



Evaluación del efecto del agua de las curtiembres de San Benito localidad de Tunjuelito
en la cepa transgénica EG1285 de *Caenorhabditis elegans*

Para optar por el título de:

BACTERIÓLOGA Y LABORATISTA CLÍNICO

Presentado por:

WENDY PAOLA SÁNCHEZ GUTIÉRREZ

YESSICA FERNANDA SANTIAGO LOZANO

Asesor Interno:

RUTH MÉLIDA SÁNCHEZ MORA Ph.D

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

JUNIO 2019

Contenido

1. Introducción
 2. Antecedentes
 3. Objetivos
 4. Metodología
 5. Resultados y Discusión
 6. Conclusiones
- Referencias



<https://canariaszec.com/requisitos-que-se-deben-cumplir-para-establecerse-en-la-zec/>

1. Introducción

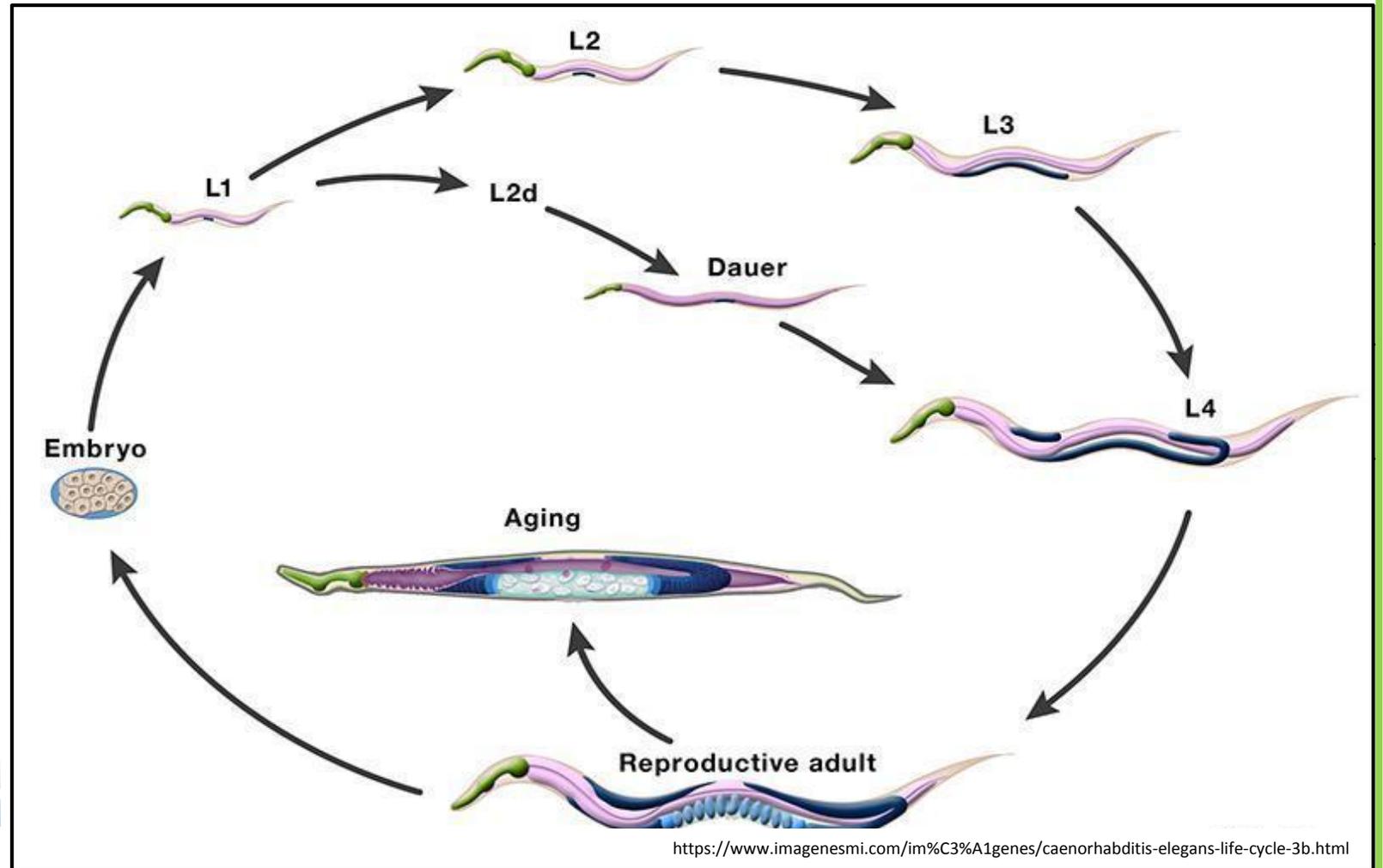
Caenorhabditis elegans

Ciclo de vida

Duración: Aprox. 3 días a 25 °C

Estadios: Embrionario
Larvarios (4)
Dauer (Condiciones de estrés)
Adulto

Diferenciación sexual: Macho (0.2%)
Hermafrodita



Sistema nervioso

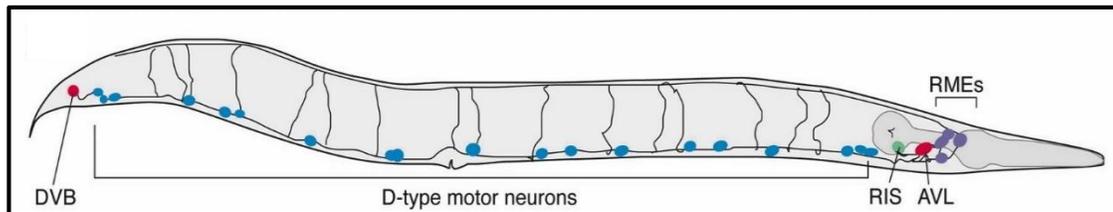
- Posee 302 neuronas de las cuales **26 son GABAérgicas**.
- El neurotransmisor GABA actúa principalmente en las sinapsis neuromusculares (alimentación, locomoción y defecación).

