

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

ESCUELA DE POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Determinación de la ausencia de daño en el ADN de linfocitos humanos
por el ensayo cometa del colágeno tipo I de “tilapia”**

**TESIS
PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
MENCION
BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL Y AMBIENTAL**

Autor: Br. Sánchez Tuesta Linda Cristina

Asesora: Dra. Prieto Lara Zulita Adriana

TRUJILLO – PERÚ

2021

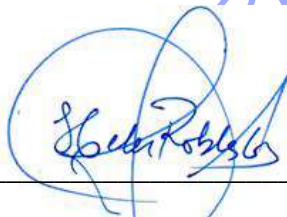
Nº DE REGISTRO _____

JURADO DICTAMINADOR



Dr. Mostacero León José

PRESIDENTE



Dr. Robles Catillo Heber Max

SECRETARIO



Dra. Prieto Lara Zulita Adriana

ASESORA

DEDICATORIA

*A **Dios**, porque todo lo bueno viene de él, por haber cuidado de mí e inundarme con sus bendiciones y su inmenso amor.*

*A mis amados **PADRES** Yoli y Antonio, quienes con su amor me han brindado lo mejor. Por su apoyo incondicional, su amistad y porque siempre están ahí para mí.*

*A mi **ESPOSO** Bayron, por ser mi compañero de vida, mi amor, mi fortaleza e inspirarme a ser mejor en todo ámbito de mi vida.*

*A mis **HERMANOS**, Angel, Antonio y Yoly, por su cariño y preocupación, porque son parte de mí.*

*A mi **MAESTRA**, Dra. Zulita Prieto, por sus enseñanzas, consejos, comprensión y constante apoyo.*

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

*A mis **AMIGOS**, Melissa, Monica, Nataly, Silvia y Carlos, por su sincera y desinteresada amistad.*

AGRADECIMIENTO

A mi asesora, Dra. Zulita Adriana Prieto Lara, por su mentoría y asesoramiento en la ejecución de la presente tesis, por sus consejos, comprensión y apoyo durante todo este tiempo, agradecerle también por darme la oportunidad de crecer profesionalmente.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas que de una u otra manera han contribuido a la presente investigación: Blga. Monica Arqueros Avalos, Dr. Carlos Quijano Jara, Blga. Nataly Reategui Pinedo, Blgo. David Salirrosas Fernández.

FINANCIACIÓN

La tesis fue financiada por FONDECYT del proyecto: “Extracción de colágeno tipo I del híbrido de tilapia, roja y gris, y sus aplicaciones en productos naturales”. N° de contrato: 123-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

INDICE

JURADO DICTAMINADOR	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	V
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XI
I. I.INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
2.1. OBJETO DE ESTUDIO.....	4
2.2. INSTRUMENTACIÓN.....	4
2.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS	4
2.3.1. <i>Obtención de los tratamientos:</i>	4
2.3.2. <i>Obtención de linfocitos de sangre periférica</i>	5
2.3.4. <i>Determinación de la viabilidad de los linfocitos humanos.</i>	6
2.3.5. <i>Ensayo cometa</i>	6
2.3.6. <i>Toma de datos:</i>	8
2.3.7. <i>Análisis Estadístico</i>	9
III. RESULTADOS	11
IV. DISCUSIÓN	14
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
_ANEXOS	25

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 TRATAMIENTOS UTILIZADOS	4
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE COMETAS POR REGISTRO VISUAL	9
TABLA 4. PORCENTAJE DE VIABILIDAD DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EXPUESTO A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.	11
TABLA 5. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DEL PORCENTAJE DE LA COLA Y MOMENTO DE LA COLA.	13
TABLA 6. TABLA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE LOS PROMEDIOS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA.	27
TABLA 7. TABLA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA.	27
TABLA 8. TABLA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE LOS PROMEDIOS DEL MOMENTO DE LA COLA.	27
TABLA 9. TABLA ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA.	27
TABLA 10. PRUEBA TUCKEY PARA LOS RESULTADOS DE LOS PROMEDIOS DEL % DE ADN EN LA COLA	28
TABLA 11. PRUEBA TUCKEY PARA LOS RESULTADOS DE LAS MEDIAS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA	28
TABLA 12. PRUEBA TUCKEY PARA LOS RESULTADOS DE LOS PROMEDIOS DEL MOMENTO DE LA COLA.	29
TABLA 13. PRUEBA TUCKEY PARA LOS RESULTADOS DE LAS MEDIAS DEL % DE ADN EN LA COLA.	29

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS POR GRADIENTE DE DENSIDAD.....	6
FIGURA 2. CLASIFICACIÓN VISUAL DE LOS COMETAS DE LINFOCITOS HUMANOS TEÑIDO CON SYBER GOLD REPRESENTANDO LOS CINCO NIVELES DE DAÑOS, UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS VISUAL (COLLINS ET AL., 2004)..	9
FIGURA 3. ESQUEMA BÁSICO DEL PROCEDIMIENTO ENSAYO COMETA PARA LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.....	10
FIGURA 4. COMETAS OBSERVADOS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS DE COLÁGENO DE TILAPIA, PBS 1X COMO CONTROL NEGATIVO Y H ₂ O ₂ COMO CONTROL POSITIVO A) GRADO 0 O CÉLULA SIN DAÑO, B) GRADO 1, C) GRADO 2 D) GRADO 3 E) GRADO 4.....	11
FIGURA 5. DAÑO EN EL ADN EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA EXPUESTOS A LOS TRATAMIENTOS DE COLÁGENO DE TILAPIA TIPO I (T1, T2 Y T3) Y A PBS 1X COMO CONTROL NEGATIVO Y H ₂ O ₂ COMO CONTROL POSITIVO A) PROMEDIOS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA DEL COMETA, B) MEDIAS DEL PORCENTAJE DE ADN EN LA COLA DEL COMETA.	12
FIGURA 6. DAÑO EN EL ADN EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA EXPUESTOS A LOS TRATAMIENTOS DE COLÁGENO DE TILAPIA TIPO I (T1, T2 Y T3) Y A PBS 1X COMO CONTROL NEGATIVO Y H ₂ O ₂ COMO CONTROL POSITIVO A) PROMEDIOS DEL MOMENTO DE LA COLA, B) MEDIAS DEL MOMENTO DE LA COLA.	12
FIGURA 7. LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA EXPUESTOS A LOS TRATAMIENTOS DE COLÁGENO DE TILAPIA TIPO I Y A PBS 1X COMO CONTROL NEGATIVO Y H ₂ O ₂ COMO CONTROL POSITIVO, COLOREADA CON	

DAPI Y EVALUADOS EN EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA OLYMPUS BX	
51.....	25
FIGURA 8. ESQUEMA DE LOS PRINCIPIOS GENERALES DE LA FORMACIÓN DEL COMETA.....	26
FIGURA 9. ESTRUCTURA DE UNA CÉLULA PROCESADA CON EL ENSAYO COMETA.	26
FIGURA 10. FOTOS DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO COMETA	30

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

RESUMEN

La seguridad de los insumos para suplementos alimenticios y cosmética deben ser evaluados a fin de evitar efectos colaterales, principalmente asociados a efectos clastogénicos, como es el caso de los compuestos químicos que se utiliza para la extracción de colágeno. Con la finalidad de demostrar la inocuidad del extracto de colágeno tipo I de piel de tilapia, se ha evaluado los efectos de 03 tratamientos de colágeno de tilapia tipo I liofilizado mediante el ensayo cometa en linfocitos humanos de sangre periférica, utilizando el peróxido de hidrogeno (200 μ M) como control positivo y buffer fosfato salino IX como control negativo. Se registró los promedios y medianas del porcentaje de la cola del cometa, momento de la cola.

Los resultados no mostraron diferencia significativa entre los tratamientos de colágeno de tilapia tipo I con el control negativo. Así que los resultados obtenidos nos sugieren la ausencia de actividad citotóxica y genotóxica en el extracto de colágeno tipo I obtenido de la piel de tilapia. Lo que significa que los lavados para eliminar los compuestos químicos utilizados en el pretratamiento fueron efectivos, así como la inexistencia de compuestos contaminantes en la piel de tilapia.

PALABRAS CLAVES:

Colágeno, *Oreochromis niloticus*, citotoxixidad, genotoxixidad, ensayo cometa

ABSTRACT

The safety of the inputs for nutritional supplements and cosmetics must be evaluated in order to avoid collateral effects, mainly associated with clastogenic effects, as is the case of the chemical compounds used for the extraction of collagen. In order to demonstrate the harmlessness of type I collagen extract from tilapia skin, the effects of 03 treatments of lyophilized type I tilapia collagen have been evaluated by the comet assay in human peripheral blood lymphocytes, using hydrogen peroxide (200 μ M) as a positive control and 1X phosphate buffered saline as a negative control. The averages and medians of the percentage of the comet's tail, tail moment, were recorded.

