oxidativo que presentan los gametos masculinos, de acuerdo con Saldarriaga-Monsalve y Cardona-Maya (2020) quien explica que el estrés oxidativo se debe a las influencias ambientales, fisiológicas y genéticas, dentro de ellas, la causa de una infección, quimioterapias, radioterapias, tabaquismo, consumo de drogas o edad avanzada, las cuales ocasionan la presencia de oxidantes y reductores que resultan nocivos para el espermatozoide, provocando así la fragmentación del ADN, definida como roturas de una sola hebra o dos, lo que se interpreta como barreras de la selección natural (Ribeiro, 2017; Kim, 2018).

Por otro lado, si el óvulo llega a ser fecundado, se relaciona con una fecundación deficiente, mala calidad y presenta anomalías en el cigoto y/o embrión lo que provoca aborto espontáneo, enfermedades de origen genético que imposibilitan al nuevo individuo a realizar una vida plena (Ribeiro, 2017).

De tal manera, que la técnica para su evaluación más utilizada, es la de TUNEL con el 64% para el área de reproducción, sin embargo, el interés ha llevado a los investigadores a tener protocolos específicos del espermatozoide como la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) y el ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) como menciona (Portella-Ruíz y Gonzales, 2016). Asimismo, el 21.4 % de búsquedas bibliográficas, evalúan la implementación de la mejor técnica, como es el caso de Sugihara *et al.* (2020) quienes aseguran, que se necesitan más búsquedas al respecto para mejorar la toma de decisiones clínicas.

En cuanto a los óvulos, hay escasos análisis, probablemente por la complejidad que representa el estudiar al óvulo, sobre todo en mamíferos porque están en menor cantidad y son internos, en comparación con el espermatozoide; se reportó solo una evaluación en porcinos utilizado como modelo por el interés en la medicina humana (Santos *et al.* 2017).

Por otro lado, las evaluaciones en humanos, se hizo con la finalidad de evaluar procesos de reproducción *in vitro*, sin embargo, se ha demostrado que causan estrés oxidativo a la larga y el ADN del óvulo fragmentado, evitando una fecundación exitosa (Tiwari, 2017). Para concluir, es indispensable elegir al mejor óvulo para ser fecundado, en condiciones de reproducción asistida (Ruvolo *et al.*, 2019).

Por otra parte, en el resto de la biota, no se obtuvieron resultados con respecto a evaluaciones de la fragmentación del ADN, a excepción del análisis de ictiofauna por López-Hernández (2018) y la causa es la pérdida de la biodiversidad, debido, en este caso, a los índices de contaminación del cuerpo de agua, el desplazamiento de especies, la introducción de especies exóticas y el incremento demográfico que afectan a las especies nativas del ecosistema en cuestión, explica que hacer uso de metodologías, como el Ensayo Cometa, y contribuyen a la selección de aquellos reproductores que muestren ventajas genéticas, por ende, la evaluación de la calidad espermática. El autor propone incrementar los estudios en las comunidades ictiofaunísticas; sin embargo, el análisis plantea la necesidad de incrementar este tipo de estudios en organismos que presentan reproducción sexual, tanto en plantas como animales.

Por último, es conveniente acotar los resultados en el área de la ecotoxicidad, donde las evaluaciones reportadas, en su mayoría son en humanos y utilizan su sangre periférica; a pesar de que la intención fue buscar organismos bioindicadores de contaminación de su hábitat. Sin embargo, los resultados priorizan el interés en la medicina humana con relación a la ecotoxicidad, como reportan Quijano-Vargas (2017), Mendoza-Almeida (2017), Tames (2019) y Bianco-Sadil (2020),

entre otros, demostrando que en la relación sociedad-naturaleza, entre más deteriorados estén los ecosistemas, más afectada se ve la salud del hombre (Castillo-Sarmiento *et al.*, 2017).

