



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

BIOLOGIAKO GRADUA
GRADO EN BIOLOGIA
DEGREE IN BIOLOGY

GRADU AMAIERAKO LANA
TRABAJO DE FIN DE GRADO
BACHELOR'S THESIS

ANÁLISIS BIOQUÍMICO E HISTOQUÍMICO
DE LA VARIABILIDAD PRODUCIDA POR
CAMBIOS DE TEMPERATURA EN
MUESTRAS DEL BANCO DE
ESPECÍMENES

Edurne Fernández de Liger

Leioa, 2014ko uztaila/ Julio 2014/July 2014



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
- Diseño experimental.....	6
o Biomarcadores histoquímicos.....	6
▪ Test de la estabilidad de la membrana lisosómica (LMS).....	7
▪ Test de cambios estructurales de los lisosomas (LSC).....	8
▪ Contenido de lipofuscinas (LPF).....	9
▪ Acumulación de lípidos neutros.....	9
o Biomarcadores bioquímicos.....	10
▪ Determinación de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).....	10
4. RESULTADOS.....	10
- Estabilidad de la membrana lisosómica.....	11
- Cambios estructurales en los lisosomas.....	11
- Acumulación de lipofuscinas.....	12
- Acumulación de lípidos neutros.....	13
- Determinación de la actividad de la acetilcolinesterasa.....	14
5. DISCUSIÓN.....	14
6. BIBLIOGRAFÍA.....	16

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

RESUMEN

En las últimas décadas está proliferando la creación de nuevos Bancos de Especímenes Ambientales. Es fundamental en ellos disponer de métodos de congelación que garanticen la óptima conservación de las muestras, de forma que sean fiables los resultados obtenidos en las diversas investigaciones realizadas con ellas, para ser utilizadas por futuros investigadores. Este trabajo se ha realizado para conseguir dicho objetivo en relación a el BBEBB (Biscay Bay Environmental Biospecimen Bank) de la Estación Marina de Plentzia (PIE-UPV/EHU). Como muestra se han utilizado mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) y mediante análisis bioquímico e histoquímico se ha estudiado la variabilidad producida por diferentes métodos de congelación en una serie de biomarcadores previamente seleccionados. La conclusión ha sido que los biomarcadores varían dependiendo del método de congelación. Pero, en general, de forma poco significativa. Por lo tanto cualquiera de los procedimientos de congelación puede ser utilizado en los diferentes biobancos con garantías. No obstante y para una mayor fiabilidad es conveniente reincidir en este trabajo utilizando otras variables como animales de localidades y/o épocas diferentes.

In the last decades it is proliferating the creation of new Environmental Specimens Banks (ESB). It is essential to arrange freezing methods to ensure optimal preservation of the samples so that reliable results are obtained in different investigations carried out with them so they can be used by future researchers. This work was performed to achieve this objective in relation to the BBEBB (Biscay Bay Environmental Biospecimen Bank) of the Marine Station of Plentzia (PIE-UV/EHU). Mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were used as sample and the variability caused by different methods of freezing was studied by biochemical and histochemical analysis in a number of biomarkers previously selected. The conclusion was that biomarkers vary depending on the method of freezing. But, in general, not significantly. Therefore, any freezing procedures can be used in different ESBs with guarantees. However, and for a better reliability, it is convenient to persevere in this work using other factors such as different localities or seasons.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el crecimiento de la población, intensas actividades agrícolas, la industrialización y la urbanización han supuesto un aumento de contaminantes en el medio ambiente (Tanabe *et al.*, 2012). En relación con el ecosistema marino, siendo el destino final de muchos contaminantes, se están adoptando varias directivas medioambientales a nivel europeo. Concretamente, la Directiva Marco sobre la Estrategia Marina (MSFD; 2008/56/EC) establece

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

criterios y normas metodológicas encaminadas a garantizar una evaluación homogénea del estado de salud del medioambiente.

Por otra parte, los Mares Regionales Europeos son gestionados por Convenios Marinos. El Nordeste Atlántico, donde se encuentra el golfo de Bizkaia, es administrado por el Convenio OSPAR. El Programa de Vigilancia Ambiental Coordinado (CEMP) (OSPAR, 2008) incluye aspectos técnicos del muestreo, particularmente la selección de la muestra, la conservación y técnicas para análisis químicos. Estos aspectos técnicos están mucho menos desarrollados para la evaluación de los efectos biológicos de los contaminantes. Hasta hace poco, la mayoría de los estudios de monitoreo se centraban esencialmente en datos químicos mientras que los efectos biológicos a menudo se utilizaban sólo como un complemento. Sin embargo, durante los últimos años, ha habido una tendencia hacia el incremento de los análisis biológicos. Para ello, se han desarrollado metodologías que incluyen técnicas para la cuantificación de los efectos biológicos causados por contaminantes, como los biomarcadores. Estas aproximaciones biológicas se están aplicando a gran escala en los programas de vigilancia de la salud de los ecosistemas (Garmendia, 2008; ICES 2012). Hay métodos disponibles para detectar respuestas biológicas relacionadas con contaminantes en individuos (biomarcadores).

El avance en técnicas ecotoxicológicas basadas en biomarcadores, están estimulando su uso en los Bancos de Especímenes Ambientales. No obstante, al igual que en los Bancos Ambientales de muestras para análisis químicos, las muestras para la evaluación de los efectos biológicos también requieren una guía orientativa sobre sus prácticas, junto con las políticas para el avance correcto de los objetivos de investigación y gobernanza adecuada y eficaz del biobanco (Garmendia et al., 2014).