Receptores GABA_A

Ejercen efecto inhibitorio al abrir los canales de cloruro

Receptores GABA_B

Ejercen efecto inhibitorio al abrir los canales de potasio

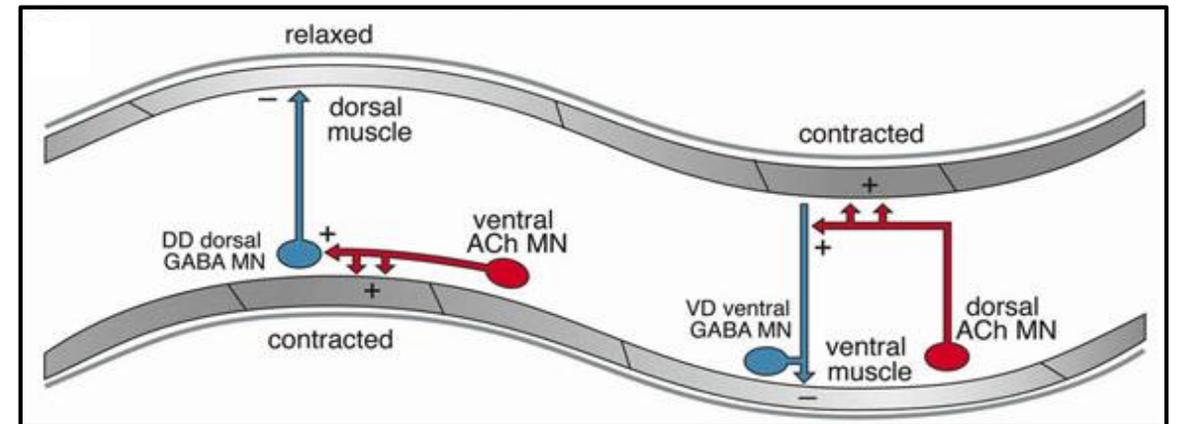


http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html

6DD, 13VD, 4RME, RIS, AVL Y DVB

Neuronas motoras

Las neuronas de **tipo D inhiben la contracción** de los músculos de la pared del cuerpo ventral y dorsal **durante la locomoción**.



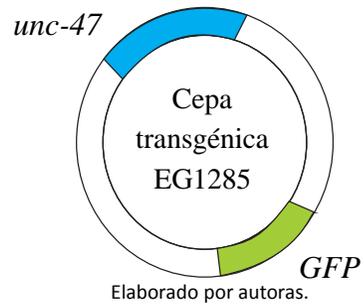
http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html

— GABA — ACh

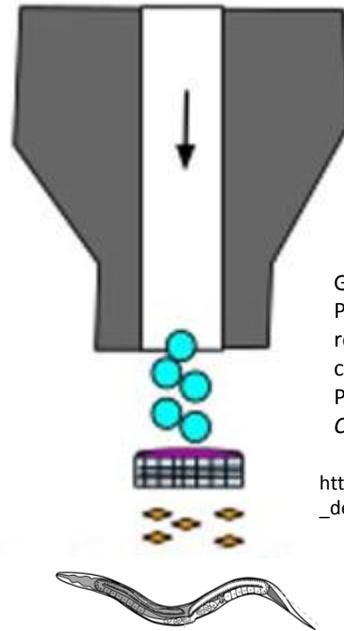
La ondulación del cuerpo se da mediante la **contracción** de los músculos en un lado del cuerpo y la **relajación** de los músculos en el lado opuesto.

Cepa EG1285

Nombre	EG1285
Especie	<i>C. elegans</i>
Genotipo	Lin-15B& Lin-15A(n765)oxls12 X.
Descripción	Expresión de GFP en todas las neuronas GABAergicas.
Mutante	Integrado por biolística