La misma respuesta que genera el hombre ante su hábitat en contaminación, existe con el resto de la biota, y por ello, resulta indispensable realizar evaluaciones de la fragmentación del ADN en los organismos con interés biológico o como bioindicadores de contaminación ambiental, a pesar de que existen interés de los componentes abióticos, no es suficiente hoy en día, que de igual manera va incrementando la extinción de las especies e interrumpen la estabilidad dinámica de los ecosistemas, por ejemplo, la evaluación en el ADN de la población de *Lyomys irroratus* expuesto a materiales pesados hecha por de la Cruz-Guarneros (2018) quien considera que los mamíferos pequeños, se utilizan como especies para biomonitoreo y son los candidatos excepcionales, por el papel ecológico que representan.

Con relación a las evaluaciones del ADN en eucariontes vegetales los resultados fueron escasos, sin embargo, Gonzáles-Sánchez *et al.* (2018) recomiendan hacer estas evaluaciones con las plántulas de manglar, debido a que ellas inhiben su crecimiento por la presencia de hidrocarburos, aguas residuales, y la presencia de metales pesados, debido a que son contaminantes que en la mayoría de los manglares, que al estar expuestos se van deteriorando, razones por las que hay que cuidarlos ya que son los mayores captadores de oxígeno, así como provenientes de otros servicios ecosistémicos.

Rodríguez-Narváez (2020) determinó una evaluación en un organismo eucarionte vegetal, la cebolla (*Allium cepa*) y la ecotoxicidad de su hábitat proveniente de aguas residuales que afectan el crecimiento de las raíces, pero principalmente daños en la división celular, por no tener su ADN íntegro.

De manera general, el análisis de la información recopilada, determina que la evaluación de la fragmentación del ADN en organismos procariontes y eucariontes a futuro tendrá un impacto en el auxilio de los estudios enfocados en la conservación de la biodiversidad; ya que, en los últimos años, los organismos se van extinguiendo de manera abrupta, por la contaminación, en su mayoría provocados por las actividades antrópicas, donde también los humanos se ven afectados. El Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) (2021) señala que la biodiversidad es fundamental para la existencia del ser humano en la tierra y usada de un modo sostenible, es una fuente ilimitada de recursos y servicios muy variados, que a su vez, está estrechamente ligada a la salud y el bienestar de las personas beneficiando las bases del desarrollo social y económico, por ende, se sugiere conservarla, mantenerla, restaurarla en caso de ser

necesario y en conjunto, contribuyen contra el cambio climático, que hoy día, es uno de los principales retos ambientales que afronta la humanidad; integrar los análisis de fragmentación del ADN para aquellos organismos claves para el mantenimiento de los ecosistemas, se debe implementar.

En cuestión de las metodologías que evalúan la Fragmentación del ADN reportadas en la presente investigación, el Ensayo Cometa es la más utilizada, ya que es factible para todo tipo de célula eucariota en todos los niveles de organización, de acuerdo con (Ansoar-Rodríguez, 2015) la técnica ha logrado ubicarse en una posición privilegiada dentro de los ensayos utilizados para evaluar la respuesta de las células frente a agentes genotóxicos, estreses bióticos y abióticos que conducen a daño al ADN.

Diferentes versiones del Ensayo Cometa se han desarrollado con el fin de ampliar el espectro de las lesiones al ADN que pueden ser detectadas, sin embargo, también se sugiere estandarizar para los organismos procariontes, puesto que es fácil de adaptarse, además de ser una técnica que evalúa el daño del ADN célula a célula, es rápida, eficaz y económica que se puede implementar en cualquier laboratorio (Rodríguez-Rey *et al.*, 2016).

A diferencia de la técnica de TUNEL, la cual resultó más utilizada para la evaluación del ADN espermático, es más larga, tardada y costosa, aunque los autores como Moore *et al.* (2021) aseguran su eficacia; los autores encontrados no realizaron evaluaciones con la técnica de DBS-FISH, a pesar de que es sencilla y cotizada en la genética clínica, la neurociencia, la medicina reproductiva, la toxicología, la ecología microbiana, biología evolutiva, la genómica comparativa, la genómica celular y biología del cromosoma (Martínez, 2017).

