



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

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO



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

Presentado por:
WENDY PAOLA SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
YESSICA FERNANDA SANTIAGO LOZANO

Asesor:
RUTH MELIDA SANCHEZ MORA MSc PhD

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO

DEDICATORIA

A Dios por guiarnos de la mejor manera en cada paso para la realización de este proyecto, por darnos la sabiduría y paciencia necesaria.

A nuestros padres por enseñarnos la importancia de hacer las cosas de la mejor manera, para obtener así los mejores resultados.

A nuestros hermanos quienes con su amoroso trato nos demostraron que todo se puede lograr sin importar las dificultades en el camino.

A nuestros demás familiares quienes desde la distancia nos apoyaron en este camino haciendo posible la culminación de esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la oportunidad de finalizar una meta más en nuestras vidas y enriquecer nuestro conocimiento.

A la Doctora Ruth Mélida Sánchez por su compañía, dedicación y conocimiento compartido durante el desarrollo de este proyecto.

A la MsC. Lizeth González quien nos apoyó con su conocimiento científico y constante acompañamiento.

A la UCMC por brindar las instalaciones y personal capacitado para llevar a cabo los resultados satisfactorios

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
1. OBJETIVOS.....	3
1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
2. ANTECEDENTES.....	4
3. MARCO TEÓRICO	10
3.1 CAENORHABDITIS ELEGANS	10
3.2 CICLO DE VIDA.....	10
3.3 SISTEMA DIGESTIVO.....	13
3.4 SISTEMA REPRODUCTOR	14
3.5 SISTEMA NERVIOSO.	15
3.5.1 <i>Neuronas GABAérgicas.</i>	15
3.5.2 <i>Receptores de GABA</i>	16
3.5.3 <i>Función Locomotora</i>	17
3.6 CEPA TRANSGÉNICA EG1285.....	17
3.7 CURTIEMBRES DE SAN BENITO	18
3.8 CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO TUNJUELITO	20
3.9 NORMATIVIDAD	21
4. METODOLOGÍA.....	23
METODOLOGÍA GENERAL.....	23
4.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA DE AGUA	23
4.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO NGM Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA	24
4.3 FENOTIPIFICACIÓN DE LA CEPA EG1285 DE <i>C. ELEGANS</i>	24
4.4 OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA	26
4.5 ANÁLISIS DEL AGUA DEL RIO TUNJUELITO	26
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	26
5. RESULTADOS	28
5.1 LOS ESTADIOS DE LA CEPA N2 Y EG1285 NO PRESENTAN DIFERENCIAS	28
5.2 LA CEPA EG1285 EXPRESA LA PROTEÍNA GFP EN LAS NEURONAS GABA	30
5.3 LAS CEPAS N2 Y EG1285 NO PRESENTAN DIFERENCIAS EN LAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS.....	31
5.3.1 <i>La supervivencia C. elegans no difiere entre la cepa EG1285 y N2</i>	31

4.3.1.....	32
5.3.2 <i>La motilidad de C. elegans no difiere entre la cepa N2 y EG1285</i>	32
5.3.3 <i>La reproducción de C. elegans no difiere entre la cepa N2 y EG1285</i>	33
5.4 EL AGUA DEL RÍO TUNJUELITO A LA ALTURA DE LAS CURTIEMBRES NO GENERA DOSIS LETAL EN LA CEPA EG1285 DE <i>C. ELEGANS</i>	34
5.5 EFECTO DEL AGUA SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS CEPA EG1285	35
5.5.1 <i>La supervivencia de la cepa EG1285 varía con el tratamiento del agua del río Tunjuelito</i>	35
5.5.2 <i>La motilidad de la cepa EG1285 se afectó con el tratamiento del agua del río Tunjuelito</i>	36
5.5.3 <i>La tasa de reproducción de la cepa EG1285 disminuyó con el tratamiento del agua del río Tunjuelito</i>	37
5.6 EFECTO DEL AGUA SOBRE LAS NEURONAS GABA	38
5.7 LA MUESTRA DE AGUA DEL RÍO TUNJUELITO CONTIENE TRAZAS DE CROMO.....	40
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES.....	44
REFERENCIAS.....	45
ANEXOS.....	49

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Nematodo EG1285 en estadio larvario L4.	10
Ilustración 2. Ciclo de vida <i>C. elegans</i>	11
Ilustración 3. Esquema del ciclo de vida a 22°C para <i>C. elegans</i> desde la fertilización hasta larva en estadio L1.	12
Ilustración 4. Sistema digestivo de <i>C. elegans</i>	14
Ilustración 5. Diferenciación entre macho y hermafrodita del nematodo <i>C. elegans</i>	15
Ilustración 6. Esquema del cordón de las neuronas GABAérgicas de <i>C. elegans</i>	15
Ilustración 7. Esquema de la conexión entre neuronas motoras y GABAérgicas en <i>C. elegans</i>	17
Ilustración 8. Diseño de plásmido para la cepa transgénica EG1285.	18
Ilustración 9. Ubicación geográfica Barrio San Benito.	18
Ilustración 10. Observación microscópica de estadios larvarios cepa EG1285.	29
Ilustración 11. Observación microscópica de estadios larvarios cepa N2.	29
Ilustración 12. Observación microscópica de estadios larvarios cepa EG1285.	30
Ilustración 13. Vista lateral de Larva en estadio L4 de <i>C. elegans</i> en microscopio de fluorescencia.	30
Ilustración 14. Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de <i>C. elegans</i> , ensayo de Supervivencia	32
Ilustración 15. Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de <i>C. elegans</i> , ensayo de motilidad.	33
Ilustración 16. Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de <i>C. elegans</i> , ensayo de reproducción.	34
Ilustración 17. Curva de dosis respuesta para la cepa EG1285 sometida a tratamiento en diversas diluciones.	35
Ilustración 18. Ensayo de Supervivencia en cepa de <i>C. elegans</i> EG1285 en tratamiento dato expresado en porcentaje.	36
Ilustración 19. Ensayo de movilidad en cepa de <i>C. elegans</i> EG1285 en tratamiento.	37
Ilustración 20. Ensayo de reproducción en la cepa de <i>C. elegans</i> EG1285 en tratamiento.	38
Ilustración 21. Neuronas GABAérgicas marcadas con GFP en larva L4 de <i>C. elegans</i>	39
Ilustración 22. Cuantificación de la fluorescencia.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de documentos que involucran estatutos y reglamentos acerca de contaminantes en aguas residuales y sus vertimientos.	21
Tabla 2. Resultados de campo obtenidos en el muestreo puntual.....	34
Tabla 3. Valor obtenido de la concentración de Cromo.	40

RESUMEN

La actividad manufacturera en Colombia representa una de las mayores fuentes de ingreso, dentro de estas las curtiembres hacen uso de metales pesados y sustancias químicas contaminantes con efectos nocivos para la salud. Las afecciones que causan los metales pesados son de interés en salud pública; además, no se conoce el nivel toxicológico del agua residual proveniente de las curtiembres, Los desechos provenientes de esta actividad son vertidos al Río Tunjuelito que desemboca en el río Bogotá, fuente de abastecimiento indirecta para las poblaciones ribereñas que las utilizan como regadío en cultivos y medio de hidratación de especies animales.