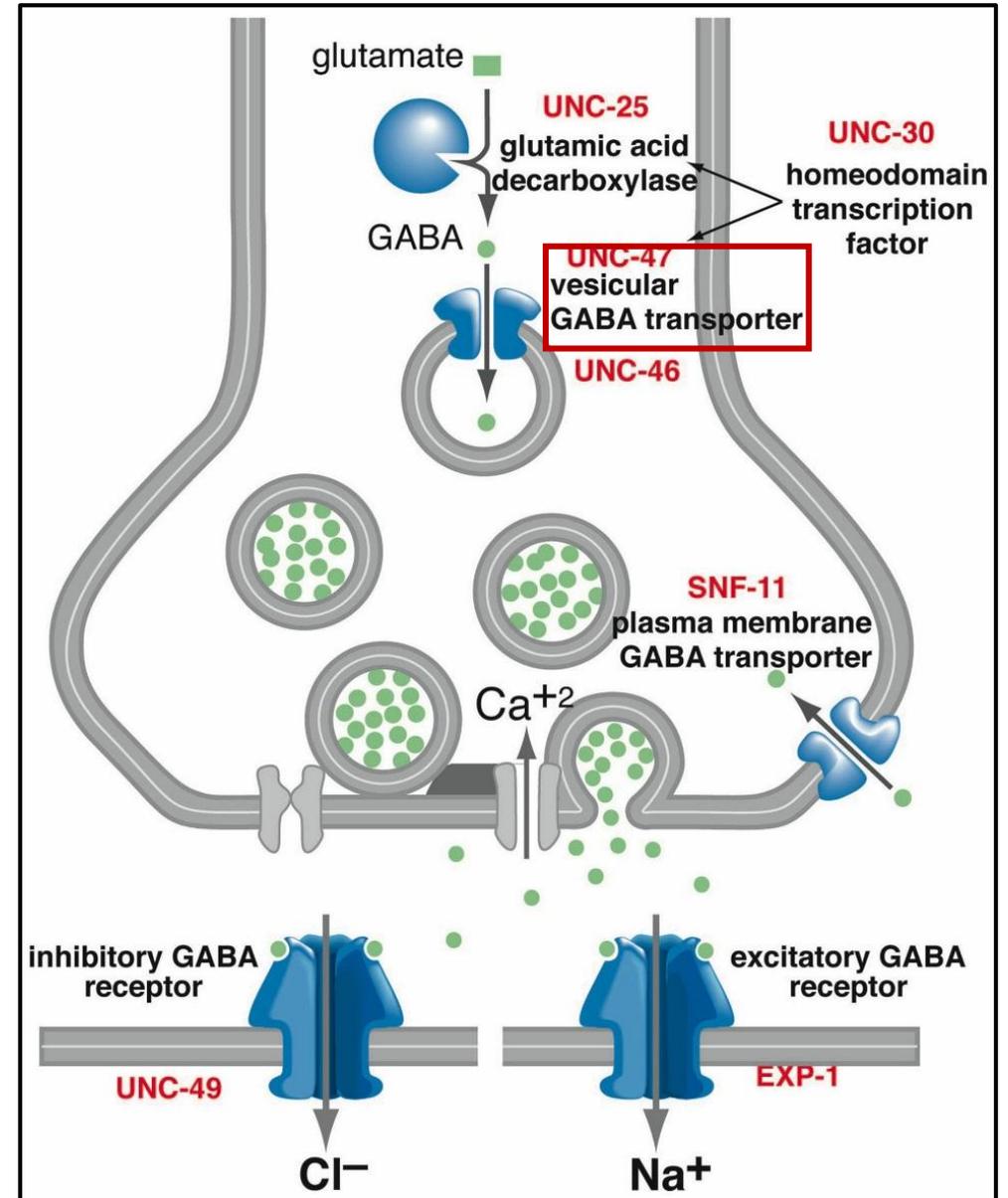
UNC 47 + GFP



Biolística

Gas
Part. Oro
revestidas
con ADN
Pantalla
C. elegans

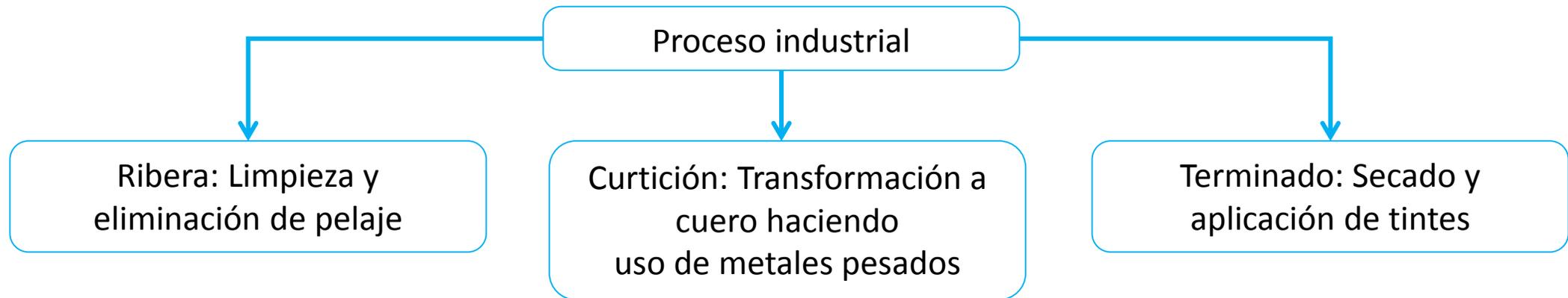
https://copro.com.ar/Pistola_de_genes.html



http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html

Curtiembres de San Benito

- Ubicadas en la localidad de Tunjuelito, desde hace 70 años aproximadamente.
- Declarado como barrio mixto dada su actividad industrial y residencial generando características urbano-ambientales complejas

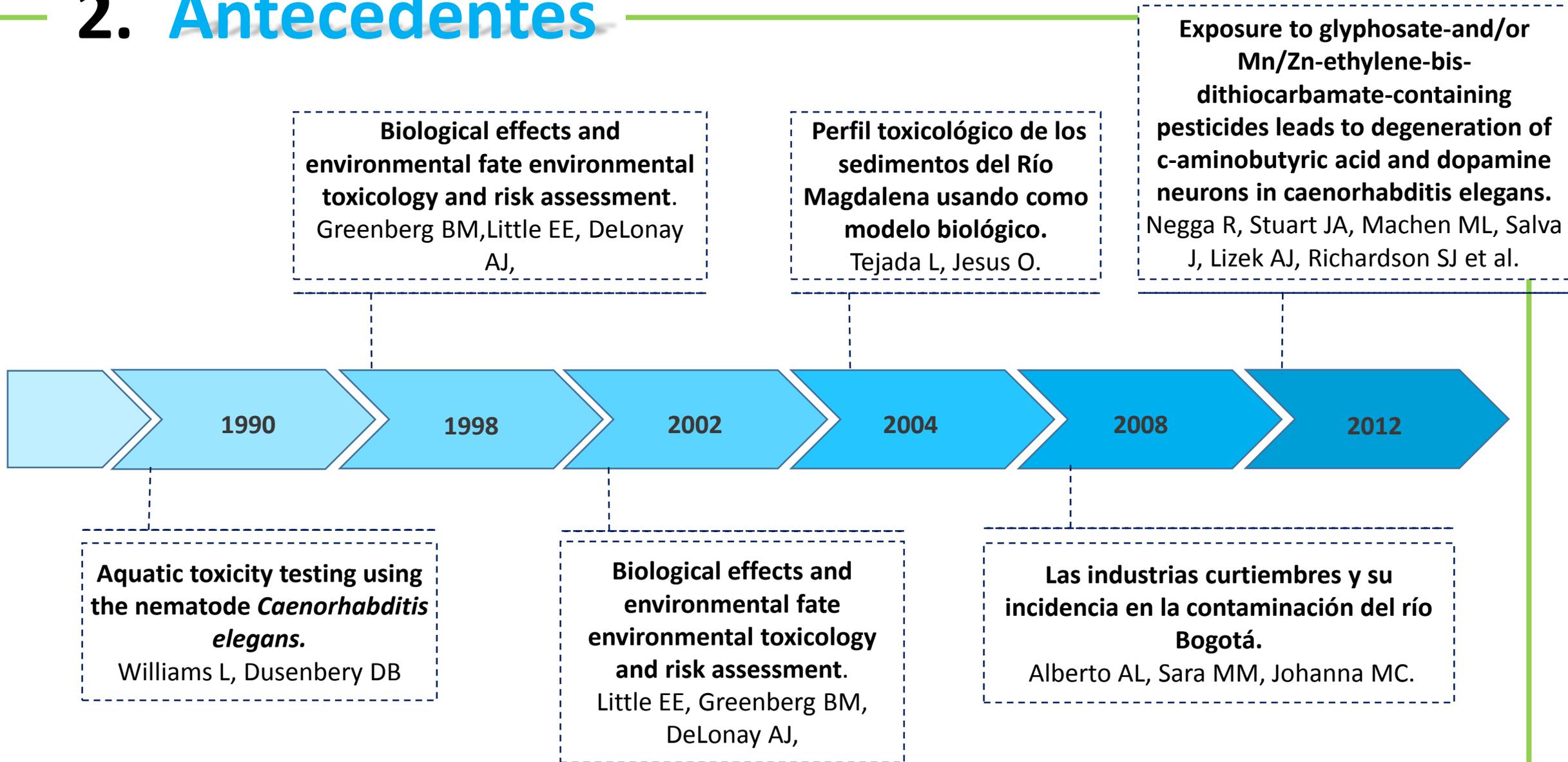


Tomada por autoras

Normatividad

Decreto 2811 de 1974
Ley 9 de 1979
Decreto 1594 de 1984
Resolución 1074 de 1997
Resoluciones 3956 y 3957 de 2009
Resolución 631 de 2015

2. Antecedentes



3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto del agua de las curtiembres de San Benito sobre las neuronas GABAérgicas en una cepa de *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente la cepa transgénica EG1285 de *Caenorhabditis elegans*.
- Establecer diferencias en las características fisiológicas de la cepa antes y después de ser tratada con la muestra de agua.
- Analizar el efecto del agua de las curtiembres de San Benito en las neuronas GABAérgicas del nematodo.