Mientras que el Ensayo de Micronúcleos se considera una evaluación, cuando ya hubo presencia de fragmentación del ADN, más no evalúa el daño, y por ende, ya no se debe implementar para la prevención, sino ya es el resultado, por tanto, la técnica no es la óptima, debido a que Carranza-López (2011) explica que los micronúcleos son resultado de errores, ocasionados por alteraciones durante la replicación, en el material genético durante la división celular; al ocurrir esto, origina un núcleo de menor tamaño, denominado micronúcleo.

VII. Conclusiones

- En células procariontes, la principal causa de la fragmentación del ADN es el uso inadecuado de los antibióticos dado las malas prácticas antropogénicas del uso de fármacos.
- La biota está expuesta a diferentes factores ambientales que provocan contaminación, la cual va aumentando, por ejemplo, desechos humanos tóxicos y sin control como los de los fármacos, los productos agroquímicos, aguas residuales, que, por ende, provocan estrés oxidativo, que fragmentan el ADN, pudiendo causar apoptosis celular.
- En células eucariotas las evaluaciones de fragmentación del ADN se han realizado en los animales más evolucionados. Para las áreas de estudio analizadas se detectaron investigaciones en torno a la salud humana y veterinaria; para la reproducción; para la evaluación de genotóxicos, que en consecuencia, contribuyen a la conservación de la biodiversidad.
- Existe poco interés en evaluar la fragmentación de ADN en células eucariotas vegetales, no obstante, lo anterior, es de importancia y por ello, se sugiere la implementación de protocolos tanto para las especies de interés comercial, como para la conservación de la flora nativa de los ecosistemas.
- La técnica más utilizada en la determinación de la fragmentación del ADN es el Ensayo Cometa que se aplica tanto en células procariontes como eucariontes y evalúa la fragmentación del ADN célula a célula.

VIII. Bibliografía

- Ahamed, K. S., Pal, R., Chakraborty, J., Kanungo, A., Purnima, P. S., y Dutta, S. (2019). DNA Structural Alteration Leading to Antibacterial Properties of 6-Nitroquinoxaline Derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, 62(17), 7840-7856. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00599
- Ajiboye, T. O., Habibu, R. S., Saidu, K., Haliru, F. Z., Ajiboye, H. O., Aliyu, N. O., y Mohammed, A. O. (2017). Involvement of oxidative stress in protocatechuic acid-mediated bacterial lethality. *Microbiology Open*, 6(4), e00472. doi: 10.1002/mbo3.472
- Ajiboye, T. O., Skiebe, E., y Wilharm, G. (2018). Contributions of RecA and RecBCD DNA repair pathways to the oxidative stress response and sensitivity of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics. *International journal of antimicrobial agents*, 52(5), 629-636. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.07.022
- Almeida-Sierra, B. F. (2018). *Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato en formulación Roundup sobre linfocitos humanos*. (Tesis de Ingeniería). Universidad Nacional Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.
- Amésquita, L., Cruz-Briceño, M. N., y Prieto, Z. (2018). Daño en el ADN de linfocitos humanos por efecto de cloroquina. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35, 471-475. doi: 10.17843/rpmpesp.2018.353.3166
- Anifandis, G., Katsanaki, K., Lagodoti, G., Messini, C., Simopoulou, M., Dafopoulos, K., y Daponte, A. (2018). The effect of glyphosate on human sperm motility and sperm DNA fragmentation. *International journal of environmental research and public health*, 15(6), 1117. doi: 10.3390/ijerph15061117
- Ansoar-Rodríguez, Y., Fontanetti, C. S., Christofolletti, C. A., y del Carmen Díaz-Llera, S. (2015). Aplicaciones del ensayo cometa en genética ecotoxicológica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 51-62.
- Arnold, A. R., Grodick, M. A., y Barton, J. K. (2016). DNA charge transport: From chemical principles to the cell. *Cell Chemical Biology*, 23(1), 183-197.
- Barbosa, M. C., Aiassa, D., y Mañas, F. (2017). Evaluación de daño al ADN en leucocitos de sangre periférica humana expuestos al herbicida glifosato. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 403-410. doi:10.20937/rica.2017.33.03.04
- Bianco-Sadil, G. E., Julián, R. F., Rivera, M. C., Cazón, L. N., González-Poma, E. C., Borsetti, H. M., y de Luca, J. C. (2020). Prevalencia de micronúcleos de mucosa bucal en trabajadores agrícolas de fraile pintado, Jujuy, Argentina. *Revista Científica FCA*, 13(1), 13-21.
- Calderón-Rojas, G. y Aguilar-Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIII*, 73(621): 757 – 763.