The results show no significant difference between the type I tilapia collagen treatments with the negative control. Thus, the results obtained suggested the absence of cytotoxic and genotoxic activity in the type I collagen extract obtained from tilapia skin. This means that the washes to remove the chemical compounds used in the pretreatment were effective, as well as the absence of contaminating compounds on the tilapia skin.

KEYWORDS:

Collagen, *Oreochromis niloticus*, cytotoxicity, genotoxicity, comet assay.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente se realizan distintas investigaciones en la obtención de colágeno en peces debido a sus excelentes propiedades, la cual es utilizada en suplementos alimenticios, en Cosmética y Farmacéutica. En los últimos años el colágeno proveniente de los sub productos de peces (escamas, espinas y piel) viene siendo consumido con mayor frecuencia ya que se considera que el colágeno de origen marino tiene mayor biodisponibilidad y grado de hidrólisis que el colágeno de origen porcino o bovino, además del creciente rechazo del colágeno bovino por el temor de la transmisión de enfermedades (Liu y Huand, 2016; Bhuiambar, 2019)

El colágeno se obtiene por distintos métodos de extracción donde se utiliza tratamientos con compuestos químicos como Butanol, ácido acético e hidróxido de sodio entre otros (Solari, 2015; Velarde, 2015; Quintero, 2016), por ello es importante realizar investigaciones que demuestren la inocuidad de estos productos, ya que, al no conocer la procedencia o el manejo en la crianza de los peces, el colágeno extraído podría contaminarse con distintos agentes tóxicos que causarían daños en el ADN.

En los últimos 30 años se han desarrollado con éxito técnicas capaces de evaluar el daño en el ADN, una de las técnicas que ejecuta esta premisa, es la electroforesis de una sola célula o también conocida como ensayo cometa, técnica que es muy sensible para detectar los daños en el ADN, Singh desarrollo en 1988 esta técnica en la versión alcalina, capaz de medir roturas simples en el ADN. (Guachalla, 2003). El ensayo cometa es utilizado en la evaluación de la genotoxicidad de distintos sustancias químicas, biológicas y agentes físicos, tales como rayos UV, rayos X, H₂O₂, acrilamida entre otros (Nadin et al., 2001; Urrego et al.; 2005; Cortés, 2007; Prieto, 2009), en probar la genotoxicidad de plantas medicinales

evidenciando la presencia de sustancias tóxicas en sus extractos acuosos como es el caso de *Chenopodium multifidum*, *Prosopis alba*, *Solanum sysimbriifolium*. Lentre (Carballo et al.; 2005; López et al., 2009) y utilizada también para monitorear el ambiente haciendo uso de células de peces, ratones y otros animales que fueron expuestos en su hábitat a la contaminación, así como a humanos con sospecha de haber estado expuestos a agentes o sustancias que dañan el ADN (Matsu Hasue et al., 2013; Rodríguez, 2016).

Los sistemas biológicos más usados para la evaluación del daño en el ADN *in vivo* son *Oreochromis niloticus*, *Mus domesticus*, *Drosophila melanogaster*, *DNA espermático* entre otros e *in vitro* se lleva a cabo en linfocitos humanos, los que son expuestos al principio activo directamente para evaluar el daño que pudiera ocasionar al ADN en un tiempo determinado y en menos tiempo que un sistema *in vivo* (Cortés et al., 2007; Prieto et al., 2008; López et al., 2009; Hernández et al., 2015).

La técnica se fundamenta en lisar las células que están adheridas al gel de agarosa sobre las láminas portaobjeto, sumergidas de un buffer que contiene detergentes y altas concentraciones de sal. (Mañas et al., 2006). Las células que presentan daño en el su ADN formarán fragmentos pequeños, los cuales, al someterse a una corriente eléctrica, penetrarán la agarosa migrando hacia el ánodo. Para realizar las lecturas, las láminas serán teñidas con un colorante con afinidad por el ADN. (Carballo et al., 2005; López et al., 2009; Zúñiga, 2009; Reynoso, 2011; Rodríguez, 2016).

El nivel de daño del linfocito se determina midiendo la migración de los fragmentos de ADN en la cola del cometa. El daño se evalúa con el número de células dañadas, midiendo la intensidad de la fluorescencia de los fragmentos de ADN (Tice et al., 2000; Mañas et al., 2006; Reynoso 2011).

No se han realizado investigaciones para evaluar el efecto de la genotoxicidad de los productos de tilapia, siendo un producto utilizado como alimento, debería considerarse de manera obligatoria las pruebas de daño genético, particularmente en especies, que no se conoce el manejo o de especies marinas que podrían tener altas concentraciones de metales pesados, ya que muchos de ellos son bioacumulativos y tóxicos para los organismos acuáticos.

Por tal motivo, la presente investigación permitirá estudiar *in vitro* si el colágeno tipo I de tilapia (*Oreochromis niloticus*) posee efecto genotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica.

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Objeto de estudio

El objeto de estudio es el colágeno tipo I de Tilapia, brindado por el Centro Experimental de Genética de La Universidad Nacional de Trujillo.

2.2. Instrumentación

Se emplearon los equipos básicos para ensayo cometa y para la toma de datos se utilizó formatos para registrar los resultados, así como el software de ensayo automático de cometas Comet Score^{PRO}.

2.3. Métodos y técnicas

2.3.1. Obtención de los tratamientos:

Se diluyó 1 g de colágeno tipo I de tilapia liofilizado en agua destilada y se procedió a liofilizar, una vez liofilizado se diluyo 0.01g en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS), el colágeno sobrante se volvía a diluir en agua destilada y se procedió a liofilizar por 2da vez. Una vez liofilizada por 2da vez, se pesó 0.01 g de colágeno en 1ml de PBS. Se utilizó PBS 1X como control negativo y H₂O₂ a 200 μ M.

Tabla 1 Tratamientos utilizados

Codificación	Tratamientos
T1	0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado
T2	0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado 2 veces
T3	0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado 3 veces
T4	PBS 1X
T5	H ₂ O ₂ 200 μ M

2.3.2. **Obtención de linfocitos de sangre periférica**

Se extrajo 10 ml de sangre periférica heparinizada por venopunción de tres personas sanas, con una edad promedio de 30 años con los siguientes criterios:

2.3.2.1. **Criterio de inclusión**

Sangre periférica de donadores mayores a 18 años sanos y menores de 33 años de condición saludable.

Sangre periférica de donadores que hayan dado su consentimiento informado por escrito.

2.3.2.2. **Los criterios de exclusión**

Sangre periférica de donadores expuestas recientemente a sustancias químicas, plaguicidas, tratamiento médico u hormonal, ser fumador o haber estado expuesto a rayos X. (Velazco, 1999).

2.3.3. **Aislamiento de linfocitos**

Se preparó 3ml Histopaque en tubo de centrifuga de 15 ml, se diluyó la sangre periférica en partes iguales con PBS 1X. Se agregó lentamente con una pipeta Pasteur una capa de la sangre diluida sobre el Histopaque, procurando no mezclar las capas luego se centrifugó a 1800 rpm por 25 minutos a temperatura de ambiente, en una centrifuga con rotor de ángulo oscilante. Con cuidado de no mezclar las capas, se aspiró el plasma con una pipeta, dejando el anillo blanquecino de células mononucleadas. Se recuperó con una pipeta Pasteur el anillo de la parte intermedia que contenía las células mononucleadas, colocándolas en un nuevo tubo de 15 ml. Posteriormente se lavó dos veces las células con PBS 1X y se centrifugó por 5

minutos a 2500 rpm luego se descartó el sobrenadante. Los linfocitos se suspendieron con PBS 1X y se procedió a exponer los linfocitos a los distintos tratamientos.