4. Metodología

Recolección de la muestra de agua

Mantenimiento de las cepas

Sincronización

Ensayo de Supervivencia

Ensayo de Motilidad

Ensayo de Reproducción

Ensayo de letalidad

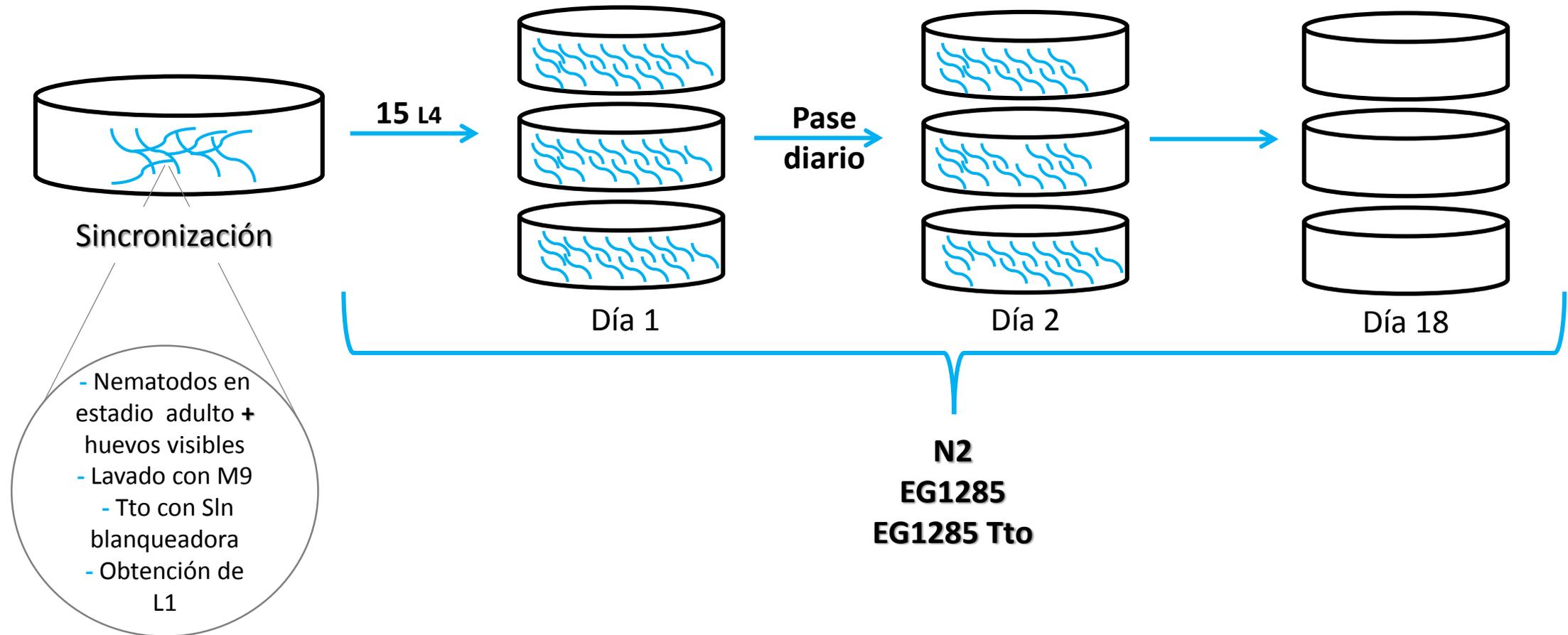
Microscopia de fluorescencia

Análisis del agua del rio Tunjuelito



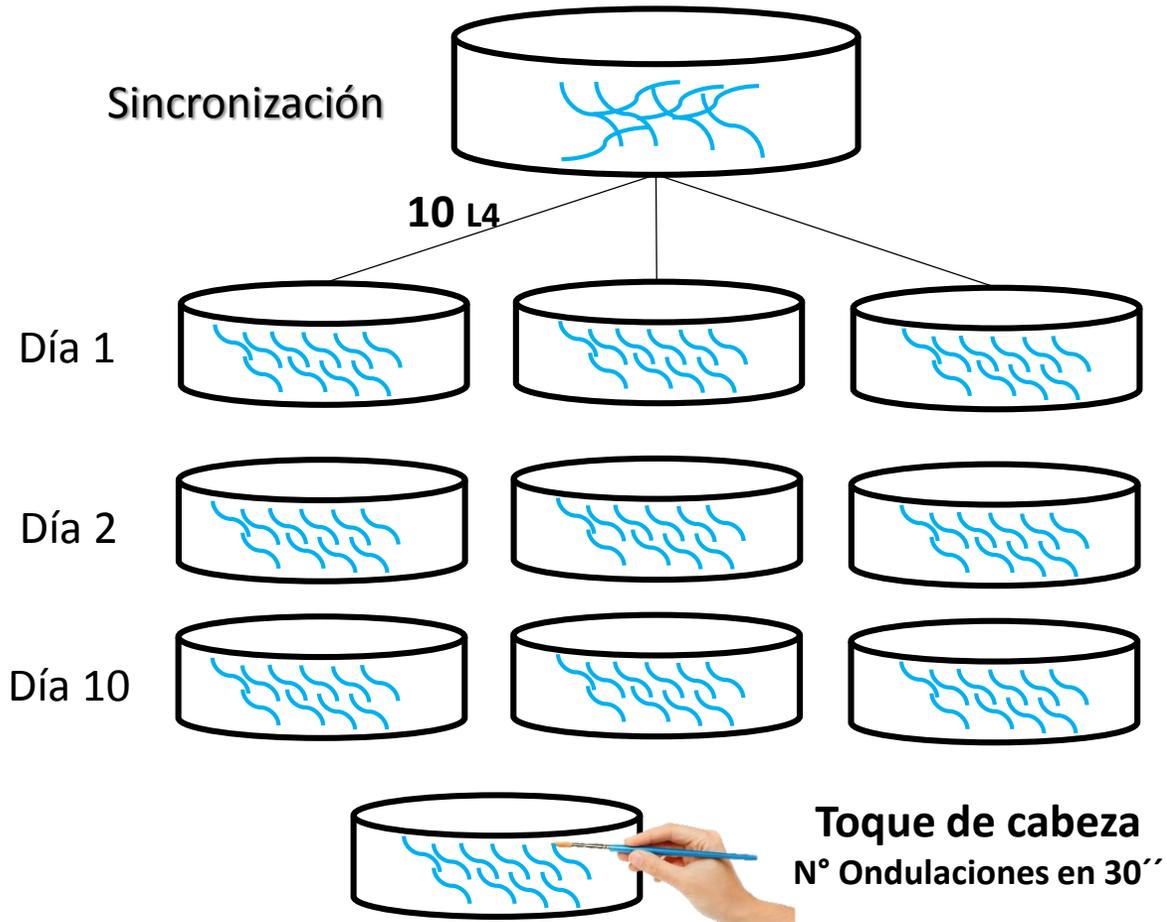
Ensayo de Supervivencia

Relaciona la edad y muerte de las larvas para determinar el tiempo de vida



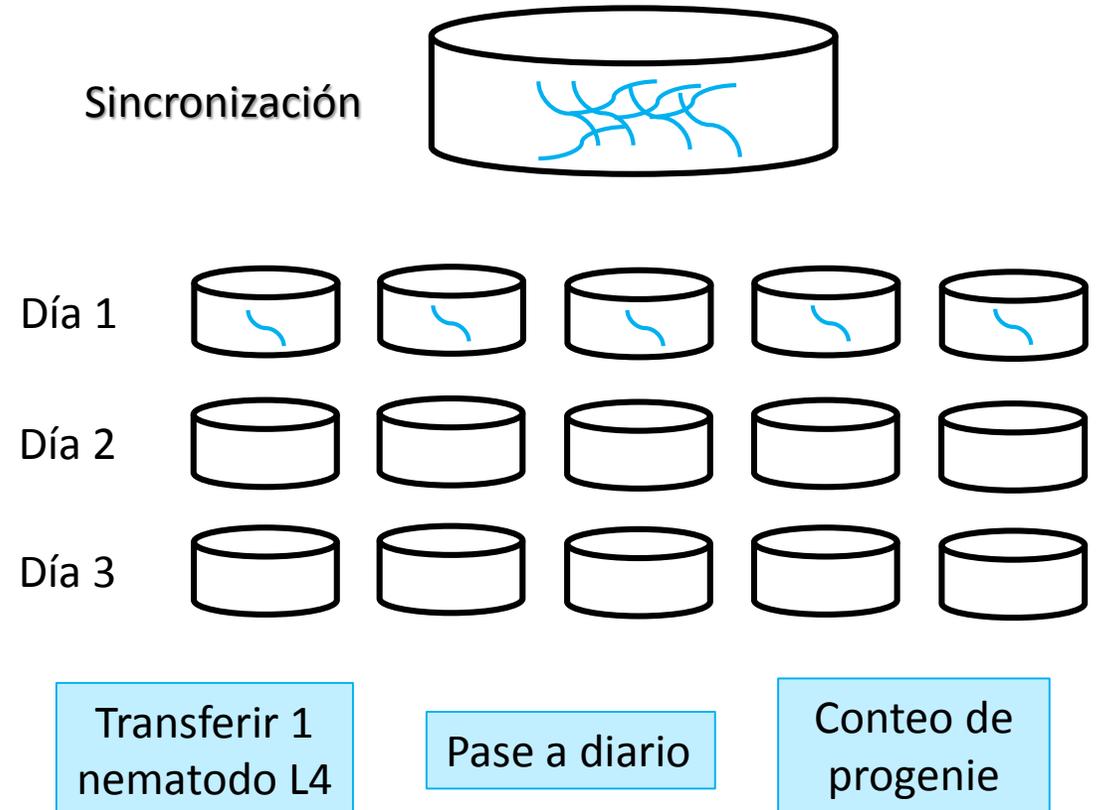
Ensayo de Motilidad

Evaluar la capacidad motora del nematodo



Ensayo de Reproducción

Determinar el número de larvas a las cuales da origen durante su ciclo de vida



Microscopía de fluorescencia