Los Bancos de Especímenes Ambientales (ESB) no son un fenómeno nuevo, pero en las últimas décadas, han aumentado en número y en actividad lo que permite nuevos enfoques de investigación para los científicos. De esta manera, los biobancos ambientales se están convirtiendo en un modo bien organizado y eficaz de recoger muestras de alta calidad para ponerlas a disposición de futuros investigadores (Garmendia et al., 2014).

El Banco de Bioespecímenes Ambiental del Golfo de Bizkaia (BBEBB) está localizado en el Centro de Investigación de Biología y Biotecnología Marinas Experimentales (Plentziako Itsas Estazioa, PiE) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU). Aunque algunas colecciones se iniciaron en la década de los 80, las actividades de recolección de muestras regulares empezaron en 2010. El BBEBB recoge y archiva muestras de diferentes especies tanto en seco como crioconservadas, para la realización entre otros, de estudios biométricos, estudios de

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

reproducción, toxicogenómica, proteómica bioquímica o histología que tengan como objetivo la evaluación de la salud de los ecosistemas marinos.

Una de las especies más utilizadas en la medición de contaminantes y sus efectos biológicos en el medio marino es el mejillón, porque están muy extendidos, son sésiles, filtradores y poseen la capacidad de acumular productos químicos. Además, sus respuestas biológicas a contaminantes están muy estudiadas (ICES 2012).

La coordinación en la investigación del medio ambiente es la mejor práctica para los ESB presentes y futuros. El Grupo Internacional de Bancos de Especímenes Ambientales (IESB) está promoviendo el desarrollo mundial de técnicas y estrategias para los ESB y su cooperación y colaboración internacional entre los ESB nacionales (Küster et al. 2014, Garmendia et al., 2014).

El objetivo de éste trabajo es contribuir a la mejora de las prácticas y estrategias para archivar muestras adecuadas y así poder medir el efecto biológico para evaluar el estado de salud del medio ambiente (Garmendia et al., 2014). Para ello se van a analizar los efectos de diferentes métodos de congelación en varios biomarcadores histoquímicos y bioquímicos (Tabla 1). Tras el análisis de los resultados y su discusión se comprobará si se cumple la hipótesis de que los biomarcadores estudiados varían dependiendo de los diferentes métodos de congelación.

Tabla 1. Biomarcadores en mejillón analizados en el estudio.

BIOMARCADOR	TÉCNICA	ÓRGANO
Estabilidad de la membrana lisosómica (LMS)	Histoquímica	Glándula digestiva
Cambios estructurales de la membrana lisosomal (LSC)	Histoquímica	Glándula digestiva
Acumulación de lipofuscinas	Histoquímica	Glándula digestiva
Acumulación de lípidos neutros	Histoquímica	Glándula digestiva
Actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE)	Bioquímica	Pie

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Los mejillones, *Mytilus galloprovincialis* (6-7 cm de longitud de concha) se recogieron en el puerto deportivo de Arriluze, Golfo de Vizcaya (43 ° 19'N, 3 ° 05'W), en octubre de 2013. Esta zona es considerada como punto de contaminación local crónica (Marigómez et al., 2013).

Se recogieron 50 mejillones en total: 5 para histoquímica, 40 para bioquímicas y 5 más para permitir análisis adicionales en caso necesario. Los 50 mejillones se diseccionaron en un periodo inferior a 1 hora con el fin de evitar cambios asociados con los procesos fisiológicos tales como la digestión (Izagirre, 2007), o la respiración anaerobia. .

Biomarcadores histoquímicos

Se diseccionaron las glándulas digestivas de 5 mejillones dividiendo cada una de ellas en 6 porciones y cada porción se pre procesó con un método de congelación diferente, evitando, en cierto modo, la variabilidad entre individuos. Los métodos de congelación utilizados son los siguientes: -60°C, -80°C, hexano pre enfriado con nitrógeno líquido (-196°C), muestras incluidas en gel crioprotector y congeladas en nitrógeno líquido, muestras envueltas en papel de aluminio y congeladas en nitrógeno líquido y muestras en crioviales y congeladas en nitrógeno líquido.

Las muestras congeladas a -60°C y -80°C, se introdujeron directamente en congeladores a esa temperatura, mientras que las muestras congeladas con el resto de métodos, una vez pre procesadas, se almacenaron en el congelador de -80 ° C hasta su posterior procesamiento siguiendo la metodología habitual de los muestreos de este tipo. Para el análisis de estas técnicas es necesario obtener cortes histológicos congelados para permitir las tinciones histoquímicas basadas en la demostración de la actividad enzimática. Los cortes de tejido (8-10 µm de grosor, dependiendo el método de tinción) se obtuvieron en un criostato Leica CM3000. Las secciones se almacenaron a -40°C hasta que se requirieron para su tinción sin que superen los dos días de almacenado para no variar la actividades enzimáticas (Garmendia 2008).

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Test de la Estabilidad de la membrana lisosómica (LMS)

El test de la estabilidad de la membrana lisosómica es recomendado por el Convenio OSPAR para controlar los efectos biológicos de los contaminantes (Garmendia, 2008), y por lo general se realiza de acuerdo con un protocolo estandarizado (UNEP/RAMOGGE, 1999).