Estudiar los efectos de estos desechos en el modelo biológico *Caenorhabditis elegans*, permite hacer asociaciones entre la exposición a componentes tóxicos y los efectos de este sobre el nematodo. La cepa transgénica EG1285 de *C elegans* permite la visualización microscópica de las neuronas GABAérgicas e inferir el posible daño neuronal. En este proyecto se evaluó las características fenotípicas y fisiológicas entre la cepa salvaje N2 y EG1285, encontrando que no hubo diferencias significativas.

La cepa EG1285 se evaluó con agua recolectada del Río Tunjuelito a la altura de las curtiembres, la muestra no generó dosis letal para la cepa por lo cual los nematodos fueron colocados al contacto directo con el agua para evaluar el daño neuronal con ensayos de letalidad, motilidad, supervivencia y reproducción. Se encontró diferencia estadística entre las cepas con y sin tratamiento. Finalmente se determinó la presencia de Cromo encontrando niveles permitidos en este tipo de agua de 0,024mg/L.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, neuronas GABAérgicas, curtiembres.

INTRODUCCIÓN

C. elegans como modelo biológico de estudio ha permitido lograr grandes avances en áreas de investigación como ingeniería genética, ambiental, medicina, biotecnología, entre otras; esto gracias a la modificación genética de los individuos para posterior expresión de proteínas específicas y un gen reportero que permite evidenciar la presencia de las mismas, su fácil manejo en un microambiente generado en el laboratorio, mantenimiento económico, ciclo de vida corto y características fisiológicas apreciables.

Dentro de las ramas de investigación en las que es usado el nematodo se encuentra la toxicología, con la realización de bioensayos que permitan medir la respuesta biológica y efecto del agente a evaluar, esto bajo condiciones experimentales específicas y controladas(1). En esta área es donde cobra importancia el uso del nematodo para nuestro caso, ya que la contaminación de los recursos hídricos es una situación que se ve en aumento, haciéndose necesario la evaluación de estos contaminantes sobre modelos biológicos que permitan establecer la afección o no sobre el ecosistema.

La contaminación por metales pesados se ha convertido en objeto de estudio, ya que cada vez es más frecuente la intoxicación de seres vivos por estos; el incremento de la población y el consumismo aumenta la demanda de productos hechos a base de cuero, y por ende el procesamiento de la materia prima en la que se hace uso de metales en el procesamiento de los cueros. La exposición de *C. elegans* a diversas concentraciones de metales pesados en estudios pasados revelaron que efectivamente se genera daño en las características fisiológicas para la cepa salvaje del modelo, sin embargo no existe asociación entre este efecto y la posible afección neuronal que quizá se encuentre directamente afectada. Por tal motivo se decidió someter el nematodo de la cepa EG1285 de *C. elegans* a una muestra de agua del Río Tunjuelito a la altura de las curtiembres con el fin de evaluar su efecto sobre las características fisiológicas y neuronas GABAérgicas del modelo.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

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

1.2 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.

2. ANTECEDENTES

Los bioensayos de toxicidad en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) se describieron como pruebas reales para evaluar el deterioro de los ecosistemas por Williams et al en 1990; con las cuales se obtienen resultados confiables acerca de la afectación de la estructura y función de los mismos, junto con las consecuencias que presentan los seres vivos que interactúan en el ambiente. Para determinar dicha afectación se hace uso de invertebrados que proporcionan gran cantidad de información toxicológica. Para calcular la utilidad de *C. elegans* en el estudio de la ecotoxicidad acuática, los autores analizaron 14 sales de metales solubles en agua con alta incidencia producto de los residuos industriales, con el objetivo de determinar la Dosis Letal 50 (DL50) y establecer una base de datos toxicológicos para cada metal y compararlos con documentos de la EPA(2). En 1996 se determinó que metales como mercurio, plomo, cobre, zinc y cadmio pueden inducir una respuesta de estrés liderado por el aumento de β -galactosida, enzima informadora de estrés. Para detectar el aumento de la misma se puede hacer uso de métodos colorimétricos y pruebas histoquímicas que aumentan la sensibilidad de los bioensayos en comparación con las pruebas de letalidad(3).

En 1998 se generaron los primeros gráficos de control de laboratorio en cuanto a pruebas de toxicidad en cuerpos acuáticos haciendo uso del nematodo, los resultados se obtuvieron tras la realización de pruebas de letalidad durante 24 y 48 horas, además se restringe el alimento para el grupo de las 24 horas. Los resultados obtenidos determinaron la sensibilidad, reproducibilidad y credibilidad del organismo para evaluación toxicológica, por otra parte se estandarizó el procedimiento para realizar este tipo de pruebas toxicológicas de 24h y 48h con *C. elegans*(4). El siguiente paso para evaluar las afecciones que puede presentar el nematodo tras la exposición al tóxico se determinó en 1999 con Dhawan et al quienes le dieron un nuevo enfoque a la investigación ecotoxicológica en *C. elegans*, calculando y comparando la supervivencia, reproducción y comportamiento del mismo; con los resultados obtenidos se pudo precisar que la reproducción y comportamiento son indicadores de toxicidad mucho más sensibles que la letalidad(5).

Este nuevo mecanismo de análisis dio la posibilidad de establecer nuevos ensayos entre los cuales Gary et al en 2002, destacaron crecimiento, alimentación, reproducción y movimiento. Los resultados demuestran que la ingesta de tóxicos vía oral desencadena patologías asociadas al tubo digestivo, que provocan la pérdida del apetito por parte del nematodo y como consecuencia de ello se sugiere la alteración de las pruebas conductuales elegidas para este estudio(6). Teniendo en cuenta los nuevos puntos finales de toxicidad en 2004 se evaluó el comportamiento locomotor del nematodo enfrentado a tres clases de químicos: pesticidas orgánicos, solventes orgánicos y metales pesados; la reducción del movimiento se vio afectada o no dependiendo el químico y concentración de exposición. Según las observaciones correspondientes a la reducción del movimiento en el 50% de la muestra, se determinó que los químicos que reducen el indicador con mayor efectividad eran aquellos considerados como neurotóxicos: levamisol, mebendazol, etanol, acetona y metales pesados(7).

En 2004 Bautista(8) describe la problemática medioambiental de las curtiembres ubicadas en el corredor Villapinzón-Chocontá, debido a que están ubicadas 12 kilómetros después del nacimiento del Río Bogotá, convirtiéndose en el primer foco de contaminación; también se presentan las posibles soluciones para resolver la problemática. Para este año el principal problema data de la obtención de cueros poco tecnificados y artesanalmente producidos, sin tener en cuenta el daño ambiental que se genera, por ejemplo, durante los procesos químicos no hay control de dosificación y/o pesaje de insumos así como el vertimiento de residuos son arrojados al Río Bogotá, afectando el cuerpo de agua en un 20.6%, las aguas subterráneas 11.6% y el aire un 12%. En vista de los resultados de contaminación se generan estrategias de planeación que tratan de mitigar dicho impacto y organizar el gremio para obtener la legalización del trabajo, los permisos ambientales como consecuencia de la instalación de una planta única de tratamiento de aguas mixtas para todo el sector y el establecimiento del Parque Industrial donde se cumplan con la utilización de los Sistemas de Gestión Ambiental Industrial y las normas ISO 14000.