Cuantificar fluorescencia de las neuronas GABAérgicas del nematodo.

Preparación de
agarosa



Inmovilización de
nematodos (3)



Observación al
microscopio y
fotografiar



Cuantificación
por medio de
ImageJ

Análisis del río Tunjuelito

Muestra
preservada con
ácido nítrico



Cadena de frío



Cuantificación de
Cromo

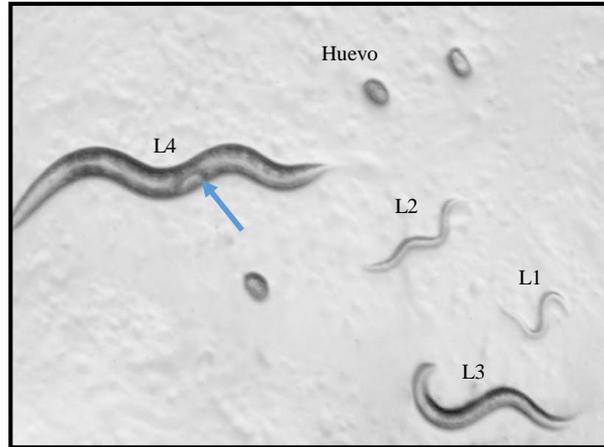
Análisis estadístico



Log-rank test
T-student test
Regresión lineal

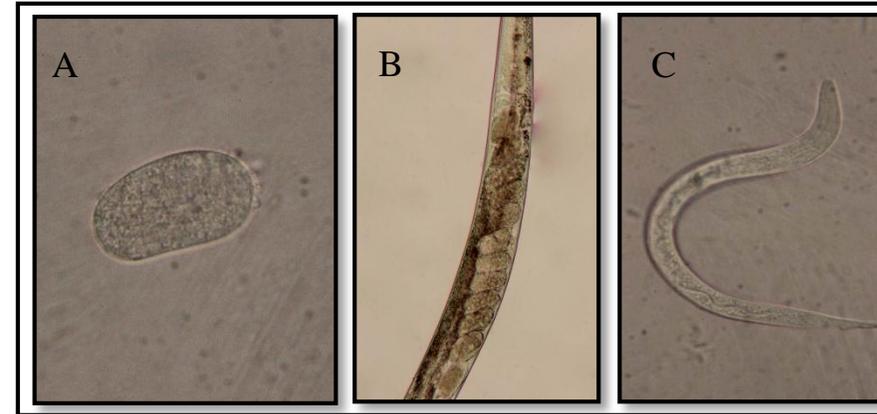
5. Resultados y Discusión

Los estadios de la cepa N2 y EG1285 no presentan diferencias

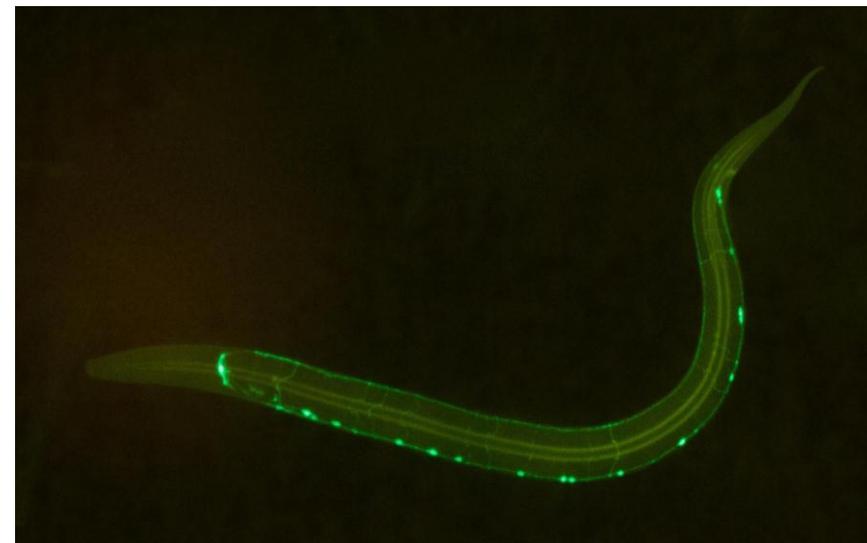


Observación microscópica de estadios larvarios cepa EG1285. Tomada por autoras.