Este test se basa en la demostración de la actividad de la hexosaminidasa en los lisosomas de células digestivas de mejillón. El tiempo necesario para aumentar la permeabilidad del sustrato en los lisosomas se considera el período de desestabilización (LP) UNEP/RAMOGGE (1999).

Las muestras se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C y luego durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la tinción. Se hicieron cortes del tejido en serie en el criostato (10 µm). Después los cortes fueron sometidos en intervalos de 0, 3, 5, 10, 15, 20, 30 y 40 minutos a 0,1 M de tampón sodio citrato (pH 4.5 con 2,25% de NaCl) en un baño (37°C) con agitación, con el fin de hallar el intervalo de tiempo necesario para la desestabilización completa de la membrana lisosómica.

Después, los portaobjetos se transfirieron al medio de incubación del sustrato para la demostración de la actividad de la hexosaminidasa. Este medio contiene 20 mg de naftol AS-BIN-acetil-β-D glucosaminida (Sigma, N4006) disueltos en 2,5 ml de 2-metoxietanol (Biociencia Merck) y 0,1 M de tampón citrato (pH 4.5 con 2.5 % de NaCl). Para llegar a 50 ml, se le añadieron 3,5 g de polipéptido de baja viscosidad (Sigma, P5115) como estabilizador coloidal. Las secciones se mantuvieron en este medio a 37°C durante 20 minutos, luego se aclararon en una solución salina (3.0 % NaCl) a 37°C durante 2 minutos y después se transfirieron a 0,1 M de tampón fosfato (pH=7,4) con 1 mg/ml de colorante de diazonio Sal Fast Violet B (Sigma, F1631) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los portas fueron luego aclarados rápidamente durante 5 minutos en agua corriente, fijados en Baker (2.5 % de NaCl) a 4°C durante 10 minutos y aclarados en agua destilada. Por último, los portas se montaron con gelatina glicerizada Kaiser (Biociencia Merck) y se sellaron con laca de uñas.

El periodo de desestabilización se analizó como la máxima acumulación de producto de reacción asociado a los lisosomas, mediante el microscopio fotónico (UNEP/RAMOGGE 1999). Se realizaron cuatro determinaciones aproximadamente iguales por glándula digestiva dividiendo cada sección en 4 segmentos y estableciendo el tiempo de desestabilización (LP) en cada uno de los segmentos correspondientes. Estas mediciones se realizaron mediante un microscopio óptico Leitz Laborlux S (Wetzlar) usando una lente de objetivo de magnificación (40X). A continuación se calculó el valor medio para cada sección correspondiente a cada glándula digestiva.

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Test de Cambios estructurales de los lisosomas (LSC)

Los cambios estructurales de los lisosomas se han determinado comúnmente después de la demostración histoquímica de la actividad β -glucuronidasa (Moore, 1976) con las modificaciones descritas por Cajaraville et al. (1989).

Las muestras se mantuvieron a 4°C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de la tinción. Los cortes (8 μ m) se incubaron en un medio con 28 mg de naftol AS-BI- β -glucurónido (Sigma, N1875) disueltos en 1,2 ml de sodio bicarbonato 50 mM (100 ml de NaCl 2,5%) con 0,1 M de tampón acetato (pH=4,5) y 15% de alcohol de polivinilo a 37°C durante 40 minutos en un baño de agua con agitación. Después de la incubación los portas se aclararon en una solución salina a 37°C durante 2 min en un baño de agua con agitación y luego se transfirieron a un medio *postcoupling* que contenía 0,1 g de Fast Garnet (GBC) (Sigma, F8716) disuelto en 100 ml de tampón fosfato a 0,1 M (pH 7,4 con NaCl 2,5%) durante 10 min en la oscuridad y a temperatura ambiente. Después, los portas se fijaron en Baker (NaCl 2,5%) a 4°C durante 10 minutos y se aclararon brevemente en agua destilada. Finalmente se realizó una tinción de contraste, incubando los portaobjetos durante 2 minutos en 0,1% de Fast Green FCF (Sigma, F7252) durante 2 minutos, se aclararon varias veces en agua destilada, se montaron con gelatina glicerizada Kaiser y se sellaron con laca de uñas.

Se aplicó un procedimiento estereológico con el fin de cuantificar la estructura de los lisosomas de células digestivas en mejillones con la ayuda de un sistema de análisis de imagen automatizado (BMS, Sevisan S.L.; Cajaraville et al., 1995). Los portas fueron observados mediante un microscopio óptico (LEICA Laborlux S) con un aumento de (100X) conectado a una cámara B&W. (SONY Video cámara CCD). Se realizaron cinco mediciones por sección en cada uno de los 5 individuos abarcando cada grupo experimental con el fin de calcular los siguientes parámetros estereológicos (Lowe et al. 1981): densidad volumétrica lisosomal ($Vv_L = V_L/V_C$), densidad superficial lisosomal ($Sv_L = S_L/V_C$), relación superficie volumen ($S/V_L = S_L/V_L$) y la densidad numérica ($Nv_L = N_L/V_C$), donde V es volumen, S superficie, N número, L lisosomas y C es citoplasma de la célula digestiva. Las fórmulas estereológicas incluyen un factor de corrección para las partículas con un diámetro medio más pequeño que el grosor de la sección (Lowe et al., 1981).