En 2008 se establecieron nuevos puntos finales por Harada et al en los que se incluyen alteración de ultraestructuras, inducción de la proteína del estrés y cambio en la longitud corporal; además de esto se evaluaron los efectos crónicos o a largo plazo de exposición en cuanto a reproducción y crecimiento, ya que los organismos en los ecosistemas mantienen un contacto prolongado o

permanente con los tóxicos, los cuales pueden ingresar por medio de la alimentación(9). Luego de que Williams et al, determinarán que agentes como el mercurio y plomo inducen una respuesta en el nematodo consecuente a la toxicidad Du M et al(10), en 2009 corroboró el daño provocado mediante el seguimiento conductual, poniendo de manifiesto un comportamiento locomotor anormal conocido como encogimiento, lo cual sugiere la afección directa de las neuronas GABAérgicas, ya que son las encargadas de la sinapsis relacionada con estímulos de movimiento; esto se evidenció con la pérdida de la continuidad axonal visible gracias a la proteína verde fluorescente.

El estudio de las células neuronales GABAérgicas y DAérgicas (DA) expuestas a agroquímicos da una visión de los efectos que tienen los pesticidas sobre patologías como la enfermedad de Parkinson, asociada a la degeneración de neuronas dopaminérgicas (DA), existen otras líneas neuronales ligadas a los síntomas motores como son las neuronas que expresan ácido y-aminobutírico. Para evaluar el nivel de neurodegeneración de los nematodos Negga et al. en el 2012(11). sometieron las cepas BZ555 y EG1285 a concentraciones de pesticidas comercialmente recomendadas, mediante la proteína verde fluorescente presente en cada una de las cepas se observó el impacto del tóxico sobre las neuronas manifestándose la disminución del número de píxeles al observar los nematodos pos tratamiento en el microscopio de fluorescencia; esto se puede atribuir al daño causado directamente a la mitocondria o a la susceptibilidad de la células ante la exposición de metales pesados presentes en los compuestos químicos.

En 2014 Monteiro et al(12), emplean un ensayo de comportamiento que hasta el momento no había sido descrito, basado en la alimentación como la característica principal a tener en cuenta, con el fin de determinar la capacidad de orientación del nematodo a partir de la quimiotaxis a causa de la producción de compuestos volátiles por parte de la bacteria *Escherichia coli* OP50 principal fuente de alimentación, se sugiere que estos productos químicos se pueden generar, ya que los metales intervienen como cofactores de muchas enzimas y podrían desenlazar efectos indirectos en el modelo. Posteriormente el estudio de futuras generaciones toma gran importancia a la hora de analizar las repercusiones que pueda tener la exposición temprana a herbicidas ya que aumenta las probabilidades de desarrollar enfermedades neurodegenerativas; la

causa común entre estas es la inhibición parcial o total del funcionamiento mitocondrial que inevitablemente va a ser expresado por los descendientes.

Esta asociación la demostró McVey et al(13), en el 2016 con las cepas EG1285 y NW1229 de *Caenorhabditis elegans* de las cuales se tuvo en cuenta su ciclo reproductivo, para lo cual, los nematodos se sometieron a dosis conocidas de herbicidas con glifosato y al finalizar la postura de huevos se observó una disminución en el linaje y función motora normal, razón por la cual se valoró el sistema neuronal con la ayuda de microscopía electrónica donde se obtuvo disminución de los megapíxeles de las neuronas marcadas con GFP en comparación con los controles. Se concluyó que la exposición en edades tempranas a tóxicos altera el desarrollo de las neuronas asociadas a la contracción muscular que permiten la postura de huevos.

El estudio realizado por Tejada et al(14) publicado en el año 2016, determinó componentes tóxicos en los sedimentos del río Magdalena tomando muestras a lo largo de su caudal comprendido entre los departamentos de Huila y Atlántico, cuyos hallazgos fueron Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (HAPs) y metales pesados (MPs) los cuales poseen características que le atribuyen la capacidad de desarrollar procesos tóxicos, mutagénicos o cancerígenos, razón por la cual son considerados un problema para las especies silvestres y la salud pública en general. El nematodo *C. elegans* usado como modelo biológico fue sometido a las sustancias químicas encontradas con el fin de evaluar la afección locomotora y neurológica a causa de estos tóxicos mediante ensayos tradicionales.

En el país, la industria de las curtiembres para el año 2016 se concentra en el municipio de Villapinzón Cundinamarca y en Bogotá específicamente en el sector de San Benito, el área de interés del estudio se basa en la cabecera municipal de Villapinzón correspondiente a la cuenca alta del río y primera zona donde se ubican las curtiembres; analizándose los residuos líquidos bajo el marco referencial del Decreto 475 sobre los requisitos de la calidad de agua potable, Decreto 1594 sobre la calidad del agua de vertimiento a nivel nacional y algunos valores sobre la calidad de agua de vertimiento en el Distrito Capital consignados en la Resolución 55 del

DAMA Corredor(15) se basa para concluir en las que los efluentes de las industrias superan los límites establecidos y presentan variaciones entre los valores mínimos y máximos permitidos. Los desechos de las curtiembres se han convertido en un problema ambiental de gran importancia debido a que sus componentes no tienen la capacidad de biodegradarse, además presentan un alto grado de toxicidad que puede afectar en cualquier nivel trófico desde su incorporación en el ecosistema. Uno de estos tóxicos es el Cromo en estado de oxidación VI con capacidad directa de ingresar a las células, reducirse en el interior de estas a nivel de núcleo y mitocondrias provocando así efectos cancerígenos y no cancerígenos. Según Téllez et al(16) este se considera un problema de salud con repercusiones en las personas y organismos que estén en contacto con el metal, por lo tanto es necesario desarrollar programas de prevención, control y seguimiento basados en investigaciones previas.

Ensayos de toxicidad como el realizado por García y sus colaboradores en el año 2018 donde usando la cepa salvaje N2 de *C. elegans* y compuestos químicos empleados para la producción de desinfectantes como bisfenol, propilparabeno y triclosán, evaluaron el efecto de estos a diversas concentraciones sobre características como crecimiento, letalidad y reproducción de los nematodos. Esto realizado con ensayos tradicionales que permitieron determinar que cada compuesto generaba afecciones a escala variable en comparación con los otros, y que los daños ocasionados llegaban hasta alterar el proceso relacionado con la replicación, transcripción y traducción del material genético. Adicionalmente observaron un aspecto físico anormal que evidenciaba aumento del tamaño a los costados de los nematodos, lo cual se atribuyó a la acumulación de lípidos provenientes de los compuestos en estudio.(17)

C. elegans ha sido implementado como organismo para ensayos de ecotoxicidad gracias al surgimiento de problemáticas ambientales, en el año 2019 Meng y cols. decidieron emplear material particulado de 2.5 proveniente del medio ambiente para estimar el efecto de este sobre el nematodo de la cepa N2. Los ensayos realizados en este estudio para determinar la afección sobre características fisiológicas fueron letalidad, reproducción, longevidad, locomoción y crecimiento, de lo cual se obtuvo que los nematodos empleados en el ensayo sufrieron afecciones directamente relacionadas con la concentración de exposición, sin embargo la el valor de 2.5 PM no supera los límites establecidos para el lugar de muestreo. Como sugerencia está evaluar las

concentraciones de material particulado límites ya que en a concentraciones menores desencadenó perjuicio sobre la cepa, por lo tanto se esperaría que fuera con mayor severidad.(18)

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans es un nematodo pequeño y de vida libre propuesto en 1963 por Sydney Brenne al Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica (LMB), desde entonces usado como modelo biológico para comprender el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema nervioso. Tiene un ciclo de vida rápido, aproximadamente 3 días a 25 °C desde el huevo hasta el adulto que pone huevos y existe principalmente como un hermafrodita autofecundado; aunque los machos se encuentran con una frecuencia <0.2%, debido a que posee un número determinado e invariable de células somáticas ha sido posible esquematizar por completo su linaje celular y realizar los denominados mapas de cableado más completos de cualquier sistema nervioso. (19)



Ilustración 1. Nematodo EG1285 en estadio larvario L4. Observación en microscopio, con objetivo de 40X. Tomada por Autoras.