- Cardona-Tafurt, Y., y Marin-Morales, M. A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Biosalud*, 13(2), 95-111.
- Carranza-López, L. P. (2011). *Cuantificación de micronúcleos en células de sangre periférica de mototaxistas que trabajan en la ciudad de Cartagena de Indias*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Castillo, E., Guevara Fujita, M. L., y Fujita, R. (2011). Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 261-263.
- Corrales, L. C., Romero, D. M. A., Macías, J. A. B., y Vargas, A. M. C. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13(24), 55-82: doi: 10.22490/24629448.1717
- Correia, A., y Marcano, L. (2015). Presencia y eliminación de compuestos farmacéuticos en plantas de tratamientos de aguas residuales: Revisión a nivel mundial y perspectiva nacional. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 55(1), 1-18.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., Fernández, J. L., López-Fernández, C., Aragón-Tovar, A. R., Urbina-Bernal, L. C., y Gosálvez, J. (2016). DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele evaluated by sperm chromatin dispersion and DBD-FISH. *Archives of gynecology and obstetrics*, 293(1), 189-196. doi: 10.1007/s00404-015-3822-y
- Curtis, H., Barners, N.S., Schnek, A., Massarini, A. (2008). *Biología*. Madrid, España: Panamericana.
- de la Cruz-Guarneros (2018). *Efecto de la biacumulación de metales en la población de Liomys irroratus (gray 1868) que habita los jales de huautla, morelos: un enfoque multibiomarcadores*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Denzoin Vulcano, L. A., Soraci, A. L., y Tapia, M. O. (2013). Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(3), 530-539.
- Di-Marzio, W. D., Sáenz, M. E., y Alberdi, J. L. (2020). Evaluación de la ecotoxicidad de efluentes industriales y municipales, caso de estudio Río Luján-Región Ciudad de Pilar. *Ingeniería sanitaria y ambiental*, 100, 102-105.
- Fernández, J. L. y Gosálvez J. (2002). Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods in Molecular Biology*, 203 (2016) doi:10.1385/1-59259-179-5:203
- Franco, J. G. (2017). Sperm DNA fragmentation. *Translational andrology and urology*. 5. 935-50. doi: 10.21037/tau.2017.05.07
- Golan, D.E., Tashjian A.H., Armstrong E.J. y Armstrong A.W., (2012). *Principios de farmacología: Bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico*. Madrid, España. Lippincott Williams & Wilkins.