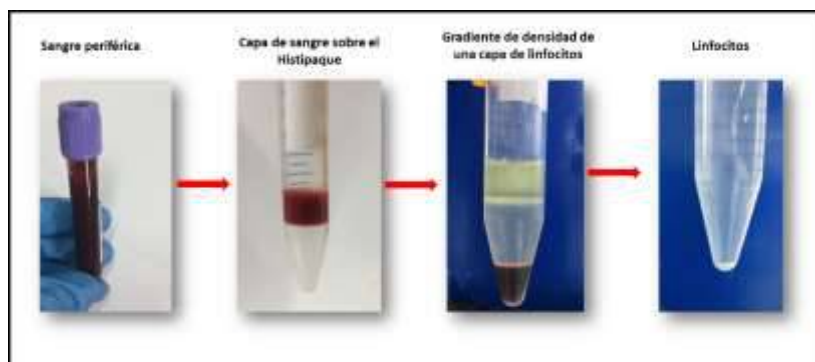


Figura 1. Aislamiento de linfocitos por gradiente de densidad.

2.3.4. **Determinación del porcentaje de viabilidad de los linfocitos humanos.**

La viabilidad celular se determinó utilizando 20 μ l de linfocitos expuestos a los diferentes tratamientos, se coloreó con 0,5 μ l yoduro de propidio a 1mM durante 10 minutos en oscuridad y se realizó las lecturas en un microscopio binocular con filtros para medir fluorescencia marca Olympus, modelo BX 51. Se realizó el conteo de linfocitos, los que presentaban coloración roja correspondían a linfocitos muertos y sin coloración, a linfocitos vivos. Se utilizó la siguiente formula, para determinar el porcentaje de viabilidad de linfocitos (Amésquita, 2018).

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{(\text{número de linfocitos muertos}) \times 100}{(\text{Total de linfocitos})}$$

2.3.5. **Ensayo cometa**

Los linfocitos aislados se diluyeron 1:1 en PBS 1X y se mezclaron con 200 μ l del tratamiento y se incubó a 37°C por 30 minutos.

Preparación de las láminas con microgeles de agarosa

Se preparó agarosa de punto de fusión normal al 1% en agua destilada (1g en 100 ml de dH₂O) en el microondas durante 1 minuto, una vez fundida la agarosa, se sumergió las láminas portaobjetos prelavados, se limpió un lado de la lámina y se dejó secar a 50 °C por 20 minutos en estufa (Olive, 2006; Lu, 2017).

Luego se agregó una segunda capa con agarosa de bajo punto de fusión al 0.5 % la cual se preparó agregando 100 mg en 20 ml de PBS. Se mezcló 75 µl de la agarosa con 25 µl de muestra, se dispensó 100 µl de la mezcla en una lámina portaobjeto, se colocó encima una laminilla cubreobjetos. Se incubó las láminas portaobjetos por 10 min a 4°C, una vez solidificada la agarosa se retiró la lámina cubreobjetos (Torres, 2013; Lu, 2017)

Lisis de las células

Para liberar el ADN se colocaron las láminas portaobjetos con la agarosa solidificada en frascos coplin y se agregó el buffer de lisis pH 10 (10 mM Tris, 100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, DMSO 10% y Triton 1%), hasta cubrir las láminas portaobjetos y se incubó por 1 hora a 4°C protegiéndolo de la luz (Zuñiga, 2005; Torres, 2013).

Desenrollamiento y Electroforesis

Se retiró las láminas portaobjetos de los frascos coplin y se colocaron en la cámara de electroforesis (cámara oscura), se fue agregando con cuidado el buffer para electroforesis (300mM de NaOH y 1mM Na₂-EDTA) hasta cubrir los portaobjetos hasta 0.3 cm, luego se incubó por 30 min a 4°C. La electroforesis se llevó acabo a 25 V, 300 mA por 30 min a 4°C (Zuñiga, 2005; Torres, 2013; Lu, 2017).

Neutralización, fijación y tinción

Una vez terminada la electroforesis se procedió a colocar los portaobjetos en buffer de neutralización (0,4 M Tris-HCl) hasta cubrir las láminas y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos (repetir cinco) para eliminar restos de los detergentes para evitar interferencia en el proceso de tinción.

Se eliminó el exceso de buffer de neutralización de los portaobjetos, se enjuagó cuidadosamente con agua destilada, se dejó secar a temperatura ambiente y sumergieron en etanol durante 5 min, esto permitió almacenar las láminas por más tiempo para su recuento. La tinción se realizó antes de la lectura en el microscopio, para lo cual se agregó a las láminas portaobjetos, 30 μ l de Syber Gold 1X cubriéndolo con una lámina cubre objeto de 24 x 60 dejando reposar por 10 minutos a temperatura de ambiente en la oscuridad (Zúñiga, 2005; Salas, 2014; Vergara, 2014; Lu, 2017).

2.3.6. Toma de datos:

Se observó las láminas en un microscopio binocular con filtros para medir fluorescencia marca Olympus, modelo BX 51 y empleando el objetivo 40X, las imágenes seleccionadas al azar se capturaron con el software de análisis de imágenes OLYMPUS Stream. Se contabilizó 100 células por muestra (50 por cada una de las dos láminas por tratamiento) evitando tomar en cuentas las células en los bordes de las láminas y verificando que las cabezas de los cometas empezaran en el lado izquierdo (Duez, 2003; Tice et al., 2000; Lu, 2017). También se realizó un registro visual de las células y se categorizó el grado de daño que sufrieron (Collins et al., 1995; Collins et al., 2004).

Tabla 2. Clasificación de cometas por registro visual

Clases	Nivel de daño
Grado 0	Células sin daño
Grado 1	Células nivel de daño bajo
Grado 2	Células nivel de daño medio
Grado 3	Células nivel de daño alto
Grado 4	Células con muy alto nivel de daño

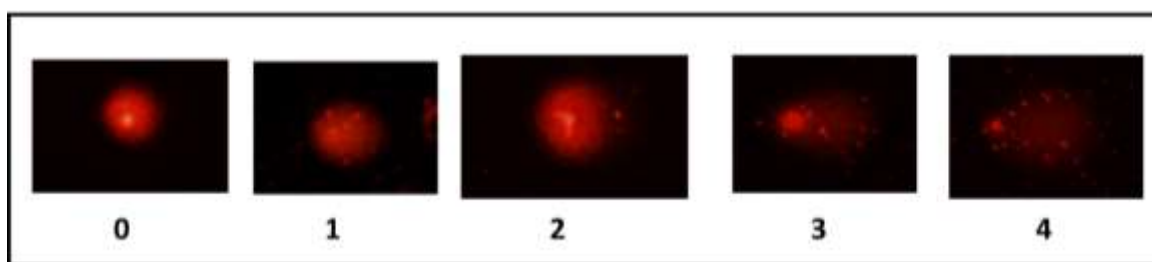


Figura 2. Clasificación visual de los cometas de linfocitos humanos teñido con Syber Gold representando los cinco niveles de daños, utilizadas para el análisis visual (Collins et al., 2004).

2.3.7. Análisis Estadístico

Se consideró el porcentaje de ADN de la cola del cometa (% TADN) y momento de la cola (TM) como parámetros de genotoxicidad utilizando el software de ensayo automático de cometas Comet Score^{PRO}, este programa capturó la imagen y mide la intensidad de la fluorescencia que corresponde a la cola y la compara con la intensidad total del cometa, de esa manera se obtiene el % TADN y el momento de la cola se calculó con la siguiente formulas (Amésquita et al., 2018):

$$\text{Momento de la cola (TM)} = \frac{(\text{longitud de la cola} \times \% \text{ TADN})}{(\% \text{ total de ADN})}$$

Se estimaron los promedios, medias y desviación estándar para los datos obtenidos para %TADN y TM. Las diferencias estadísticas se evaluaron con el análisis de varianza (ANOVA), además se utilizó la prueba de Tukey para la significancia estadística de $P < 0,05$ utilizando el programa Origin PRO-2020.