3.2 Ciclo de vida.

Al igual que otros nematodos *C. elegans* tiene un ciclo de vida conformado por un estadio embrionario, cuatro estadios larvarios y uno de adulto; al final de cada estadio larvario se renueva la cutícula y el nematodo entra en un periodo letárgico. Luego de llegar a adulto los hermafroditas comienzan la postura de huevos por aproximadamente 2 a 3 días hasta utilizar

todos sus espermatozoides; tras finalizar su periodo reproductivo los nematodos pueden vivir varios días previos a su muerte a causa de senescencia.

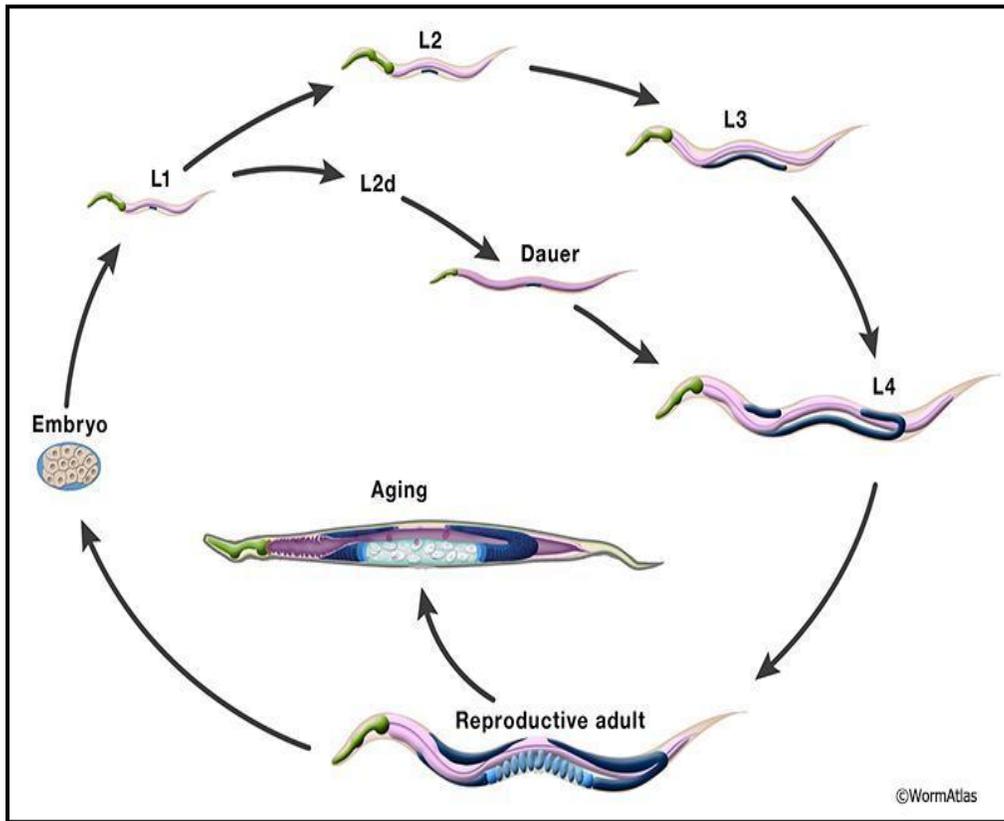


Ilustración 2. Ciclo de vida *C. elegans*. Tomado de *Caenorhabditis elegans* life cycle. Disponible en <https://www.imagenesmi.com/im%C3%A1genes/caenorhabditis-elegans-life-cycle-3b.html>

El estadio embrionario está dividido en dos estadios: inicialmente la proliferación celular y luego la organogénesis. La proliferación incluye la división celular de líneas celulares; a su vez este estadio se encuentra subdividido en dos fases: la primera fase se desarrolla entre los 0 a 250 minutos y comprende la formación del cigoto generado por la fecundación de las células embrionarias y la segunda fase se da entre el minuto 150 y 350 donde se lleva a cabo la división celular y la gastrulación para dar inicio a la organogénesis, pasados 430 minutos del primer clivaje celular se hacen visibles los primeros músculos, se da el dimorfismo sexual a los 510 minutos se hace visible y entre los 760 y 800 minutos los movimientos coordinados del nematodo al interior del huevo indican avance del desarrollo del sistema motor que finaliza con la eclosión del huevo.

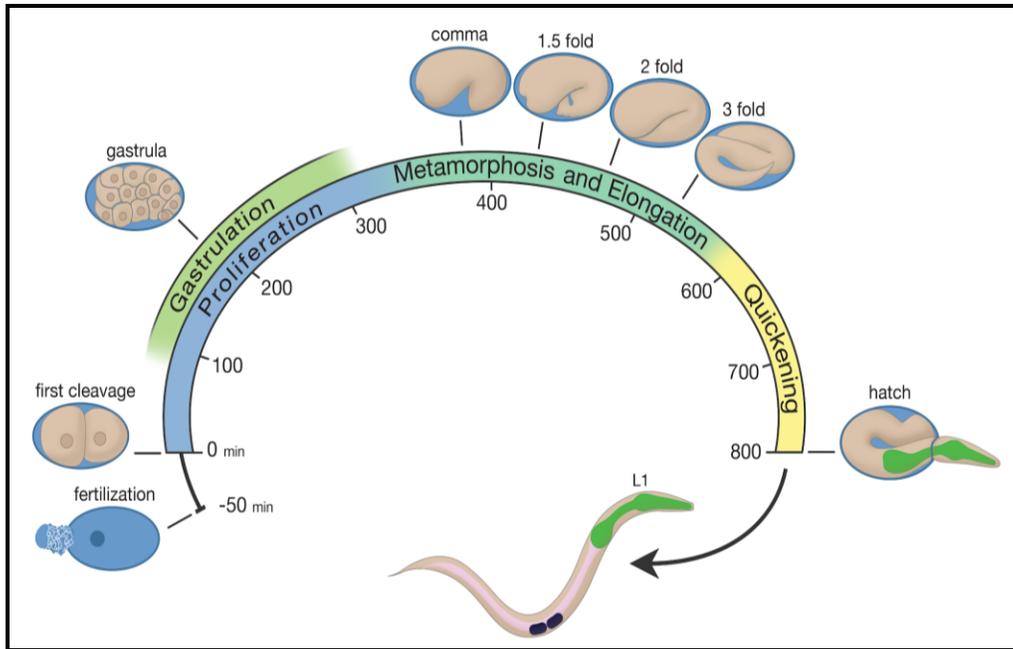


Ilustración 3. Esquema del ciclo de vida a 22°C para *C. elegans* desde la fertilización hasta larva en estadio L1. Tomado de Worm atlas. Disponible en: <http://www.wormatlas.org/embryo/introduction/Images/embryointrofig3leg.htm>

Posterior a la eclosión del huevo el nematodo comienza alimentarse hasta convertirse en L1 lo cual se evidencia mediante el desarrollo motor normal, durante esta etapa se da la formación del sistema nervioso, conformado por ocho clase de neuronas motoras ubicadas en el cordón ventral del hermafrodita adulto; las células somáticas que conforman las gónadas continúan dividiéndose desde L1 hasta llegar a adulto logrando la diferenciación sexual.