Contenido de lipofuscinas (LPF)

El LPF se evaluó después de la demostración histoquímica de lipofuscinas por el método de Schorml (Pearse 1985). Una vez que los cortes de criostato obtuvieron temperatura ambiente, se fijaron en Baker (NaCl 2,5%) a 4°C durante 15 minutos con 10 ml de formaldehído, 2 g de acetato de calcio y agua destilada hasta llegar a 100 ml. Los portas se lavaron dos veces en agua destilada y luego

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

se sumergieron en medio de reacción durante 5 minutos (1% de cloruro férrico y 1% ferricianuro de potasio). Los portas fueron luego aclarados con ácido acético (1%) durante 1 minuto y lavados en agua destilada un par de veces. Por último, se montaron con gelatina glicerinada Kaiser y se fijaron con laca de uñas

Acumulación de lípidos neutros

La cuantificación histoquímica de lípidos neutros se llevó a cabo mediante la tinción con Oil Red O (ORO) (Culling, 1974). Tras aclimatar los cortes del criostato (8 μ m) a 4°C se fijaron en solución Baker (2,5% de NaCl) durante 15 minutos. Tras ser fijados, los portas se lavaron en isopropanol (60%) y aclarados en la solución de tinción (ORO) durante 20 minutos. La solución de ORO es una solución saturada (0,3%) de ORO (BDH 34061) en isopropanol. Para ello se disolvieron 60 ml de solución en 40 ml de agua destilada y después de un intervalo de 10 minutos se filtraron, con el fin de estabilizar la solución. Esta solución de tinción sólo es estable durante 1-2 horas. Los portas teñidos fueron diferenciados en 60% de isopropanol, lavados en agua y finalmente se realizó una tinción de contraste con 1% de Fast Green FCF (Sigma, F7252) durante 20 minutos y montados en glicerina de Kaiser (Biociencia Merck) para después sellarse con esmalte de uñas.

La acumulación intracelular de lípidos neutros se midió por análisis de imagen en los túbulos digestivos de la glándula digestiva de mejillón, excluyendo otras estructuras como el estómago y los conductos. Las secciones fueron observadas mediante un microscopio óptico (LEICA Laborlux S), con un objetivo de (40X), realizándose 5 mediciones por cada sección con el fin de calcular la densidad volumétrica de lípidos neutros intracelulares ($V_{V_{NL}} = V_{NL}/V_C$), siendo NL lípidos neutros y el resto de símbolos como en LSC.

Biomarcadores bioquímicos

El análisis se llevó a cabo en 40 pies de mejillones. 10 de éstos pies se homogeneizaron al momento y después se repartió el homogeneizado en tres crioviales para ser preprocesados con diferentes temperaturas de congelación: -60°C, -80°C y nitrógeno líquido (-196°C). Las muestras congeladas a -60°C y a -80°C se almacenaron en congeladores de ésta temperatura y las de nitrógeno líquido junto a las de -80°C, siguiendo el procedimiento habitual. Los otros 30 pies restantes se preprocesaron con los mismos métodos de congelación y también se almacenaron de la misma forma pero en este caso se almacenó el pie entero y la homogeneización se realizó el momento antes de su procesamiento.

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Determinación de la actividad de AChE

La acetilcolinesterasa AChE es responsable de hidrolizar la acetilcolina en colina y ácido acético. Esta enzima se encuentra en los tejidos nerviosos, por este motivo se ha analizado en el pie del mejillón, ya que en la base de éste se encuentran los ganglios pediales.

La actividad de la acetilcolinesterasa se midió de acuerdo con el método de Ellman et al., 1961 y adaptado para microplacas por Guilhermino et al., 1996. Los pies se homogeneizaron a 4°C en una solución de 800 µl de tampón fosfato (pH 7,2) y se centrifugó a 6.000 rpm durante 3 minutos. Se tomaron 30 µl de muestra y se le añadieron 270 µl de tampón y 250 µl de solución de reacción (200 µl de solución acetilcolina, 1 ml DTNB y 30 ml de tampón) La densidad óptica fue tomada a 412 nm durante 5 minutos.

RESULTADOS

Estabilidad de la membrana lisosómica (LMS)

Todos los valores se encuentran entre 10-15 min (Fig. 1) lo que es típico para localidades con contaminación crónica como la estudiada. El grupo de -80°C fue el que obtuvo el LP más bajo (10 min). Aún así, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los datos de LP.