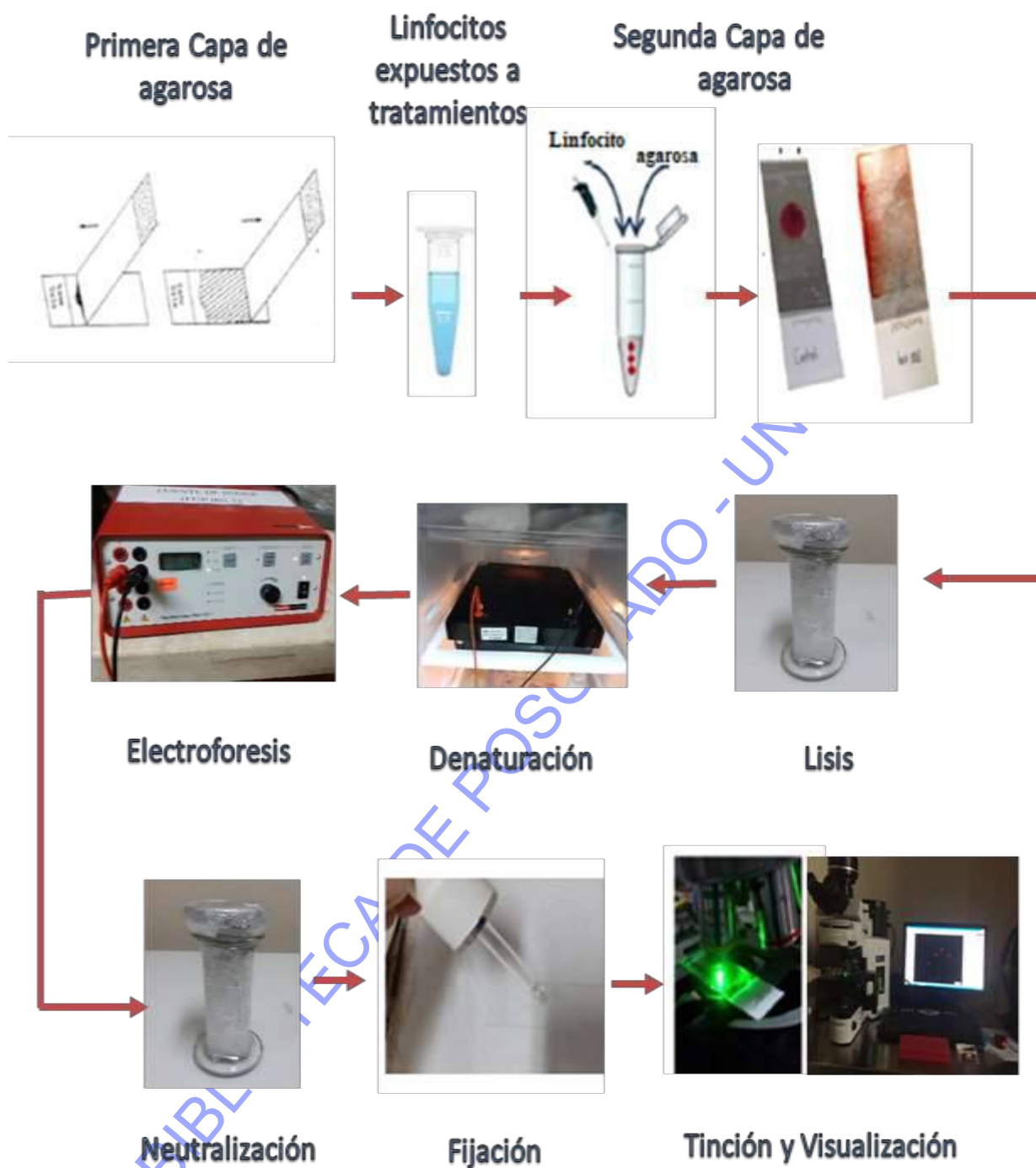


Figura 3. Esquema básico del procedimiento ensayo cometa para linfocitos de sangre periférica.

III. RESULTADOS

Los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos a los tratamientos de colágeno, PBS y H₂O₂ presentaron un porcentaje mayor del 95%.

Tabla 3. Porcentaje de viabilidad de linfocitos de sangre periférica expuesto a los diferentes tratamientos.

Tratamientos	Viabilidad (%)
T1: 0.01 µg/ml de colágeno liofilizado	95.66
T2: 0.01 µg/ml de colágeno liofilizado 2 veces	95.00
T3: 0.01 µg/ml de colágeno liofilizado 3 veces	95.27
T4: PBS 1X	98.06
T5: H ₂ O ₂ 200 µM	91.97

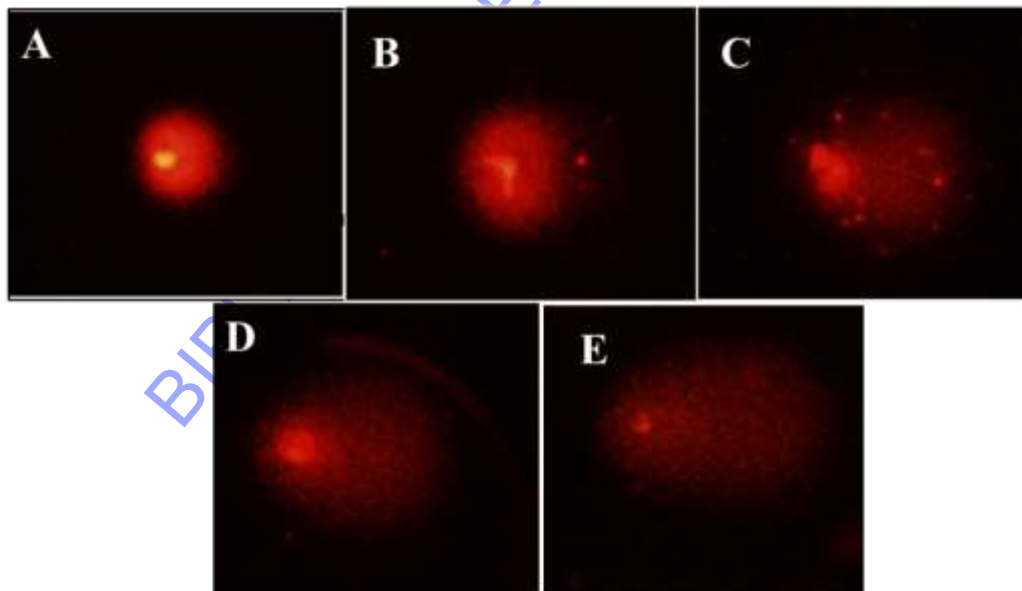
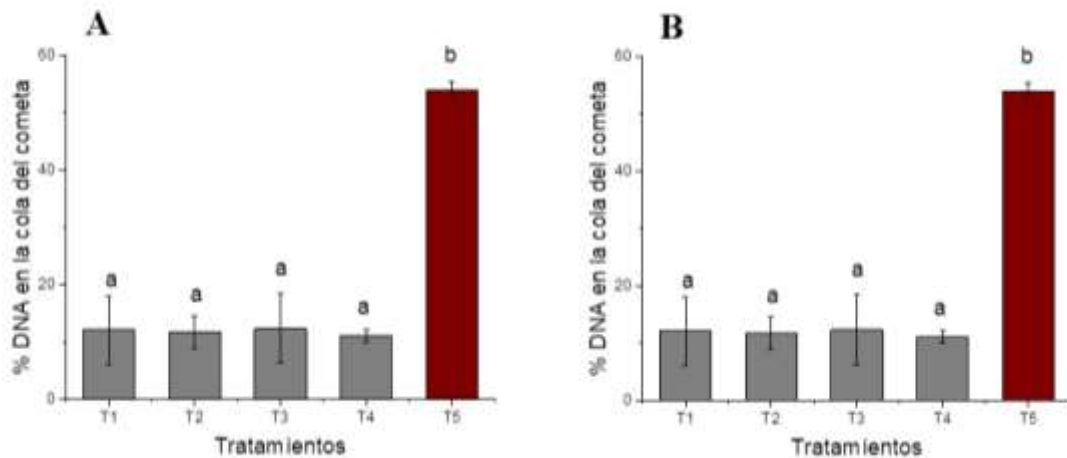
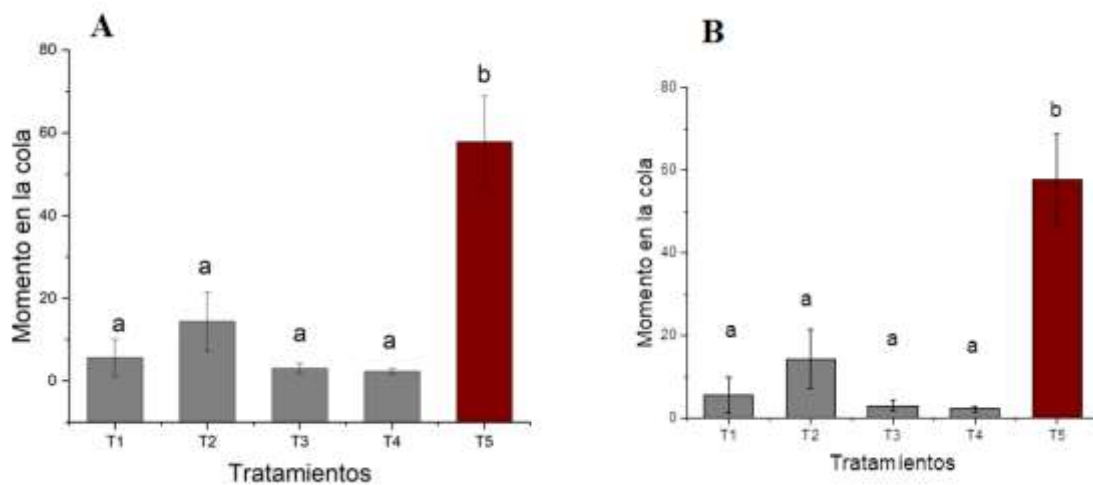


Figura 4. Cometas observados en los distintos tratamientos de colágeno de tilapia, PBS 1X como control negativo y H₂O₂ como control positivo A) Grado 0 o célula sin daño, B) Grado 1, C) Grado 2 D) Grado 3 E) Grado 4.