Durante este estadio larvario la división celular es menor, se destaca la distribución organizacional celular de las futuras gónadas hacia la parte posterior y anterior del cuerpo del animal y las células somáticas se logran ubicar hacia la parte central.

En condiciones desfavorables para el nematodo se da origen a una larva conocida como estado Dauer, la cual es una etapa adicional en la que el ciclo de vida se ve tergiversado por motivos relacionados con baja disponibilidad de nutrientes, presencia de feromonas o altas temperaturas. Morfológicamente hablando la larva dauer es muy delgada y tiene una cutícula bastante abultada por lo tanto alterada.

Durante L3, se producen la espermateca y el útero conformados por un total de 143 células somáticas de los precursores de gónadas, La extensión de los brazos de la gónada continúa en direcciones opuestas hasta mediados de L3 cuando las células de la punta distal se detienen y luego lentamente comienzan a reorientarse en direcciones dorsal. La gónada somática destina precursores de Vulval se especifican y las células comprometidas se dividen para generar células terminales vulvares a principios de L4. Los dos mioblastos sexuales, formados en L3, se dividen para generar 16 células musculares sexuales.

En este estadio L4 o adulto, la producción de esperma se detiene y las células de la línea germinal restantes continúan experimentando meiosis y diferenciación para generar exclusivamente ovocitos en su lugar. La generación de células Vulval y células terminales uterinas es seguida por morfogénesis tisular. Las neuronas ponedoras de huevos y los músculos sexuales, generados a partir de mioblastos sexuales, se asocian con estas estructuras para formar el aparato de puesta de huevos.

El ciclo de vida termina cuando el nematodo da origen a una nueva progenie, la hermafrodita adulta es capaz de generar más o menos 300 ovocitos durante unos 3 o 4 días, cuando la reproducción se da de manera sexual el número de descendientes puede aumentar entre 1200 a 1400; después de este periodo el adulto vive por 10 o 15 días. La hermafrodita cuenta con 1090 células somáticas generadas durante el desarrollo de la misma, 131 entran en apoptosis en momentos característicos. Razón por la cual, la hermafrodita adulta tiene 959 núcleos somáticos, 302 de los cuales corresponden a neuronas y 95 a células de la pared corporal. El macho adulto, por otro lado, tiene 1031 núcleos somáticos y 381 de éstos son neuronas; aunque tiene más células, el macho adulto es más delgado que el hermafrodita y ligeramente más corto.(19)

3.3 Sistema digestivo

El alimento ingresa en la parte anterior de los animales y pasan a través de la faringe, una bomba de dos lóbulos que tritura la comida antes de que se transmita al intestino para iniciar el proceso de digestión. El estudio del desarrollo faríngeo ha sido un modelo para la organogénesis, incluida

la forma en que se producen la morfogénesis epitelial y la especificación del destino celular durante el desarrollo.

El intestino de *C. elegans* está unido a la faringe posterior y consta de 20 células epiteliales poliploides grandes dispuestas en pares que forman un tubo que corre a lo largo del animal. *C. elegans* ha servido como modelo para estudiar la infección y la respuesta a la infección por diferentes patógenos bacterianos, microsporidios y virus que colonizan el sistema digestivo.(19)

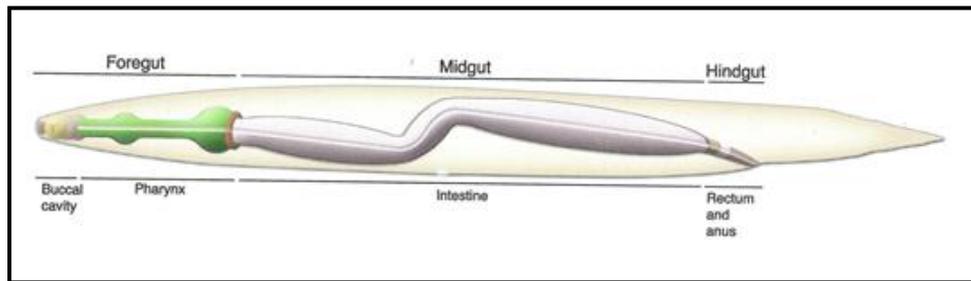


Ilustración 4. Sistema digestivo de C. elegans. Se presenta el trayecto del intestino del nematodo a lo largo de su cuerpo, dividido en intestino primario, medio y final.

3.4 Sistema reproductor

El nematodo *C. elegans* en sus dos sexos macho y hermafrodita, muestran varias diferencias anatómicas en las gónadas somáticas, estructuras sexuales secundarias, y el tamaño del cuerpo. La gónada somática se encuentra en el centro del cuerpo a lo largo del intestino. En los hermafroditas, la gónada consta de dos tubos en forma de U en forma de espejo; en los machos, la gónada consiste en un único lóbulo en forma de U. Ambas gónadas albergan la línea germinal donde se desarrollan los ovocitos y el esperma. La gónada somática y la línea germinal se desarrollan juntas durante las etapas larvales hasta que los animales alcanzan la madurez en la etapa de adulto joven.

Las estructuras de apareamiento sexual secundarias son la vulva en hermafroditas y la cola en forma de abanico en los machos. La vulva se desarrolla en el centro de la epidermis en el lado ventral de la hermafrodita y es el conducto para la entrada de esperma del macho y la colocación de óvulos del útero(19).

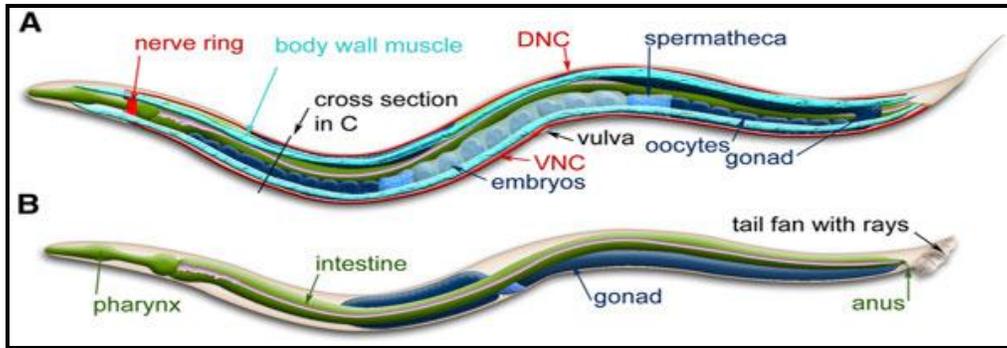


Ilustración 5. Diferenciación entre macho y hermafrodita del nematodo *C. elegans*. Tomado de Wormbook. Disponible en http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html

3.5 Sistema nervioso.

El sistema nervioso de *C. elegans* se compone de 302 neuronas dispuestas en varios ganglios en la cabeza, cola y en un cordón nervioso ventral similar a la médula espinal. Aunque muchas neuronas de *C. elegans* parecen simples en un modelo animal superior, no obstante, la mayoría de las neuronas son maravillosos centros que procesan información y muestran patrones complejos de cableado a otras neuronas, además expresan un número elevado de moléculas de señalización, es decir, neurotransmisores y sus receptores. Así mismo es profundo en función y variado en tipos de células.(20)