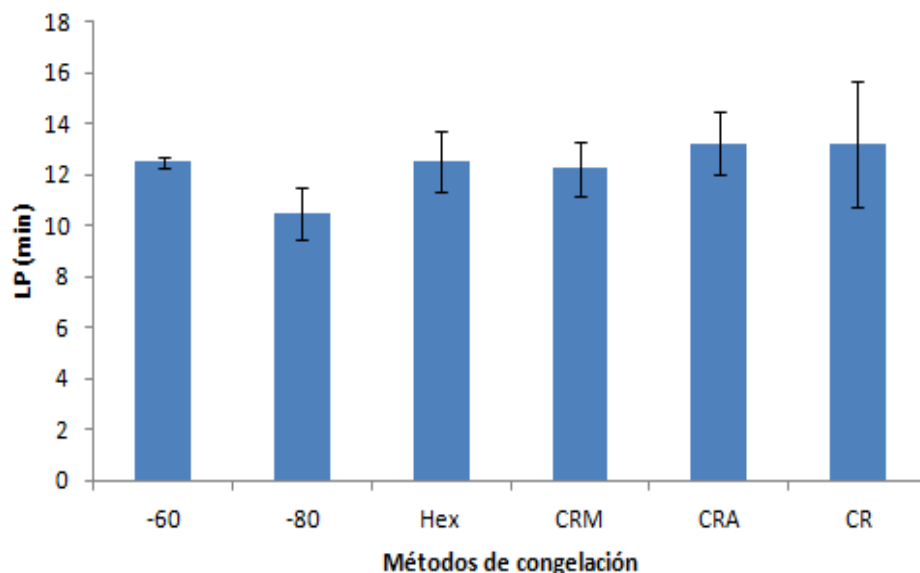


Figura 1. Tiempo (min) de desestabilización de la membrana lisosómica (LP) con diferentes métodos de congelación (-60°C, -80°C, hexano, muestra incluida en crioprotector (CRM), muestra envuelta en papel de aluminio (CRA) y muestra en criovial congelado con nitrógeno líquido (CR). Los intervalos indican la desviación estándar (U test, $p < 0,05$; $n=5$).

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Cambios estructurales en los lisosomas (LSC)

La medición de los diferentes parámetros estereológicos de la estructuras de los lisosomas de la glándula digestiva de mejillón nos muestra diferencias significativas para algunas de las técnicas evaluadas. En V_v se observaron diferencias significativas entre los grupos -80°C y hexano y entre hexano y muestras incluidas en crioprotector y congeladas en nitrógeno líquido. En el resto de grupos se obtuvieron valores alrededor de $0,003 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$ (Fig. 2). En S_v y S/V las diferencias significativas se obtuvieron en los grupos -80°C y hexano. Por último, en N_v , el método de congelación de -60 fue estadísticamente diferente respecto al grupo de muestras congeladas en nitrógeno líquido dentro de un criovial.

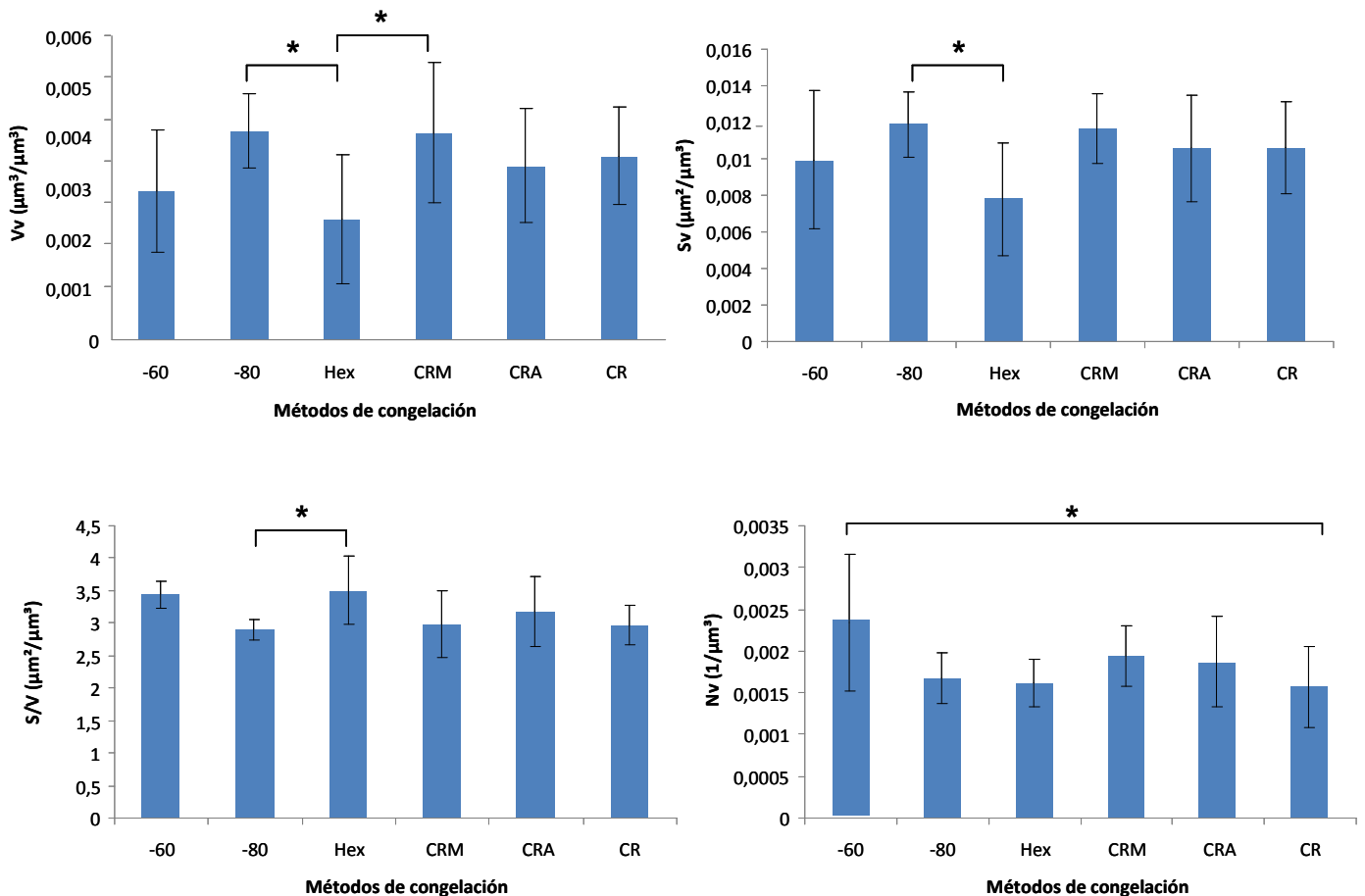


Figura 2. Parámetros estereológicos de lisosomas: A densidad de volumen (V_v), S_v , densidad de superficie lisosómica; S/V , relación superficie-volumen y N_v , densidad numérica con diferentes métodos de congelación (-60°C , -80°C , hexano, muestra incluida en crioprotector (CRM), muestra envuelta en papel de aluminio (CRA) y criovial en nitrógeno líquido (CR)). Los intervalos indican la desviación estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos después de la prueba U-test de Mann-Whitney ($p < 0,05$; $n = 5$).