- Gómez-Álvarez, R. P., Martín de Serrano, M. N., Sesma-Egozcue, P. Álvarez-Uría, M., Fraile-Láiz, B., Anadón-Álvarez, R. y Sáez-Crespo, F. J. (2007). *Biología Celular*, Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana.
- González- Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E. y Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*. 47(6), 2050-2064.
- González-Salas R, Vidal del Río, M. M. y Pimienta-Concepción, I. (2020). Animales silvestres como fuente de transmisión del coronavirus COVID-19. *Dilemas contemporáneos: Educación, Política y Valores*. 1:61
- Gorczyca, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R. J., Gong, J. P. y Darzynkiewicz, Z. (1992). DNA strand breaks occurring during apoptosis-their early insitu detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *International journal of oncology*, 1(6), 639-648. doi: 10.3892/ijo.1.6.639
- Haddock, L., Gordon, S., Shenna-Lewis, E. M., Larsen, P., Shehata, A., y Shehata H. (2021). Sperm DNA fragmentation is a novel biomarker for early pregnancy los. *Reproductive BioMedicine Online*. 42(1):175-184. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.09.016
- Hamilton, T. R. D. S. y Ortiz-D' Ávila, M. E. (2020). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*. 28(1):1-8. doi: 10.1017/S0967199419000595.
- Ho, J. Y., Jong, M. C., Acharya, K., Liew, S. S. X., Smith, D. R., Noor, Z. Z., y Eswaran, J. (2021). Multidrug-resistant bacteria and microbial communities in a river estuary with fragmented suburban waste management. *Journal of hazardous materials*, 405, 124687. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124687
- Hoyo-Santisteban, V. (2017). *Resistencia a antibióticos*. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Cantabria. Cantabria, España.
- Karp, G. (2009). *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*. Ciudad de México, México: Mc Graw Hill.
- Kim, G. Y. (2018). What should be done for men with sperm DNA fragmentation?. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 45(3), 101-109. doi:10.5653/cerm.2018.45.3.101
- Kim, S., y Lee, D. G. (2019). PMAP-23 triggers cell death by nitric oxide-induced redox imbalance in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(7), 1187-1195. doi:10.1016/j.bbagen.2019.04.014
- Kim, Y. S., Lee, H. J., Han, M. H., Yoon, N. K., Kim, Y. C., y Ahn, J. (2021). Effective production of human growth factors in Escherichia coli by fusing with small protein 6HFh8. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-16.

- Laffon, B., Aldao, I., Pérez-Cadahía, B., Pásaro, E., y Méndez, J. (2006). Primer paso en la evaluación de los efectos del fuel del Prestige sobre el medio ambiente marino: Disponibilidad, bioacumulación y daño en el ADN. *Ciencias Marinas*, 32(2B), 389-399.
- León-Regal, M., Cedeño Morales, R., Rivero Morey, R., Rivero Morey, J., García Pérez, D., y Bordón González, L. (2018). La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. *Medisur*, 16(5), 699-710.
- Lewin, B. (2008). *Genes XI*. Ciudad de México, México: McGraw-Hill
- Lizano-Guzmán, C. P. (2021). *Efecto in vitro de Valeriana rígida y Valeriana Decussata en la apoptosis tardía en células cancerígenas*. (Título de ingeniería bioquímica). Universidad Técnica de Ambato. Tungurahua, Ecuador.
- Londoño-Velasco, E., Martínez-Perafán, F., Carvajal, S., García-Vallejo, F., y Hoyos-Giraldo, L. S. (2019). Evaluación del daño oxidativo y por metilación del ADN de pintores expuestos ocupacionalmente a solventes orgánicos y pintura. *Biomédica*, 39(3), 464-477. doi: 10.7705/biomedica.4289
- López-Hernández, J. C., Osorio-Pérez, A., Jiménez-Félix, S. A., Páramo-Delgadillo, S., Márquez-Couturier, G., Yasui, G. S., y Arias-Rodríguez, L. (2018). Artículo de Revisión: La calidad espermática en peces y los métodos de evaluación. *Journal of Marine and Coastal Sciences*, 10(1), 67-96.
- Luevano-Martínez, M. L. (2017). *Análisis del daño al DNA de monocitos humanos infectados con Mycobacterium tuberculosis mediante la Técnica de DBD-FISH*. (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.
- Lugioyo, G. M., Delgado, Y., Almeida, B. C., y Rivera, I. N. G. (2018). Distribución de bacterias heterótrofas aerobias viables, número total de microorganismos y de α -, β -, γ -y δ -proteobacterias en un sector costero al E de La Habana y en la aguas oceánicas al SW de Cuba. *Serie Oceanológica*, (14), 18-31.
- Mackliff-Jaramillo, C., Gutiérrez-Peralta, N., Espinoza-Correa, R., y Segura-Osorio, M. (2020). Farmacia verde: alternativa de vida con mirada al mundo de tecnologías limpias para nuestro ecosistema. *CIENCIA UNEMI*, 13(34), 72-83. doi: 10.29076/issn.2528-7737vol13iss34.2020pp72-83p
- Majtnerová, P. y Roušar T. (2018). An overview of apoptosis detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*. 45(5), 1469–1478. doi: 10.1007/s11033-018-4258-9
- Marathe, N. P., Janzon, A., Kotsakis, S. D., Flach, C. F., Razavi, M., Berglund, F., y Larsson, D. J. (2018). Functional metagenomics reveals a novel carbapenem-hydrolyzing mobile beta-lactamase from Indian river sediments contaminated with antibiotic production waste. *Environment international*, 112, 279-286. doi: 10.1016/j.envint.2017.12.036