Las letras diferentes indican diferentes significativas <0,005

Figura 5. Daño en el ADN en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos a los tratamientos de colágeno de tilapia tipo I (T1, T2 y T3) y a PBS 1X como control negativo y H₂O₂ como control positivo A) Promedios del porcentaje de ADN en la cola del cometa, B) Mediana del porcentaje de ADN en la cola del cometa.



Las letras diferentes indican diferentes significativas <0,005

Figura 6. Daño en el ADN en linfocitos humanos de sangre periférica expuestos a los tratamientos de colágeno de tilapia tipo I (T1, T2 y T3) y a PBS 1X como control negativo y H₂O₂ como control positivo A) Promedios del Momento de la cola, B) Medias del Momento de la cola.

Tabla 4. Estadísticos descriptivos del porcentaje de ADN EN la cola y momento de la cola.

Tratamientos	% DNA en la cola del cometa		Momento de la cola	
	Promedio \pm SD	Mediana	Promedio \pm SD	Mediana
T1: 0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado	16.04 \pm 7.68 ^a	12.15 \pm 5.96 ^a	5.68 \pm 4.40 ^a	2.13 \pm 2.15 ^a
T2: 0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado 2 vez	20.32 \pm 3.80 ^a	11.80 \pm 2.74 ^a	14.40 \pm 7.10 ^a	1.66 \pm 0.70 ^a
T3: 0.01 μ g/ml de colágeno liofilizado 3 vez	15.28 \pm 3.31 ^a	12.45 \pm 6.08 ^a	3.03 \pm 1.24 ^a	1.69 \pm 1.56 ^a
T4: PBS 1X	13.49 \pm 2.16 ^a	11.14 \pm 0.99 ^a	2.32 \pm 0.66 ^a	1.11 \pm 0.34 ^a
T5: H2O2 200 μ M	51.46 \pm 5.23 ^b	54.00 \pm 1.59 ^b	57.85 \pm 11.02 ^b	59.34 \pm 5.17 ^b

Las letras diferentes indican diferencias significativas $< 0,005$

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNJ

IV. DISCUSIÓN

Los porcentajes de viabilidad de los linfocitos expuestos a los tratamientos de colágeno (T1, T2 y T3), PBS 1X y H₂O₂ μM, fueron mayor al 95% (Tabla 3) lo demuestra la validez del ensayo, ya que es necesario que la viabilidad sea mayor al 70 % para que el ensayo obtenga resultados óptimos, debido a que, si el porcentaje fuera menor y al presentarse un mayor número de células muertas, al realizar el ensayo cometa se mostraría un elevado número de cometas (Santa Cruz, 2019), es importante que los tratamientos se encuentren en concentraciones no citotóxicas para así poder evaluar si los tratamientos causan daños genotóxicos.

Los linfocitos de sangre periférica de humanos son las células más utilizadas como biomarcadores para estudios genotóxicos desde hace décadas, ya que presentan muchas ventajas como mayor sensibilidad, fácil obtención y multiplicarlos en cultivo, su ciclo celular es corto y bien establecido, su sensibilidad los hace ideales para usarlos en evaluaciones de distintas técnicas: SCGE, MN, AC, SCE, mutaciones génicas, etc. y existe numerosa información sobre de ellos (Zúñiga, 2009).

Se utilizó peróxido de hidrogeno (H₂O₂) a una concentración de 200 μM como control positivo, el H₂O₂ es comúnmente utilizado para producir daño en el ADN en estudios donde se mide la genotoxicidad, los tratamientos utilizados son comparados con H₂O₂ como un estándar, ya que tiene poder oxidante (Singh et al., 1988). La inestabilidad que causa el H₂O₂ la produce por la formación de radical OH, la cual contribuye a la oxigenación endógena a nivel celular y origina rupturas de cadenas sencillas y de cadena doble, sitios sensibles al álcali, que son los puntos de interés del ensayo cometa alcalino (Cossío et al., 2004; Sotil, 2007).

El ensayo cometa tiene la capacidad de demostrar si una sustancia química, biología o un agente físico a bajas dosis causa daños en el ADN, por ello se ha convertido en una prueba de utilidad para investigaciones genotóxicas y de monitoreo ambientales además de su manejo sencillo, bajo costos y reproducibilidad. El ensayo cometa en condiciones alcalinas favorece a que el material genético de las células se desenrolle, lo que facilita la detección de las roturas de cadenas sencillas del ADN. Las roturas de dos hebras ocurren con menos frecuencia que las roturas de una sola hebra, pero estas roturas son las precursoras esenciales de las aberraciones cromosómicas (Olive, 2006). Existen pasos que son esenciales en el ensayo cometa, como la preparación de la suspensión de las células viables, la preparación de reactivos, cada solución debe estar recién preparada, así como tener el pH adecuado para evitar daños o reparaciones endógenas de ADN (Lu, 2017). También se debe tenerse en cuenta que puede generarse lesiones de acuerdo con las variaciones del factor externo o estacional y condiciones fisiológicas del donador, como la edad, desbalances hormonales o exposición a agentes tóxicos (Dixon et al., 2002) por ello es importante tomar en cuenta los criterios de inclusión y exclusión para tener donadores óptimos para el ensayo.

La elección más adecuada de los parámetros de medición de los cometas sigue siendo tema de discusión y no se ha llegado aún a un consenso (Tice et al., 2000). En la presente investigación elegimos dos parámetros de uso frecuente el porcentaje de ADN en la cola y momento de la cola; El %TADN mide la cantidad de ADN fragmentado existente en la cola. Se ha considerado analizar 100 cometas de dos láminas de por muestra. Las células que sufren daño presentan una apariencia de cometa donde se visualiza una cabeza que contiene el núcleo y una cola con los fragmentos de ADN que han migrado hacia el ánodo, mientras que las células que no han sufrido daño presentan una forma esférica (Fig. 1; Fig. 8; Fig. 9).

La cantidad de roturas de ADN inducidas por los tratamientos de colágeno (T1, T2 y T3) no mostraron aumento significativo en el % de la cola del cometa, (Fig. 5 y Fig. 6) es decir fueron estadísticamente igual al control negativo. Lo que indica la ausencia de genotoxicidad en los tratamientos de colágeno tipo I, hubo un predominio de células no dañadas (grado 0). En la tabla 4 se muestran los promedios y las medias indicando que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, con la prueba de tukey, se comparó los tratamientos con el testigo negativo de PBS donde se demuestra que solo existe diferencia significativa comparando los tratamientos (T1, T2 y T3) con el control positivo. Esto nos demuestra que los tratamientos de colágeno de tilapia tipo I no presentan ningún tipo de agente toxico proveniente de su entorno o de algún químico implicado en el proceso extractivo de colágeno, en la etapa de pretratamiento como es el caso del ácido acético, 1-butanol, NaOH entre otros por lo tanto el colágeno tipo I de tilapia no posee efecto genotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica.

BIBLIOTECA DE POSGRADO UNIT

V. CONCLUSIONES

Después de haber realizado los análisis para la evaluación de datos se puede concluir lo siguiente:

- La viabilidad de los linfocitos humanos se mantuvo en un porcentaje mayor a 95% en los tratamientos de colágeno, así como en sus controles.
- El colágeno tipo I de tilapia (*Oreochromis niloticus*) no posee efecto genotóxico en linfocitos humanos de sangre periférica.
- El ensayo cometa es un método de detección del daño de ADN muy sensible y adecuado para este tipo de estudios

BIBLIOTECA DE POSGRADO UNITEC

VI. RECOMENDACIONES

- A pesar que el ensayo cometa es una técnica sensible en la detección de daños en el ADN y viene siendo utilizada en las ciencias biomédicas, no se está explotando como se debe sus propiedades, que el presente trabajo muestre una más de sus utilidades en las investigaciones de este tipo ya que el ensayo cometa da respuesta cuando se trata de detectar daños en el ADN de distintas células.
- Se debe usar linfocitos aislados por gradiente de densidad antes de sangre entera para evitar interferencias en las lecturas de las láminas.
- Emplear técnicas complementarias para evidenciar los daños que pudieran causar los tratamientos, tales como ensayo de micronúcleos entre otros.