3.5.1 Neuronas GABAérgicas.

Las sinapsis más abundantes en el sistema nervioso central de los vertebrados son los mecanismos inhibidores que usan el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA). De igual manera es un importante neurotransmisor en *C. elegans*; sin embargo, en contraste con los vertebrados, donde GABA actúa en las sinapsis del sistema nervioso central, en los nematodos, GABA actúa principalmente en las sinapsis neuromusculares. Específicamente, GABA actúa para relajar los músculos del cuerpo durante la locomoción y la alimentación y para contraer los músculos entéricos durante la defecación.(20)

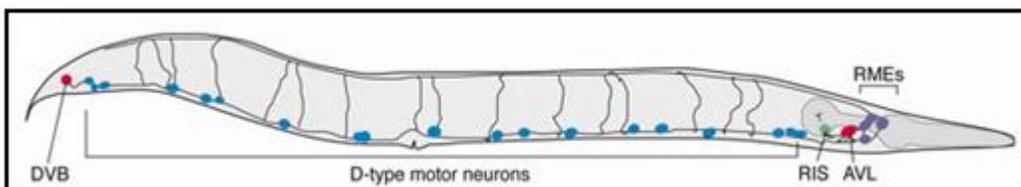


Ilustración 6. Esquema del cordón de las neuronas GABAérgicas de *C. elegans*. Tomada de wormbook. Disponible en http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html.

Tipos de neuronas sobre las que actúa el receptor GABA.

Neurona motora RME: Los RME parecen limitar la extensión de la deflexión de la cabeza durante la alimentación. Los RME reciben información de las neuronas sensoriales de la cabeza y la nariz. Los RME envían señales a los músculos contralaterales de la cabeza. Es posible que la flexión de la cabeza durante la alimentación active los receptores de estiramiento en las neuronas SMB y SAA, que luego activan una neurona RME, la cual a su vez relaja los músculos en el lado opuesto de la curva y restaura la postura de la cabeza.

Neuronas motoras AVL/DEV: Estimulan la contracción de los músculos entéricos durante la defecación, este movimiento comprime el intestino y abre el ano para expulsar el contenido intestinal, se requiere GABA liberado de las neuronas AVL y DVB para inducir la contracción.(20)

3.5.2 Receptores de GABA

Receptores GABA_a: Se ha demostrado que el neurotransmisor GABA ejerce un efecto inhibitorio sobre los músculos del cuerpo al abrir los canales de cloruro, dicha acción se atribuye al receptor GABA_a, un canal de cloruro activado por GABA. Existen dos tipos de inhibición, en primer lugar la hiperpolarizante en la cual los iones cloruro se bombean fuera de la célula; por lo tanto, la activación de los receptores GABA permitirá que el cloruro se difunda dentro de la célula, hiperpolarice la membrana y disminuya la excitabilidad de la célula, por otro lado está la inhibición despolarizante; en algunas células, el cloruro interno está en concentraciones más altas que el potencial de equilibrio. En estos casos, la apertura de los canales de cloruro provoca un flujo de salida de este anión, creando una corriente hacia adentro y despolarizando la membrana.

Receptores GABA_b: GABA también puede inhibir la excitabilidad de la membrana al abrir los canales de K⁺ e inhibir los canales de Ca. Estas acciones están mediadas por el receptor GABA_B, un receptor transmembrana de 7 pasos. La unión de GABA al receptor GABA_B activa la proteína G trimérica Gi, la subunidad G activada puede inhibir los canales de Ca activados por voltaje o activar los canales de K⁺.(20)

3.5.3 Función Locomotora

Está dada en términos de la inhibición del cordón ventral y producto de ello la contracción de los músculos de la pared del cuerpo ventral durante la locomoción; una flexión en el cuerpo se realiza al contraer los músculos de un lado mientras los del costado opuesto se relajan mediante la inervación del neurotransmisor. Por lo tanto, la liberación del neurotransmisor GABA es primordial para relajar los músculos, recobrar la postura cuando se cambian las direcciones y proporcionar una forma de onda sinusoidal al desplazarse¹². Las neuronas DD y VD GABA (azul) hacen sinapsis con los músculos del cuerpo dorsal y ventral. Las neuronas motoras colinérgicas (rojas) envían entradas a los músculos del cuerpo ventral y dorsal, así como a las neuronas motoras GABA. La liberación de acetilcolina conduce a la contracción del músculo de la pared del cuerpo en un lado y estimula la liberación de GABA en los músculos en el lado opuesto. Esta estimulación y la inhibición contralateral hacen que el cuerpo se doble y conduzca a una locomoción coordinada.(20)

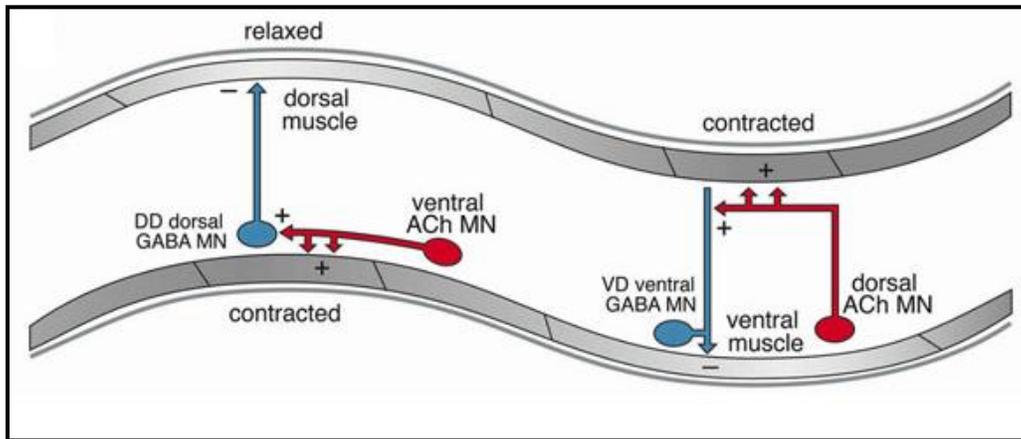


Ilustración 7. Esquema de la conexión entre neuronas motoras y GABAérgicas en C. elegans. Tomada y adaptada de Worm book. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html

3.6 Cepa transgénica EG1285

La fácil manipulación genética del nematodo *C. elegans* permite crear cepas transgénicas como la EG1285 que es desarrollada mediante biobalística; técnica gracias a la cual es posible introducir genes exógenos a cualquier célula o tejido vegetal. En este proceso el ADN ingresa a la célula diana por la acción de microproyectiles recubiertos con el material genético de interés, estos a su vez acelerados a velocidades supersónicas sin causar daño al tejido celular. Los

microproyectiles son esferas microscópicas (aproximadamente 0,4 a 2,0 micrómetros de diámetro) de oro o tungsteno.

Adicionalmente los dispositivos empleados para esta técnica hacen uso de macroproyectiles como medio para acelerar los microproyectiles, los primeros pueden ser de diversas formas como cilindros, balas o discos y son impulsados por un choque de gas derivado de una reacción química que proporciona la fuerza necesaria para generar el desplazamiento de los proyectiles(21).

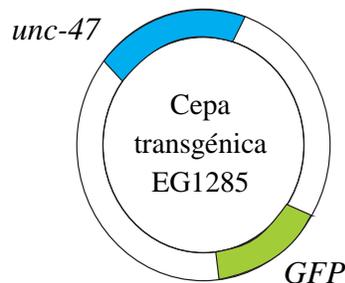


Ilustración 8. Diseño de plásmido para la cepa transgénica EG1285. Elaborado por autoras

3.7 Curtiembres de San Benito

San Benito se encuentra ubicado en el extremo sur-occidental de la Localidad de Tunjuelito y está limitado por el sur con el Barrio Tunjuelo; por el oriente limita con el barrio San Benito; por el occidente con la Localidad de Ciudad Bolívar, sirviendo como límite el Río Tunjuelito; y por el Norte con el Parque Metropolitano El Tunal(22).