- Marca-Yupanqui, P. (2018). *Evaluación preliminar de la genotoxicidad in vitro del extracto etanólico y zumo de Allium sativum L. "ajo" frente a ADN de Staphylococcus sp.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
- Mendoza, C., Flores, C., Melendez, C., Marquez, Y. C., y Matheus, N. (2019). Efecto protector de la vitamina C sobre el estrés oxidativo y daño al ADN en ratas con diabetes mellitus. *Revista Veterinaria*, 30(1), 12-16. doi: 10.30972/vet.3013891
- Mendoza-Almeida, T. (2017). *Evaluación de la Genotoxicidad in vitro del látex de variedades de Musa paradisiaca L. "plátano" frente a ADN humano y de Leishmania spp.* Ayacucho. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Huamanga, Perú.
- Ming-We, L., y Kent-Lloyd, K. (2020). DNA fragmentation index (DFI) as a measure of sperm quality and fertility in mice. *Scientific reports*, 10(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-020-60876-9
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO) (2021). *Conservación de la biodiversidad*. <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-la-biodiversidad/>
- Moore, C. L., Savenka, A. V. y Basnakian, A. G. (2021). TUNEL Assay: A powerful tool for kidney injury evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 412. doi: 10.3390/ijms22010412
- Mora-Gallardo, C., y Van-Wely, K. H. M. (2019). El ADN. CSIC. Madrid, España.
- Muñoz-Aristizábal, A.F. (2009). Evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores. *Revista Evista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*. 12 (1): 7–16.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256(1), 12-18. doi: 10.1006/excr.2000.4834
- Nardelli, M., y Túnez, J. I. (2017). Aportes de la genética de la conservación al estudio de los mamíferos neotropicales: revisión y análisis crítico. *Ecología austral*, 27(3), 421-436. doi: 10.25260/EA.17.27.3.0.539
- Neira, L. F., Mantilla, J. C., Stashenko, E., y Escobar, P. (2018). Toxicidad, genotoxicidad y actividad anti-Leishmania de aceites esenciales obtenidos de cuatro (4) quimiotipos del género Lippia. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. Blacpma*. 17(1), 68-83.
- Olarte-Saucedo, M., García-López, D. A., Ortiz-Letechipia, J., Palafox-Herrera, A., Reveles-Hernández, R. G., López-Luna, M. A., y Sánchez-Rodríguez, S. H. (2020). Fragmentación de ADN y cambios en la expresión de las proteínas Hsp70, Hsp90 y P53 en la piel de ratones BALB/c expuestos a luz ultravioleta UV (UVA, UVB, UVC). *Dermatología Revista Mexicana*, 64(3), 255-269.
- Oloyede, H. O. B., Ajiboye, H. O., Salawu, M. O., y Ajiboye, T. O. (2017). Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microbial pathogenesis*, 111, 338-344. doi: 10.1016/j.micpath.2017.08.012