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNIT

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amésquita, L. y Cruz, M., Prieto, Z. (2018). *Daño en el ADN en linfocitos Humanos por efecto de Cloroquina*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 35(3), 471-5. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3166>
- Bhumbar, M., Bhagwat, P. y Dandge P. (2019). *Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 7(2), 102983. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>
- Carballo, M., Cortada, C. y Gadano, A. (2005). *Riesgos en los consumos de plantas medicinales*. Theoria, 14(2), 95-108.
- Cortés, G., Dávila, R., López F., Fernández, J. y Gosálvez, J. (2007). *Evaluación del daño en el DNA espermático*. Actas Urológicas Españolas, 31(2), 120-131.
- Collins, A. R., Ma, A. G y Dunthie, S. J. (1995). *The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells*. Mutation Research, 336(1) 69–77. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(94\)00043-6](https://doi.org/10.1016/0921-8777(94)00043-6)
- Collins, A. (2004). *The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations*. Molecular Biotechnology 26(3), 249-61. <https://doi.org/10.1385/mb:26:3:249>
- Cossio, M., Gonzalez, Y., García, J., Prieto, E. (2004). *Uso del Ensayo Cometa para Evaluar el Efecto de la Temperatura sobre la Reparación del Daño Genético inducido por Peróxido de Hidrógeno y la Radiación Ultravioleta A en Células Sanguíneas Humanas*. Acta Farmaceutica. Bonaerense 23(3), 277-84.

- Dixon, D., Pruski, A. Dixon, L. y Jha, A. (2002). *Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview*. *Mutagenesis*, 17(6), 495-507.
<https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.495>
- Guachalla, L. y Ascarrunz, M. (2003). *La Genética Toxicología: Una ciencia en constante desarrollo*. *Biofarbo* 11, 75-82.
- Hernández, G., Ruth, D., Moreno, E., Ruiz, F., Díaz, B. y Madrigal, B. (2015). *Electroforesis Unicelular (Ensayo Cometa) como bioindicador de antigenotoxicidad inducida por Amphipterygium adstringens*. 2° Congreso Nacional de Química Médica.
- Hernández, P. (2015). *Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de Physalis peruviana L.* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/4786>
- Liu, H. y Huand, K. (2016). Structural Characteristics of Extracted Collagen from Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Bone: Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution and Hydrochloric Acid Treatment. *International Journal of Food Properties*, 19(1), 63-75. <https://doi.org/10.1080/10942912.2014.951939>
- López, N., Portmann, G., Angeleri, G., Gurni, A. y Carballo, M. (2009). *Biomarcadores para evaluación de genotoxicidad potencial*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2), 154-159.
- Lu, Y., Liu Y. y Yang, C. (2017). *Evaluating In Vitro DNA using comet assay*. *Journal of visualized experiment* (128), 56450. <https://doi.org/10.3791/56450>

- Mañas, T., González, C., García, O., Weyers, A., Ugnia, V., Larripa, H. y Gorla, A. (2006). *La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados*. *Theoria*, 15 (2), 53-60.
- Matsu Hasue, Arruda, F., Da Cruz Alves, M., Da Silva, A., Patrício C., Priscila, Sartorio, V., Gomes, V. and Van Ngan, N. (2013). *Assessment of genotoxicity and depuration of anthracene in the juvenile coastal fish Trachinotus Carolinus using the comet assay*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(4):215-222.
- Nadin, S., Vargas, L., Ciocc, D. (2001). *A Silver Staining Method for Single-cell Gel Assay*. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 49(9), 1183 – 1186.
<https://doi.org/10.1177/002215540104900912>
- Olive, O. y Banáth, J. (2006). *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. *Nature protocols* 1(1), 23-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Ostling O. y Johanson, K. (1984). *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1), 291–298. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Prieto, G. (2009). *Biomarcadores de daño Genético. Una mirada Práctica*. Conferencia paper: Foro de Contaminación Ambiental y Salud urbana. Centro de estudio en Ciencias de la Salud, CAECIS.
- Prieto, Z., León, J., Quijano, C., Fernández, R., Polo, E., Vallejo, R. y Villegas, L. (2008). *Efecto genotóxico del Dicromato de Potasio en Eritrocitos de sangre periférica de Oreochromis niloticus (Tilapia)*. *Revista Peruana de Medicina y Salud pública*, 25(1), 51-58.
<https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2008.251.1236>

- Quintero, J. y Zapata, J. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Información Tecnológica* 28(1), 109-120. Doi: 10.4067/S0718-07642017000100011
- Ramos, C. (2018). Obtención y caracterización de colágeno a partir de las escamas de pescados rojo y pardo. [Tesis de pre grado Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/17289/1/T-UCE-0017-IQU-025.pdf>.
- Reynoso, S. (2011). Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*. [Tesis de Maestría, Universidad de Guadalajara]. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4806/Reynoso_Silva_Monica.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rodríguez, R., Noris, G. y Fundora, T. (2016). *Principios y relevancia del ensayo cometa*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*, 35(2),184-194.
- Salas, S. (2014). *Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos a diferentes concentraciones de DimetilSulfoxido (DMSO)*. [Tesis de Pregrado, Universidad Ricardo Palma]. <http://repositorio.urp.edu.pe/handle/urp/917>
- Santa Cruz, C., (2019). *Efecto citotóxico y genotóxico del extracto acuoso de Physalis peruviana L. (aguaymanto) sobre células meristemáticas de Allium cepa (cebolla y linfocitos)*. [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/14342>
- Singh, 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(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

- Solari, A. y Córdova, J. (2015). Extracción de colágeno proveniente de residuos del procesamiento de *Engraulis ringens* “Anchoveta”. *Ciencias e Investigación* 18(2), 65-68.
- Sotil, G., Alvis, R., Francia, J. y Shiga, B., (2007). *Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos*. *Revista peruana de Biología* 13(3), 249 – 253. <https://doi.org/10.15381/rpb.v13i3.2350>
- Tice, R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. y Sasaki, Y. (2000). *Single cell gel/comet assay: guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206–221.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Torres, J., (2013). *Diferencias individuales a los efectos genotóxicos del Metronidazol*. [Tesis de Pregrado, Universidad Nacional autónoma de México].
https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/biologia/tesis/tesis_torres_parra.pdf
- Urrego, R., Pareja, A., Vásquez, N. y Márquez, M., (2005). *El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos*. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 18(3), 222-227.
- Velazco Campos, M. (1999). *Efecto genotóxico de la t-51 4 obtenida de Karwinskia humboldtiana sobre linfocitos humanos in vitro*. [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León de México].
<http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080084926/1080084926.html>
- Vergara, G. (2014). *Evaluación del efecto genotóxico y la susceptibilidad individual por exposición a plomo ambiental en la vereda la bonga, atlántico, Colombia*.

[Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia].

<http://bdigital.unal.edu.co/43652/1/1018419536.2014.pdf>.

Zúñiga, L. (2005) *Optimizaciones metodológicas del ensayo del cometa y su aplicación en biomonitorización Humana* [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona].

<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3930/lazv1de1.pdf?sequence=1>.