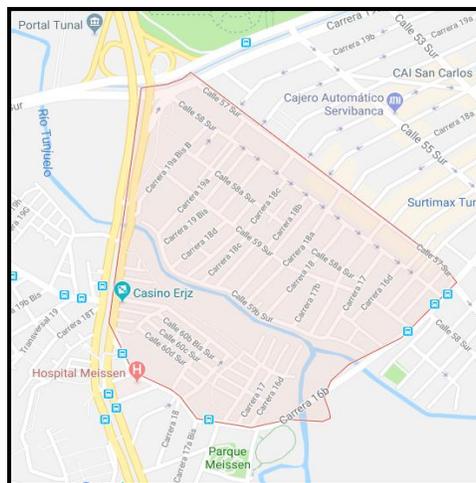


Ilustración 9. Ubicación geográfica Barrio San Benito. Tomado de: Adaptado de Google Earth. Disponible en: <https://www.google.com/maps/>

Teniendo conocimiento de la ubicación geográfica se analizan variables demográficas que permiten determinar el alto nivel poblacional existente en la zona, por lo tanto, la demanda económica para satisfacer las necesidades de los habitantes es elevada; razón por la que buscar fuentes de ingreso que afecten o no el medio ambiente no es una prioridad. Es casi imposible que un país afectado por problemas sociales tan graves como la indiferencia, la violencia, el secuestro y la corrupción en el órgano ejecutivo, asuma la responsabilidad de preservar la calidad del medio ambiente. Un reflejo de esta situación es que, ante la ineficiencia en la formulación y ejecución de programas de prevención y control de la contaminación hídrica, ésta se ha incrementado en ríos como el Bogotá, Cali, Magdalena y Combeima, entre otros(23).

La industria curtiembre en el barrio San Benito se asocia a los años 1951 y 1952 con la ubicación de unas pocas curtiembres en la orilla norte del Río Tunjuelito cuando aún el sector era agrícola. Hacia el año 1978 se habló de la consolidación como barrio y como sector urbano de la ciudad. Al inicio de los años sesenta se encontraban localizados aproximadamente unos cincuenta y seis curtidores. Esta situación propició la consolidación del barrio con uso mixto. La combinación vivienda-industria generó características urbano-ambientales complejas(22).

En el país, la principal fuente de extracción de materia prima se centra en el ganado bovino, del cual se obtiene la piel y el cuero empleado en el proceso productivo de las industrias curtiembres. El objetivo de estas industrias es desarrollar un procedimiento adecuado sobre las pieles mediante el uso de sustancias como el ácido fórmico y el cromo, que modifican su aspecto físico-químico para finalmente transformarlas en productos aptos para la comercialización. Es durante este proceso de transformación que emergen residuos contaminantes que desembocan directamente en el río Bogotá, deteriorando la calidad de vida de las personas que laboran o residen allí e impactando nocivamente el medio ambiente y el entorno.

El proceso con mayor producción de residuos es el de ribera, seguido por el de curtido y, por último, se disminuye la concentración residual durante el proceso de terminado. El componente físico de los residuos de las curtiembres genera efectos negativos sobre los recursos hídricos, disminuyendo la presencia de oxígeno disuelto, aumentando la salinidad y repercutiendo con mayor profundidad sobre las aguas subterráneas, ya que estas carecen de aireación(23).

En Colombia, la principal fuente de contaminación hídrica es la evacuación directa de aguas residuales, ya sea proveniente de las residencias, fábricas, minas y demás actores contaminantes. Las sustancias más peligrosas provienen de los residuos tóxicos, reactivos, inflamables y combustibles que produce la minería, la industria manufacturera, y la industria del procesamiento del petróleo, la industria química y la industria de curtiembres(23).

3.8 Calidad del agua del río Tunjuelito

Al río Tunjuelito se le atribuye gran importancia dado que es el río más grande que atraviesa la ciudad y gracias al cual fue posible abastecer el primer acueducto de los bogotanos, pese a estas características gran parte de la población se fue asentando en la zona aumentando la urbanización y a su vez el número de industrias. La producción descontrolada de las curtiembres y la demanda económica por parte de los habitantes de Tunjuelito aceleró los procesos de contaminación del río; en la actualidad su cuenca urbana de drenaje es la más pobre en infraestructura sanitaria, razón por la cual su cauce recibe las aguas negras de la totalidad de los barrios ubicados en su vertiente sur, entre Usme y Bosa, y de la mayor parte de los barrios de las localidades de San Cristóbal, Usme y Ciudad Bolívar, ya sea por vertimiento directo o a través de las quebradas que drenan. Cabe precisar que las industrias generan vertimientos directos ya que las aguas residuales son recolectadas por la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá y descargados en el Río Tunjuelito a la altura de la Calle 48B Sur con Carrera 77J(24).

Desde los años 50 se habla de la implementación de cromo como insumo principal en la industria del curtido de pieles, es una actividad que se realiza continuamente en la capital del país, aunque existe una legislación que determina la cantidad de estos vertimientos. En su mayoría esta industria utiliza sales de cromo y otros compuestos químicos que generan efluentes líquidos muy tóxicos, que deberían ser removidos por ciertas técnicas a cargo de los productores y no ser dirigirse a la cuenca de los ríos. En la localidad de Tunjuelito, se encuentra el 90% de las curtiembres de la ciudad de Bogotá, representadas en más de 350 empresas que realizan diferentes pasos del procesamiento para la fabricación del cuero, también se evidenció que no solamente está expuesta la población que labora en dichos establecimientos, sino la que vive alrededor, a lo que se le suman los problemas ambientales tras los vertimientos al río(25).

3.9 Normatividad

Con el paso del tiempo y el aumento de la problemática ambiental se han establecido diversos lineamientos que se encuentran relacionados con los parámetros que deben tener los vertimientos de aguas residuales a fuentes hídricas naturales. En ellos se involucran aspectos físicos, químicos y biológicos que pueden afectar el medio ambiente, adicionalmente existen documentos que establecen los límites permisibles para la presencia de sustancias tóxicas como los metales pesados en aguas residuales y sus vertimientos.

Tabla 1. Relación de documentos que involucran estatutos y reglamentos acerca de contaminantes en aguas residuales y sus vertimientos.

Decreto 2811 de 1974	En este se establecieron los parámetros normativos, que datan desde donde se establece que se debe garantizar la calidad del recurso hídrico ejerciendo control al análisis físico, químico y biológico(26).
Ley 9 de 1979	Se dictan las disposiciones legales y reglamentarias para lograr la sanidad del territorio nacional, la preservación y conservación del medio ambiente para así lograr el bienestar en la calidad de vida y mejorar la salud de los colombianos en todos los aspectos(27).
Decreto 1594 de 1984	Se definieron los aspectos referentes a la gestión del recurso hídrico en el país, se establecieron por primera vez, y de manera conjunta entre los Ministerios de Agricultura y Salud, los límites máximos permisibles de vertimientos al sistema de alcantarillado de 155 sustancias de interés sanitario(28).
Resolución 1074 de 1997	Establece que quien vierta a la red de

	alcantarillado y/o cuerpo de agua localizado en su área, deberá registrar sus vertimientos y se establecieron unas concentraciones máximas permisibles de 33 diferentes parámetros(29).
Resoluciones 3956 y 3957 de 2009	Se reitera que solo se permite realizar vertimientos al alcantarillado público a las empresas que cumplan con las siguientes condiciones: a) Viertan aguas residuales domesticas b) Viertan aguas residuales no domésticas y se haya determinado que no requieren permiso de vertimientos y c) Viertan aguas residuales y cuenten con permiso de vertimientos vigente(30,31).
Resolución 631 de 2015	En esta resolución se contemplaron 56 parámetros y 73 actividades para 8 sectores productivos. 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(32).