Parada y cols. 2017
Caracterización fenotípica de N2

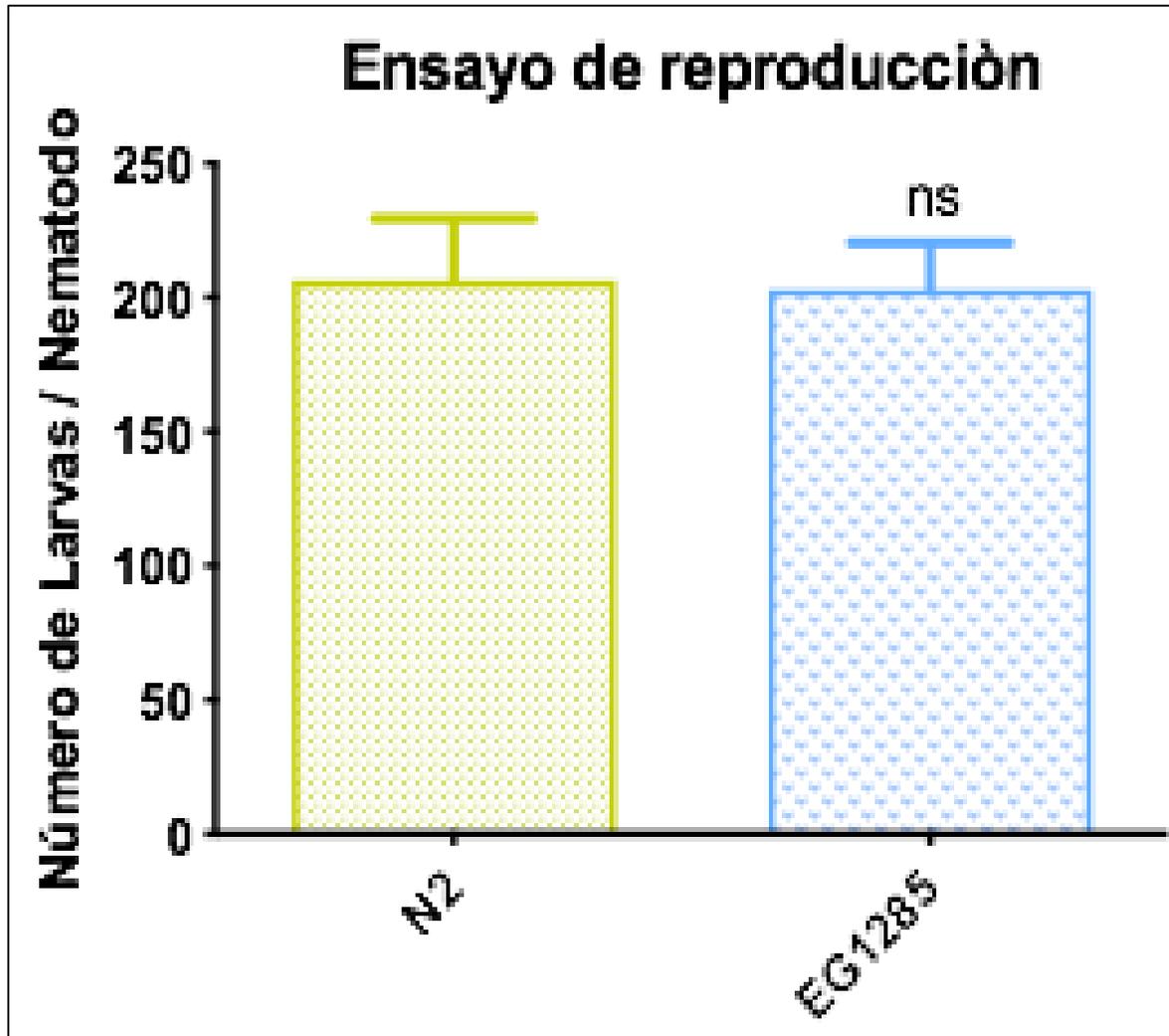


Observación microscópica de estadios larvarios cepa N2. Tomadas por autoras.



Vista lateral de Larva en estadio L4 de C. elegans en microscopio de fluorescencia. Neuronas GABAérgicas marcadas con GFP.