BIBLIOTECA DE POSGRADO - UNT

ANEXOS

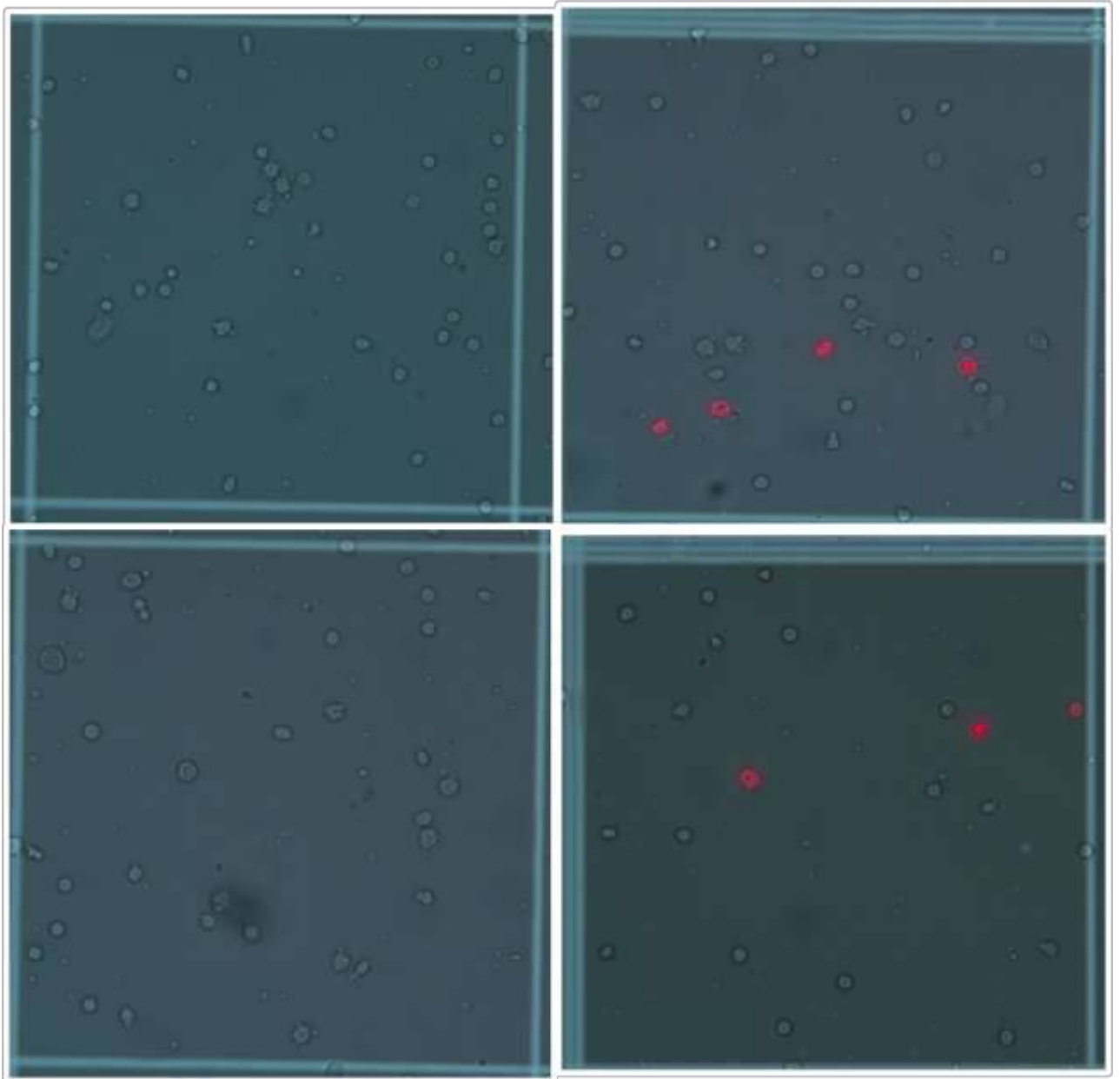


Figura 7. Linfocitos humanos de sangre periférica expuestos a los tratamientos de colágeno de tilapia tipo I y a PBS 1X como control negativo y H₂O₂ como control positivo, coloreada con DAPI y evaluados en el microscopio de fluorescencia Olympus BX 51.

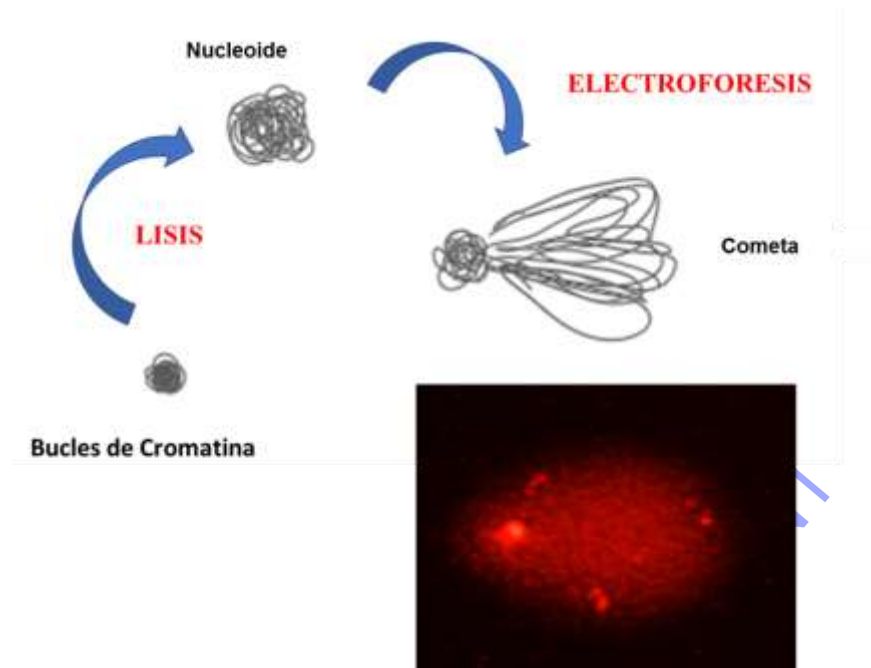


Figura 8. Esquema de los principios generales de la formación del cometa

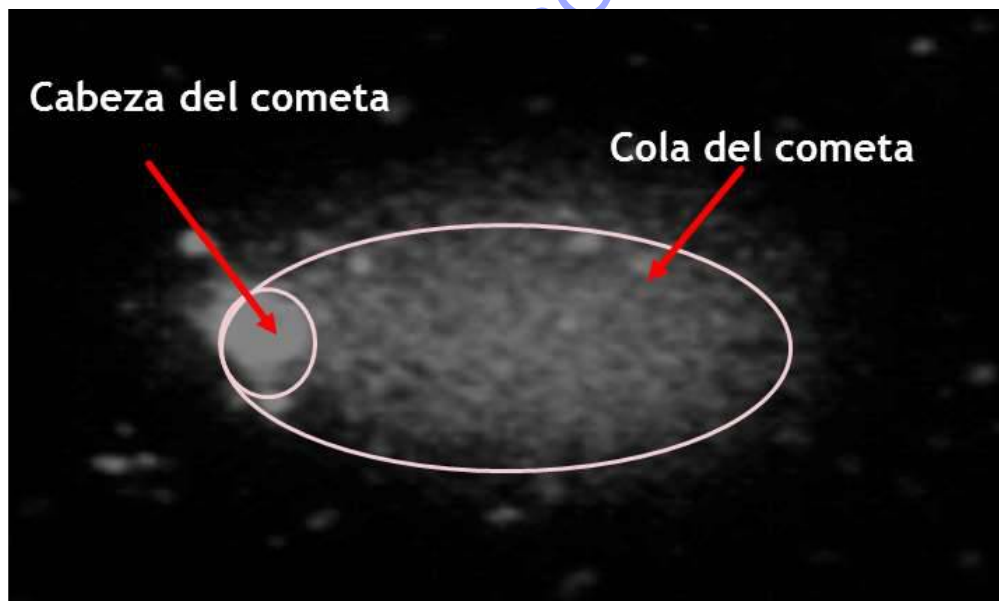


Figura 9. Estructura de una célula procesada con el ensayo cometa.

Tabla 5. Tabla ANOVA para los resultados de los promedios del Porcentaje de ADN en la cola.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	3044.69187	761.17297	32.70514	1.02E-05
Error	10	232.73802	23.2738		
Total	14	3277.4299			

Tabla 6. Tabla ANOVA para los resultados de las medias del Porcentaje de ADN en la cola.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	4259.26835	1064.81709	63.69337	4.47E-07
Error	10	167.17865	16.71786		
Total	14	4426.44699			

Tabla 7. Tabla ANOVA para los resultados de los promedios del momento de la cola.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	6640.62673	1660.15668	42.96123	2.88E-06
Error	10	386.43135	38.64313		
Total	14	7027.05808			

Tabla 8. Tabla ANOVA para los resultados de las medias del momento de la cola.