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Acumulación de lipofuscinas

Tras el análisis al microscopio de las lipofuscinas podemos afirmar que las glándulas digestivas congeladas a -80°C presentan una mayor cantidad de lipofuscinas (Fig. 3A). Con el resto de métodos se observaron una cantidad menor. En el grupo de hexano, se observaron una menor cantidad de lipofuscinas las cuales tenían a su vez un menor tamaño (Fig. 3B).

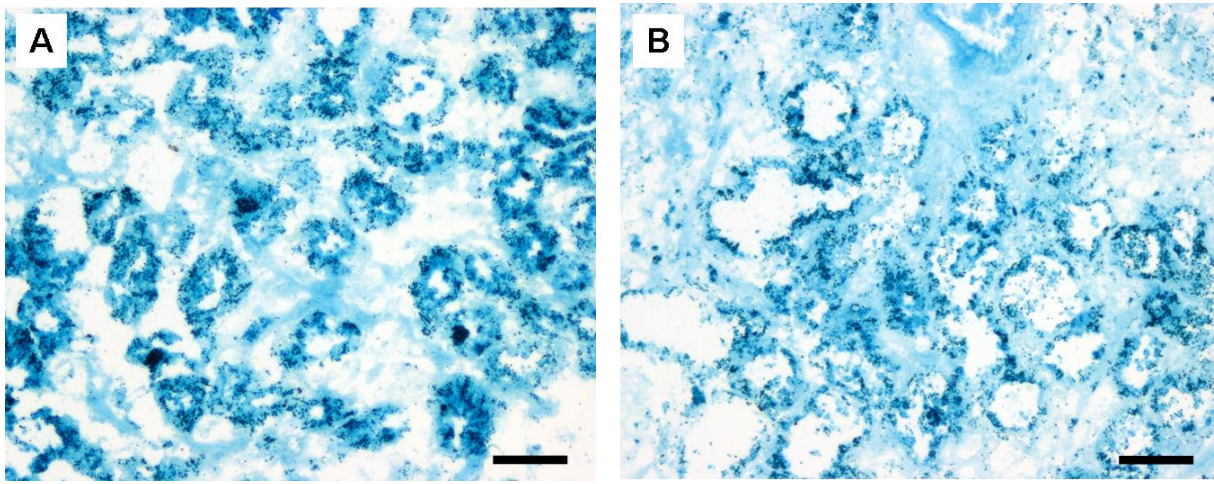


Figura 3. Acumulación de lipofuscinas con diferentes métodos de congelación (A, -80°C ; B, hexano) Las lipofuscinas se observan como precipitados de color azul intenso. Barra de escala: $100\mu\text{m}$.

Acumulación intracelular de lípidos neutros

Los datos obtenidos tras la medición de la acumulación de lípidos neutros en la glándula digestiva de mejillón nos indican que los grupos hexano y -80°C presentan los datos más bajos aunque no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Fig.4).

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

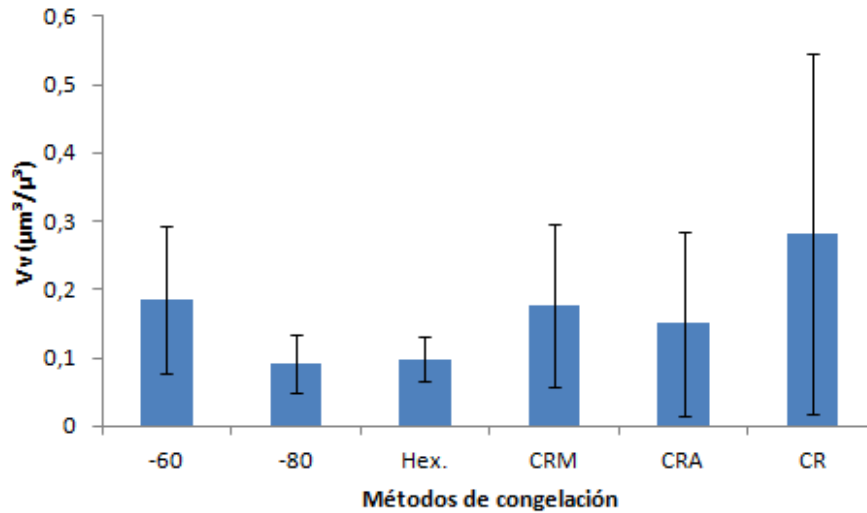


Figura 4. Acumulación intracelular de lípidos neutros con diferentes métodos de congelación (-60°C, -80°C, hexano, muestra incluida en crioprotector (CRM), muestra envuelta en papel de aluminio (CRA) y criovial en nitrógeno líquido (CR)). Medido como $V_{V_{NL}}$. Los intervalos indican la desviación estándar (U test, $p < 0,05$; $n=5$).

Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

Los valores de la actividad AChE de todos los grupos analizados se encuentran entre 3 y 4 (mg prot/min) que son valores típicos para estas localidades. Las diferencias observadas entre grupos no son en ningún momento significativas (Fig. 5).

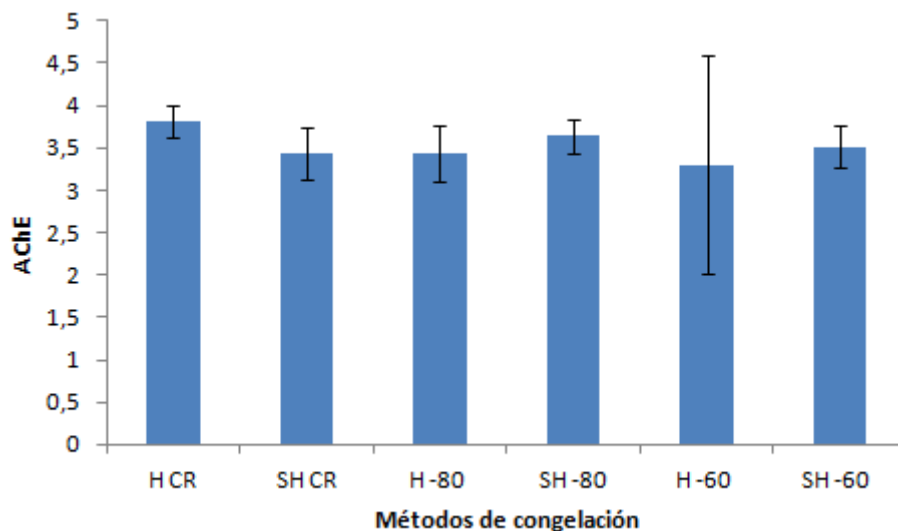


Figura 5. Determinación de la actividad de Acetil Colinesterasa (AChE) en pies de 40 mejillones con muestras homogeneizadas antes (H) y después (SH) de su congelación. Se aplicaron diferentes métodos de congelación (nitrógeno líquido (CR); -80°C y -60°C). Los intervalos indican la desviación estándar. No se registraron diferencias estadísticas significativas entre grupos (ANOVA; Duncan post hoc, $p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Los biobancos ambientales son infraestructuras profesionalizadas que garantizan la buena calidad y seguridad de las muestras almacenadas. Esto permite mantener las muestras en buenas condiciones durante décadas para futuros estudios retrospectivos. En estos estudios una buena trazabilidad de la muestra, desde la recogida de muestra hasta el almacenado final, es necesaria para que los resultados obtenidos sean de fiar y comparables entre ellos.

Por ello, uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido estudiar si los procesos de congelación previos al almacenamiento de la muestra en el biobanco tienen o no influencia en las respuestas de los biomarcadores histoquímicos y bioquímicos.

Existen diferentes técnicas de pre-procesamiento de muestras y cada laboratorio, en función de sus recursos, se acoge al que le es más accesible. Ante esta realidad y siendo conscientes de la importancia de garantizar a los futuros investigadores la máxima fiabilidad en los resultados, una buena trazabilidad de la muestra almacenada es necesaria.

En el BBEBB el método de pre-procesamiento más utilizado es el del nitrógeno líquido (N_2) a $-196^\circ C$, estas bajas temperaturas aseguran que la congelación se produzca de forma instantánea. Por otra parte, antes de congelar las muestras en N_2 , se introducen en un criovial para evitar cualquier daño en el tejido debido a la formación de cristales. Estas muestras se almacenan en el biobanco en un congelador a $-80^\circ C$.

Uno de los mayores inconvenientes cuando se trabaja con N_2 es el transporte. Para ello se necesitan vehículos bien equipados junto con tanques de N_2 autorizados. Por otra parte cuando los muestreos se realizan en barcos habría que utilizar otras técnicas alternativas como podría ser el hielo seco.

Hemos seleccionado esta técnica debido a la necesidad de utilizar un elemento de congelación en estado sólido (hielo seco) que permita su transporte en barco o en aquellos vehículos no autorizados al transporte de N_2 . Ésta técnica de congelación a $-60^\circ C$ utilizada en este trabajo es una simulación del hielo seco. En los resultados obtenidos en los biomarcadores histoquímicos hemos podido observar que los valores obtenidos se ajustan a las otras técnicas salvo para la densidad numérica de lisosomas. Por otra parte, en relación al biomarcador bioquímico, los niveles de AChE bajan de forma poco significativa en la modalidad de muestras homogeneizadas respecto a las otras técnicas (Fig. 5.). Esta técnica, por lo tanto, ofrece suficientes garantías como para poder utilizarla en ocasiones en las que no se puede utilizar el N_2 .

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Otra de las técnicas de pre-procesamiento seleccionada es la congelación a -80°C . Los congelados de -80°C son muy utilizados en los laboratorios, los cuales permiten una buena conservación de los tejidos durante mucho tiempo. En este trabajo, tanto en los biomarcadores histoquímicos como en los bioquímicos estudiados, en general, se han observado pocas diferencias respecto a las otras técnicas aplicadas, excepto en la acumulación de lípidos neutros (Fig. 4).