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). La resistencia ante los microbianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Ouyang, W. Y., Su, J. Q., Richnow, H. H., y Adrian, L. (2019). Identification of dominant sulfamethoxazole-degraders in pig farm-impacted soil by DNA and protein stable isotope probing. *Environment international*, 126, 118-126. doi: 10.1016/j.envint.2019.02.001
- Perdomo-Hernández, A. (2014). *Estudio de uso de antibióticos en medicina interna del Hospital General de Chimalhuacán, Estado de México*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Zaragoza, Ciudad de México.
- Pérez-Vásquez A., Castillejos-Ramírez E. V. y Pérez-Herrera J. G. (2019). Control de calidad de plantas medicinales y su legislación sanitaria en México. *Tequio*, 2(6), 5-16. doi:
- Platter, H. y Hentschel, J. (2001). *Manual de biología celular*. Barcelona, España: Omega.
- Portella-Ruiz, J. R., y Gonzales, G. F. (2016). Fragmentación del ADN espermático: origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Revista Ginecología y Obstetricia de México*, 84(7), 455-61.
- Prados-Carvajal M. R. (2009). *Crosstalk between DNA end resection and RNA metabolism*. (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla. Barcelona, España.
- Pupo-Balboa, J. B., Robaina-Castellanos, M. S., Gutiérrez-Gutiérrez, R., Pandolfi-Blanco, A., y Fariñas-Rodríguez, L. (2021). DNA damage as a potential marker in the clinical follow-up of female patients with treated cancer. *Revista Colombiana de Cancerología*. 25(1), 25-42. doi: 10.35509/01239015.122
- Quijano-Vargas, M. J., Quijano-Parra, A., y Melendez-Gelvez, I. (2017). Evaluación genotóxica del aire de Pamplona-Colombia por el ensayo cometa. *Revista Colombiana de Tecnologías de Avanzada*. 2(30) 1692-7257.
- Quiroga, A. M., Leonarduzzi, E., Lunguni, I., Sigrist, M., Colussi, C., y Simoniello, M. F. (2020). Evaluación de poblaciones rurales expuestas a arsénico en el agua de consumo en la Provincia de Santa Fe, Argentina. Estrategias de comunicación y prevención de riesgos. *Revista de Salud Ambiental*, 20(2), 150-159.
- Ramírez-Colunga, C. A. (2021). *MiOXSYS y medición de capacidad antioxidante de los espermatozoides*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León México.
- Ribeiro, S., Sharma, R., Gupta, S., Cakar, Z., De Geyter, C., y Agarwal, A. (2017). Inter-and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. *Andrology*, 5(3), 477-485. doi:10.1111/andr.12334