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4	7988.93567	1997.23392	290.34567	2.70E-10
Error	10	68.78814	6.87881		
Total	14	8057.72382			

Tabla 9. Prueba Tukey para los resultados de los promedios del Porcentaje de ADN en la cola

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
T2 T1	4.28093	3.93902	1.53697	0.80942	0.05	0	-8.6827	17.24456
T3 T1	-0.76228	3.93902	0.27368	0.99963	0.05	0	-13.72591	12.20135
T3 T2	-5.04321	3.93902	1.81065	0.70819	0.05	0	-18.00684	7.92042
T4 T1	-2.55203	3.93902	0.91625	0.96317	0.05	0	-15.51566	10.4116
T4 T2	-6.83296	3.93902	2.45322	0.45695	0.05	0	-19.79659	6.13067
T4 T3	-1.78975	3.93902	0.64257	0.98985	0.05	0	-14.75338	11.17388
T5 T1	35.41463	3.93902	12.7148	3.20E-05	0.05	1	22.451	48.37826
T5 T2	31.1337	3.93902	11.17784	9.92E-05	0.05	1	18.17007	44.09733
T5 T3	36.17691	3.93902	12.98848	2.64E-05	0.05	1	23.21328	49.14054
T5 T4	37.96666	3.93902	13.63105	1.71E-05	0.05	1	25.00303	50.93029

Tabla 10. Prueba Tukey para los resultados de las medias del Porcentaje de ADN en la cola

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
T2 T1	-0.34973	3.33845	0.14815	0.99997	0.05	0	-11.33684	10.63738
T3 T1	0.29153	3.33845	0.12349	0.99998	0.05	0	-10.69558	11.27863
T3 T2	0.64126	3.33845	0.27165	0.99964	0.05	0	-10.34585	11.62837
T4 T1	-1.0173	3.33845	0.43094	0.99779	0.05	0	-12.0044	9.96981
T4 T2	-0.66757	3.33845	0.28279	0.99958	0.05	0	-11.65467	10.31954
T4 T3	-1.30882	3.33845	0.55444	0.99418	0.05	0	-12.29593	9.67828
T5 T1	41.84411	3.33845	17.72575	1.97E-06	0.05	1	30.85701	52.83122
T5 T2	42.19385	3.33845	17.8739	1.86E-06	0.05	1	31.20674	53.18095
T5 T3	41.55259	3.33845	17.60225	2.07E-06	0.05	1	30.56548	52.5397
T5 T4	42.86141	3.33845	18.15669	1.68E-06	0.05	1	31.8743	53.84852

Tabla 11. Prueba Tukey para los resultados de los promedios del momento de la cola.

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
T2 T1	8.72464	5.07564	2.43093	0.46513	0.05	0	-7.9797	25.42897
T3 T1	-2.65089	5.07564	0.73861	0.98299	0.05	0	-19.35522	14.05345
T3 T2	-11.37553	5.07564	3.16954	0.24047	0.05	0	-28.07986	5.32881
T4 T1	-3.35516	5.07564	0.93484	0.96049	0.05	0	-20.05949	13.34918
T4 T2	-12.0798	5.07564	3.36577	0.1979	0.05	0	-28.78413	4.62454
T4 T3	-0.70427	5.07564	0.19623	0.9999	0.05	0	-17.4086	16.00006
T5 T1	52.16977	5.07564	14.53595	9.53E-06	0.05	1	35.46544	68.87411
T5 T2	43.44513	5.07564	12.10502	4.95E-05	0.05	1	26.7408	60.14947
T5 T3	54.82066	5.07564	15.27456	6.03E-06	0.05	1	38.11633	71.52499
T5 T4	55.52493	5.07564	15.47079	5.35E-06	0.05	1	38.8206	72.22926

Tabla 12. Prueba Tukey para los resultados de las medias del momento de la cola

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
T2 T1	-0.4638	2.14147	0.30629	0.99942	0.05	0	-7.51154	6.58393
T3 T1	-0.43827	2.14147	0.28943	0.99954	0.05	0	-7.48601	6.60946
T3 T2	0.02553	2.14147	0.01686	1	0.05	0	-7.02221	7.07327
T4 T1	-1.01748	2.14147	0.67194	0.988	0.05	0	-8.06522	6.03026
T4 T2	-0.55368	2.14147	0.36565	0.99884	0.05	0	-7.60142	6.49406
T4 T3	-0.57921	2.14147	0.38251	0.99861	0.05	0	-7.62695	6.46853
T5 T1	57.20955	2.14147	37.78091	0	0.05	1	50.16181	64.25729
T5 T2	57.67336	2.14147	38.0872	0	0.05	1	50.62562	64.72109
T5 T3	57.64783	2.14147	38.07034	0	0.05	1	50.60009	64.69556
T5 T4	58.22703	2.14147	38.45285	0	0.05	1	51.17929	65.27477



Pesado del colágeno



Dilución del colágeno



Liofilizado del colágeno



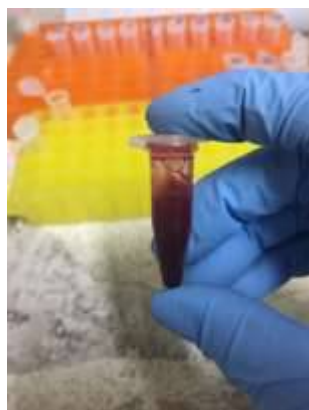
diálisis del colágeno



Extracción de Sangre entera



Obtención de linfocitos



Mezcla de un tratamiento con linfocitos



Linfocitos mezclados con agarosa



Cámara de electroforesis v fuente de poder

Figura 10. Fotos del procedimiento del ensayo cometa

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PARA DONAR SANGRE PERIFERICA**

Se le invita a participar en la investigación titulada:

Determinación de la ausencia de daño en el ADN de linfocitos humanos por el ensayo cometa del colágeno tipo I de tilapia

Yo.....identificado
con DNI..... y domiciliado
en.....Edad..... He sido invitado/a a participar en la
investigación: **Genotoxicidad del Omeprazol en linfocitos humanos Determinación de la
ausencia de daño en el ADN de linfocitos humanos por el ensayo cometa del colágeno tipo I de
tilapia.**

He sido informado de que la investigación no ocasionaría ningún riesgo a mi salud y/o beneficios que involucren mi participación. Afirmo que conozco el objetivo de la investigación y han sido aclaradas todas mis dudas y preguntas, por lo que doy mi consentimiento en participar en este estudio.

Fecha:

Firma del donador

Firma del tesista



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

DECLARACIÓN JURADA


Los autores suscritos en el presente documento DECLARAMOS BAJO JURAMENTO que somos los autores responsables legales de la calidad y originalidad del contenido del proyecto de investigación científica, así como, del informe de la investigación científica realizado.

TITULO: Determinación de la ausencia de daño en el ADN de linfocitos humanos por el ensayo cometa del colágeno tipo I de “tilapia”

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA INFORME DE INVESTIGACIÓN CIENTIFICA
 PROYECTO DE INVESTIGACIÓN () TRABAJO DE INVESTIGACIÓN (PREGRADO) ()
 PREGRADO
 PROYECTO DE TESIS PREGRADO () TESIS PREGRADO ()
 PROYECTO DE TESIS MAESTRIA () TESIS MAESTRÍA (X)
 PROYECTO DE TESIS DOCTORADO () TESIS DOCTORADO ()

El equipo investigador integrado por:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, MERITO, estudiante, OTROS)	CÓDIGO docente Número de matrícula del estudiante	Autor coautor asesor
1	Sánchez Tuesta Linda Cristina	Posgrado	Estudiante	801150118	Autora
2	Prieto Lara, Zulita Adriana	Posgrado	Nombrada	2332	Asesora



 FIRMA

43593685

DNI



 FIRMA

17898937

DNI

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9782-1782>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL RENATI – SUNEDU

Trujillo, 21 de mayo de 2021

Los autores suscritos del INFORME DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Titulado: **Determinación de la ausencia de daño en el ADN de linfocitos humanos por el ensayo cometa del colágeno tipo I de “tilapia”**

AUTORIZAMOS SU PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL, REPOSITORIO RENATI – SUNEDU, ALICIA-CONCYTEC, CON EL SIGUIENTE TIPO DE ACCESO:

- A. Acceso abierto:
- B. Acceso restringido (datos del autor y resumen del trabajo)
- C. No autorizo su publicación

Si eligió la opción restringido o No autoriza su publicación sírvase justificar

ESTUDIANTE DE PREGRADO: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TESIS

ESTUDIANTE DE POSGRADO: TESIS MAESTRIA TESIS DOCTORAL

DOCENTE: INFORME DE INVESTIGACIÓN OTROS

El equipo investigador integrado por:

Nº	APELLIDOS Y NOMBRES	FACULTAD	CONDICIÓN (NOMBRADO, CONTRATADO, MERITO, estudiante, OTROS)	CÓDIGO docente Número de matrícula del estudiante	Autor coautor asesor
1	Sánchez Tuesta Linda Cristina	Posgrado	Estudiante	801150118	Autora
2	Prieto Lara, Zulita Adriana	Posgrado	Nombrada	2332	Asesora

.....

FIRMA

43593685

DNI

.....

FIRMA

17898937

DNI

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9782-1782>