Una de las técnicas recomendadas por la UNEP (Naciones Unidas del Programa de Medio Ambiente) como pre-procesamiento de muestra en laboratorio es el hexano. Con los resultados obtenidos en este trabajo se ha podido concluir que es la técnica más variable, siendo las diferencias estadísticamente significativas respecto a las muestras pre-procesadas a -80 o en N_2 en el caso de Vv. (Fig. 2).

El N_2 es una de las técnicas más utilizadas, sobre todo, en muestras almacenadas en biobancos ambientales. Aunque no se han observado diferencias significativas en los niveles de AChE y acumulación de lipofuscinas (Fig. 3) respecto a las otras técnicas de pre-procesamiento, las respuestas lisosómicas dicen lo contrario. Se han observado diferencias significativas en los valores de Vv respecto a las muestras pre-procesadas en hexano y en los valores de Nv respecto a las muestras pre-procesadas a -60°C (Fig. 2). Por otra parte, aunque las diferencias no son significativas, los valores de Nv tienden a ser más altas en las muestras pre-procesadas en N_2 que en el resto de las técnicas (Fig. 3).

Las muestras pre-procesadas en N_2 han sido tratadas de diferente forma utilizando un gel crioprotector, o crioviales o envueltas en papel de aluminio para proteger en contacto directo del tejido con el N_2 . En general, no se han observado diferencias significativas entre los tres procesos de N_2 en las respuestas lisosómicas estudiadas ni en los niveles de AChE.

En el caso de las muestras tratadas con el gel crioprotector, sólo se han observado diferencias significativas en el parámetro Vv (Fig. 2A) respecto a las muestras pre-procesadas en hexano.

En conclusión, el pre-procesamiento de muestras a diferentes temperaturas antes del almacenamiento final de estas muestras en el biobanco es una variable a tener en cuenta. Las respuestas lisosómicas y los niveles de los parámetros bioquímicos pueden cambiar dependiendo de la técnica de congelación previa al almacenamiento en el biobanco.

Por otra parte, este trabajo debiera ser completado con mejillones de localidades con diferentes niveles de contaminación, o diferentes épocas del año que conlleven a diferencias en las respuestas de los biomarcadores así como el género y desarrollo gonadal. Todas estas investigaciones están programadas en un futuro con el fin de mejorar las técnicas utilizadas en el BBEBB para la evaluación de la salud de los ecosistemas.

BIBLIOGRAFÍA

- Cajaraville MP., Marigómez I. & Angulo E., 1989. A stereological survey of lysosomal structure alterations in *Littorina littorea* exposed to 1-naphthol. *Comp. Biochem. Physiol.* 93 (C): 231-237.
- Cajaraville MP., Robledo Y., Etxeberria M. & Marigómez I., 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville MP (Eds.) *Cell biology in environmental toxicology*. University of the Basque Country Press Service, Bilbao, 29-55 pp.
- Culling C. F. A., 1974. *Handbook of histopathological and histochemical techniques*, 3rd (Eds.) Butterworths, London.
- Ellman G., Courtney K.D., Valentino A. & Featherstone R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Volume 7, Issue 2, July, Pages 88-90 IN1, 91-95.*
- Garmendia L., 2008. *Monitoring of the prestige oil spill biological effects based on the biomarker approach: mussel watch from Galicia to Basque coast*. Ph. D. Thesis.
- Garmendia L., Izagirre U., Soto M., Lermen D & Koschorreck J., 2014. Combining chemical and biological endpoints, a major challenge for twenty-first century's environmental specimen banks. *Environmental Science and Pollution Research*.
- ICES., 2012. *International Council for the Exploration of the Sea, Report of the study group on Integrated Monitoring of Contaminants and Biological Effects (SGIMC)*. ICES CM 2011/ACOM: 30. 265 pp. Copenhagen, Denmark, 14-18 March 2012.
- Izagirre U., 2007. *Contribution to the interpretation of lysosomal biomarkers in marine organisms based on the mechanistic understanding of the lysosomal responses to pollutants*. Ph. D Thesis.
- Küster A, Becker PR, Kucklick JR, Pugh RS, Koschorreck J., 2014. The international environmental specimen banks-let's get visible. *Environment Science Pollution Research*.

Análisis bioquímico e histoquímico de la variabilidad producida por cambios de temperatura en muestras del banco de especímenes

Lowe DM, Moore MN, Clarke KR., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquat. Toxicol.* 1: 213-226

Marigómez I, Zorita I., Izagirre U., Ortiz-Zarragoitia M., Navarro P., Etxebarria N., Orbea A., Soto M., Cajaraville M. P., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquatic Toxicology* 136–137 pp.

Moore MN., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel (*Mytilus edulis*), and changes induced by thermal stress. *Cell. Tissue. Res.* 175: 279-287 pp.

MSFD, 2008. Directive 2008/56/EC of the European Parliament and the Council of 17 June 2008 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Marine Environmental Policy (Marine Strategy Framework Directive).

OSPAR, 2008. CEMP Assessment Manual. Co-ordinated Environmental Monitoring Programme Assessment Manual for contaminants in sediment and biota. Monitoring and Assessment Series No. 379/2008, OSPAR, 39 pp.

Tanabe S., Ramu K., 2012. Monitoring temporal and spatial trends of legacy and emerging contaminants in marine environment: Results from the environmental specimen bank (es-BANK) of Ehime University, Japan.

UNEP/RAMOGGE. 1999. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme. UNEP, Athens.