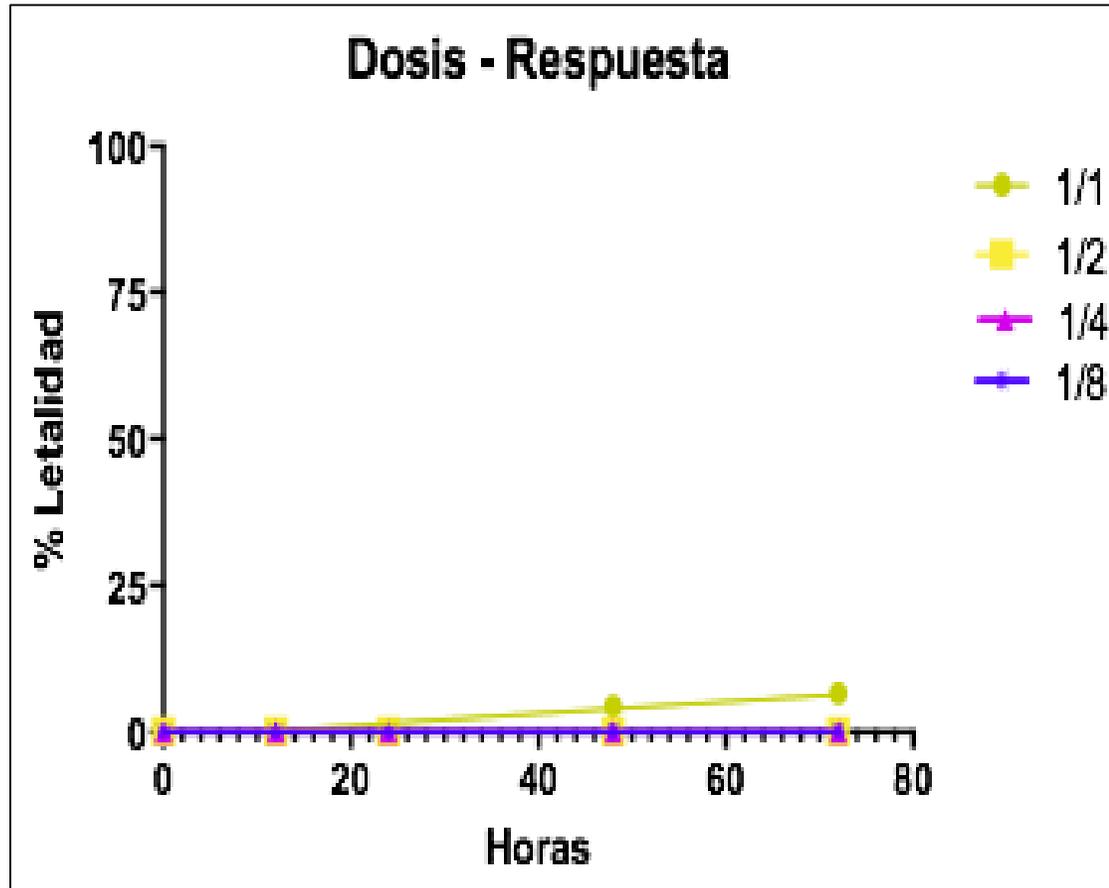
Las cepas N2 y EG1285 no presentan diferencias en las características fisiológicas



Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de C elegans, ensayo de reproducción. El valor de $p=0.6323$ demostró que no hay significancia estadística en la comparación. Se realizó la prueba T student.

Parada y cols. 2017
Caracterización fisiológica de N2

El agua del río Tunjuelito a la altura de las curtiembres no genera dosis letal en la cepa EG1285 de *C. elegans*



Curva de dosis respuesta para la cepa EG1285 sometida a tratamiento en diversas diluciones.

- La gráfica refleja una tendencia a pesar de que *C. elegans* fue sometido a diversas concentraciones.
- El pH obtenido en el lugar de muestreo no afecta el desarrollo del nematodo.

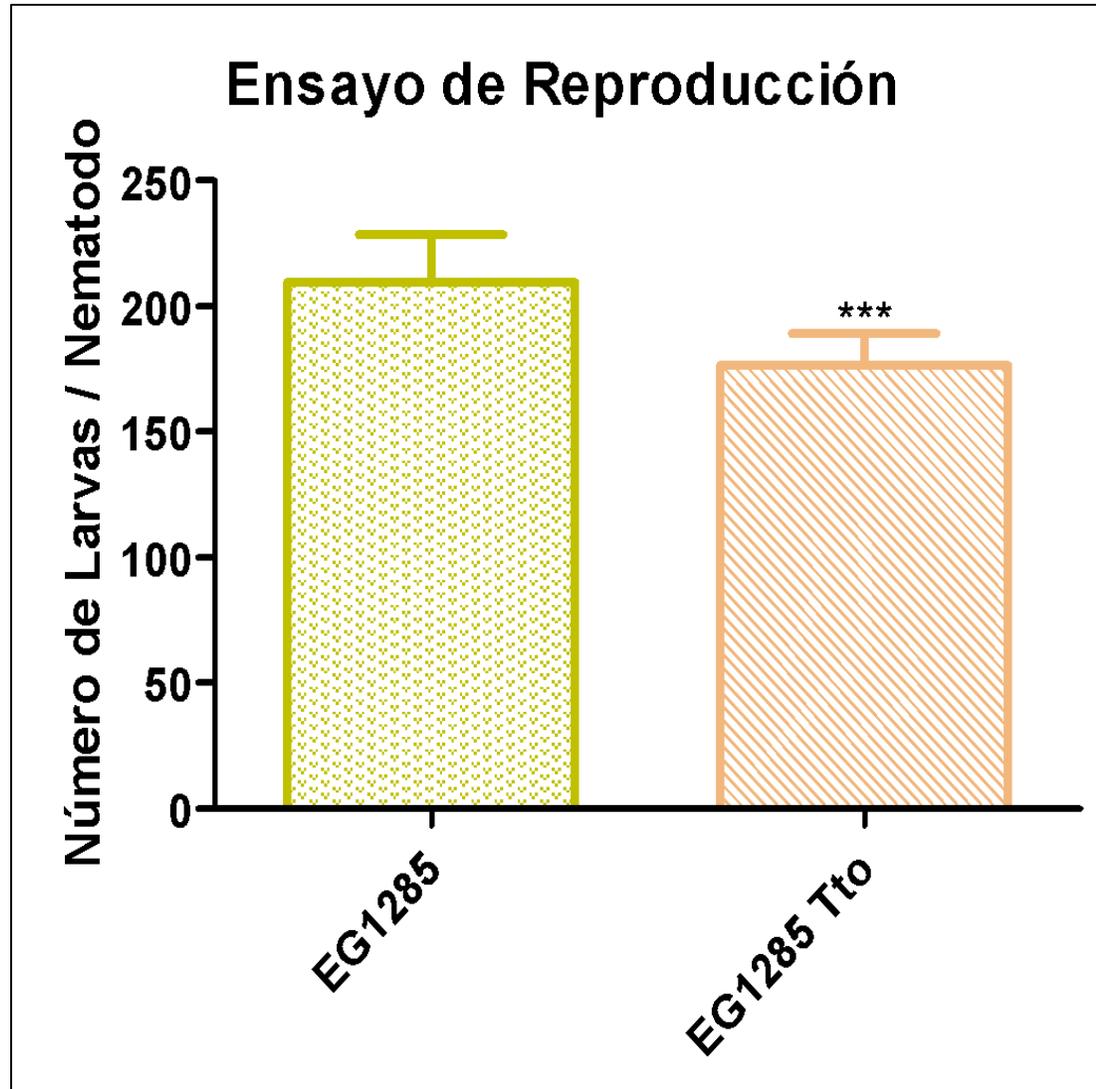
Datos obtenidos en el lugar de muestreo

Muestra	pH	Conductividad	Temperatura
01	6.888	213uS/cm	15°C

Williams y cols. 1990

Determinaron la dosis letal 50 en la cepa salvaje de *C. elegans* con dicromato de potasio.