- Rocha, M. y Gasca, J. (2007). Ecología molecular de la conservación. En Equiarte, L. E., Souza, V., y Aguirre, X. *Ecología Molecular*. Ciudad de México, México: Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).
- Rodríguez-Narváez, D. L. (2020). *Evaluación de la toxicidad residual en el tratamiento de contaminantes emergentes presentes en aguas residuales y su posible impacto en los ecosistemas* (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javierana, Bogotá, Colombia.
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García E. y Fundora M.A. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*. 35(2): 184 – 194.
- Ruvolo, G., Roccheri, M. C., Luparello, C., Matranga, D., Ferrigno, A., y Bosco, L. (2019). DNA fragmentation index, pAKT and pERK1/2 in cumulus cells are related to oocyte competence in patients undergoing in vitro fertilization programme. *Zygote* (Cambridge, England), 27(5), 350-354. doi: 10.1017/S0967199419000248
- Saldarriaga-Monsalve, L. J., y Cardona Maya, W. D. (2020). Efecto del zumo de sandía (*Citrullus lanatus*) en el estrés oxidativo en espermatozoides humanos. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 85(5), 423-432.
- Salomón, B.M., (2013). *Biología*. Ciudad de México, México: Cengage Learning
- Santos, E. C., Pradieé, J., Madeira, E. M., Pereira, M. M., Mion, B., Mondadori, R. G., y Lucia Jr, T. (2017). Selection of porcine oocytes *in vitro* through brilliant cresyl blue staining in distinct incubation media. *Zygote*, 25(1), 49. doi: 10.1017/S0967199416000319
- Schrödinger, E. (1944). *What Is Life?*. Barcelona, España. TusQuets.
- Sharma, R., Iovine, C., Agarwal, A., y Henkel, R. (2021). TUNEL assay—Standardized method for testing sperm DNA fragmentation. *Andrologia*, 53(2), doi: 10.1111/and.13738
- Simon L., Emery B., Carrell D. T. (2019). Sperm DNA Fragmentation: Consequences for Reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1166, 87-105. doi: 10.1007/978-3-030-21664-1_6.
- Sing, N. P., McCoy, M.T., Tice, R. R. y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in Individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Sugihara, A., Van Avermaete, F., Roelant, E., Punjabi, U., y De Neubourg, D. (2020). The role of sperm DNA fragmentation testing in predicting intra-uterine insemination outcome: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 244, 8-15. doi:10.1016/j.ejogrb
- Sybenga, J. (2020). Homologous chromosome pairing in meiosis of higher eukaryotes—still an enigma?. *Genome*, 63(10), 469-482. doi: 10.1139/gen-2019-0154

- Tames, M. F. (2019). *Evaluación de la contaminación del aire en ambientes internos de viviendas de zonas urbanas, periurbanas y rurales de la provincia de Córdoba*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional de Córdoba. Veracruz, México.
- Tello-Vallejo, Á. C. (2017). *Biomarcadores genotóxicos en tilapia nilótica Oreochromis niloticus como indicadores de contaminación de aguas por metales pesados*. (Tesis de Especialidad). Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá, Colombia.
- Tiwari, M., Tripathi, A., y Chaube, S. K. (2017). Presence of encircling granulosa cells protects against oxidative stress-induced apoptosis in rat eggs cultured in vitro. *Apoptosis*, 22(1), 98-107. Doi: 10.1007/s10495-016-1324-4
- Tonina, E., Garcete, T., Samaniego, M.J., Aveiro, R., Aranda, A., Ortiz, J., Benítez, C., Widjaja, P., Mag. Castiglioni, D., Lic. Segovia, J. y Franco de Diana, D. (2017). Test del cometa en sangre periférica de estudiantes fumadores de la facultad de ciencias de la salud, Universidad Católica Nuestra Señora de la Asunción. *Cimel*. 22(1), 26-31.
- Valencia-Quintana, R., Alarcón, J. S., Gómez-Arroyo, S., Eslava, J. C., Waliszewski, S. M., Fernández, S., y Villalobos-Pietrini, R. (2013). Genotoxicidad de plaguicidas en sistemas vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 133-157.
- Wiweko, B. y Utami, P. (2017). Predictive value of sperm deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation index in male infertility. *Basic and clinical andrology*, 27(1), 1. doi: 10.1186/s12610-016-0046-3
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., y Patiño, A. (2005). The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227-236.
- Zheng, K., Li, S., Jing, L., Chen, P. Y., y Xie, J. (2020). Synergistic Antimicrobial Titanium Carbide (MXene) Conjugated with Gold Nanoclusters. *Advanced Healthcare Materials*, 9(19), 2001007. doi: 10.1002/adhm.202001007
- Zúñiga-Venegas, L. A. (2009). *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización humana* (Tesis de doctorado) Universitat Autònoma. Barcelona, España.
- Zuriaga-Marco, E. (2018). *Evaluación ecotoxicológica y toxicológica de disolventes derivados de la biomasa*. (Tesis doctoral). Universidad San Jorge. Zaragoza, España.