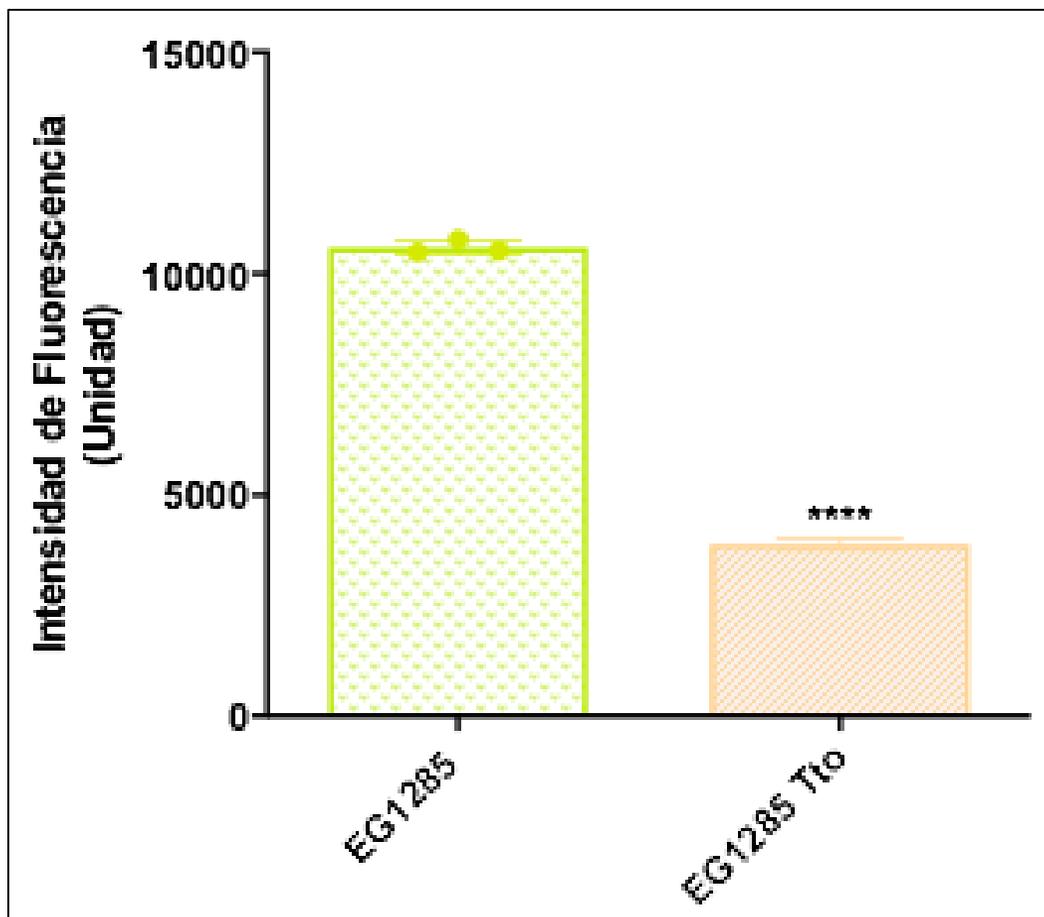
La cepa EG1285 sometida a tratamiento difiere de la cepa control



*Ensayo de reproducción en la cepa de *C elegans* EG1285 en tratamiento.* El valor de $p=0.0001$ demostró que hay diferencias estadísticamente significativa en la comparación.

Harada y cols. en 2007

Evaluar la capacidad reproductiva de los nematodos de la cepa silvestre expuestos a CdCl_2 y CuSO_4 , evidenciando la disminución en el número de la progenie



Cuantificación de la fluorescencia. Con promedio de los resultados equivalente a 10.775 URF para la cepa control y 3.175 URF para la cepa tratada.

La muestra de agua del río Tunjuelito contiene trazas de Cromo.

Muestra	Concentración mg/L	Valor Límite Máximo
01	0,024	0.50

Valor obtenido de la concentración de Cromo. Se muestra el resultado de la muestra de *agua* correspondiendo la al efluente del río. .

Resolución 631 de 2015

Esta Resolución es de obligatorio cumplimiento para todas aquellas personas que desarrollen actividades industriales, comerciales o de servicios y que en desarrollo de las mismas generen aguas residuales, las cuales serán vertidas en cuerpos de agua superficial o a alguna red de alcantarillado público.

6. Conclusiones

Los nematodos de las cepas EG1285 y N2 de *C. elegans* no presentan diferencias en cuanto a estadios larvarios y características fisiológicas como supervivencia, motilidad y reproducción.



El plásmido insertado en la cepa EG1285 que actúa como gen reportero mediante GFP no genera ninguna alteración sobre las características fisiológicas del nematodo en comparación con la cepa salvaje.



Las características fisiológicas de los nematodos de la cepa EG1285 se ven afectadas tras ser sometidos a tratamiento con agua del río Tunjuelito, razón por la cual se sugiere que hay inducción de daño neuronal mediada por los componentes del agua.



La GFP expresada en las neuronas GABAérgicas se reduce a niveles considerables en nematodos expuestos a la muestra de agua, lo que explica la alteración motora evidenciada por las larvas de la cepa EG1285.

Referencias

- Tobergte DR, Curtis S. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.
- Williams L, Dusenbery DB. AQUATIC TOXICITY TESTING USING THE NEMATODE, CAENORHABDITIS ELEGANS Environmental Protection Agency (PA) has published. Society. 1990;9:1285–90.
- Peter E, Candido M, Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. Trends Biotechnol. 1996;14(4):125–9.
- Little EE, Greenberg BM, DeLonay AJ, ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate., Environmental Toxicology and Risk Assessment (7th : 1997 : St. Louis Mo. Environmental toxicology and risk assessment. seventh volume. ASTM; 1998. 418 p.
- Dhawan R, Dusenbery DB, Williams PL. Comparison of lethality, reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode *Caenorhabditis elegans*. J Toxicol Environ Heal - Part A. 1999;58(7):451–62.
- Anderson GL, Boyd WA, Williams PL. Assessment of Sublethal Endpoints for Toxicity Testing With the Nematode *Caenorhabditis Elegans*. Environ Toxicol Chem. 2005;20(4):833.
- Anderson GL, Cole RD, Williams PL. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Chem. 2004;23(5):1235–40.
- Harada H, Kurauchi M, Hayashi R, Eki T. Shortened lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans* after prolonged exposure to heavy metals and detergents. Ecotoxicol Environ Saf. 2007;66(3):378–83.
- Du M, Wang D. The neurotoxic effects of heavy metal exposure on GABAergic nervous system in nematode *Caenorhabditis elegans*. Environ Toxicol Pharmacol. 2009;27(3):314–20.
- Negga R, Stuart JA, Machen ML, Salva J, Lizek AJ, Richardson SJ, et al. Exposure to glyphosate-and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of c-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*.