4. METODOLOGÍA

Diseño experimental:

Enfoque de la investigación: Mixto (Análisis cualitativo y cuantitativo de los datos)

Tipo de Investigación: Experimental

Población: *Caenorhabditis elegans*

Muestra: *Caenorhabditis elegans* cepa EG1285

Técnica de recolección de datos: Observación directa

Ensayos de fenotipo

Hipótesis: El agua proveniente del río Tunjuelito a la altura de las curtiembres causa neurodegeneración en la cepa transgénica EG1285 de *C. elegans* y por lo tanto alteración motora.

Metodología general

Durante el desarrollo de esta investigación se realizaron ensayos experimentales con el nematodo *C. elegans* cepa EG1285, con el fin de recolectar información sobre el comportamiento del mismo tras ser sometido a una muestra de agua residual; dicha muestra procedente del Río Tunjuelito producto de los desechos emitidos por las curtiembres; es importante destacar que estos residuos pasan por una planta de tratamiento para disminuir el nivel de contaminación. Obteniendo la muestra se procedió a la caracterización fenotípica y fisiológica de la cepa N2, EG1285 y EG1285 con tratamiento. Como control se tomaron nematodos de la cepa N2 y EG1285 en contacto con agua potable.

4.1 Recolección de la muestra de agua

El protocolo seguido para la recolección fue el establecido por el Instituto Geográfico Agustín Codazzi(33). Respecto a la toma de muestra esta se realizó puntual, ya que se quería ver el tratamiento de la planta sobre el agua residual producto de la actividad industrial y se realizó en el efluente de la planta de tratamiento, obteniendo resultados de campo de pH, conductividad y temperatura de la muestra. La muestra se preservó con Ácido Nítrico un mililitro por cada litro

de muestra con el fin de conservar las condiciones originales de la muestra hasta el transporte al laboratorio.

4.2 Preparación del medio NGM y mantenimiento de la cepa

Procedimiento para 500 mL de agar: en un Erlenmeyer de 500 mL se adicionaron 250 mL de agua destilada y 1,5 gramos de NaCl en constante agitación y calor. Luego se añadió 8,5 gramos de agar y 1,25 gramos de peptona. Se agregaron 300 mL más de agua destilada. Se procedió a autoclavar. Posterior a este proceso se sumergió el Erlenmeyer en agua fría para disminuir su temperatura y poder enriquecer el medio con 0,5 mL de CaCl_2 1M, 0,5 mL de colesterol en etanol, 0,5 mL de MgSO_2 1M y 12,5 mL de Buffer K_3PO_4 1M. (108,3 g KH_2PO_4 , 35,6 g K_2HPO_4 en 1L de H_2O). Finalmente el medio fue servido en placas de Petri aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes. Para el mantenimiento de la cepa se hicieron pases por sacabocado y con un pick de Aluminio para cultivar los nemátodos a un medio NGM con un césped de *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento para los nematodos(34).

4.3 Fenotipificación de la cepa EG1285 de *C. elegans*

La caracterización de la cepa EG1285 se realizó gracias a nematodos sincronizados para someterlos a ensayos de supervivencia, motilidad y reproducción por triplicado, que permitieron determinar el perfil fenotípico característico de la cepa, con el fin de poder hacer comparaciones a futuro entre la cepa N2 y la cepa objeto de estudio.

Sincronización de nematodos mediante solución de blanqueamiento

Para llevar a cabo la fenotipificación es necesario tomar nematodos en un mismo estadio larvario con el fin de mitigar las interferencias relacionadas con el tiempo de vida, razón por la cual se usa una solución de blanqueamiento que contiene hipoclorito al 5.0%; concentración ideal en la que las larvas son destruidas y los huevos resisten gracias a la composición de su membrana.

El procedimiento consistió en lavar cajas de nematodos con buffer tampón M9 traspasando el resultado de los lavados a tubos falcon para centrifugar a 2500 rpm durante 3.0 minutos, repitiendo esto 3 veces más y eliminando el sobrenadante producto de cada centrifugación. Se agregaron 2.0 mL de la solución de blanqueamiento y se pone en agitación con vortex durante 8 minutos siendo interrumpido este proceso cada 2 minutos con el fin de mantener los huevos

haciendo uso de pilas de gel frío. El producto de la agitación fue centrifugado a 3500 rpm durante 5.0 minutos, dicho proceso se repitió 3 veces corroborando entre cada una de ellas la no existencia de larvas. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 9.0 mL de M9 para detener la reacción generada previamente, finalmente se centrifugó el tubo falcon a 2500 rpm durante 3.0 minutos y se descartó el sobrenadante, el producto se resuspendió y se puso en medio NGM/OP50(35). Los ensayos seleccionados para realizar la caracterización fenotípica se describen a continuación:

Supervivencia: En placas de Petri NGM/OP50 nematodos sincronizados en estadio larvario L1 se cultivaron por 6 días aproximadamente hasta alcanzar el estadio L4. Luego se transfirieron 15 nematodos a una nueva placa. Cada día se pasaban a otra caja y a partir del octavo día se hacía cada dos días para evitar la mezcla entre generaciones y poder realizar el conteo de larvas vivas. Para determinar la viabilidad se realizó un estímulo con el asa y dependiendo de la respuesta observada por parte del nematodo se estableció el criterio de vivo o muerto. Los ensayos se realizan por triplicado. Este ensayo permite relacionar la edad y la muerte de las larvas y así tener un dato acertado sobre la supervivencia del nematodo con el fin de hacer comparaciones.

Motilidad: Para evaluar la capacidad locomotora del nematodo se tuvo en cuenta el número de ondulaciones realizadas en treinta segundos por parte del nematodo. Quince nematodos sincronizados en estadio larvario L1 se cultivaron en medio NGM/OP50 hasta alcanzar el estadio L4. Posteriormente se pasaron una a una las larvas a otra caja de petri y durante 30 segundos se contó el número de movimientos sinusoidales (cambio de dirección teniendo como punto de referencia la cabeza) realizados por el nematodo. La unidad empleada para expresar los resultados fue Hertz, la cual permite relacionar movimientos repetitivos en un periodo de tiempo determinado. Los ensayos se realizan por triplicado.

Reproducción: Nematodos sincronizados en estadio larvario L1 se cultivaron en medio NGM/OP50 hasta alcanzar el estadio L4. Cinco larvas de estas se transfirieron a una caja de petri con medio NGM/OP50 (una por cada caja) y cada día se repetía el pase de la larva a otra caja hasta que su ciclo de vida finaliza por completo y esta estuviera muerta. Con el fin de determinar el número de larvas a las cuales da origen durante su ciclo de vida las cajas en las cuales estuvo

el nematodo se incubaron a 20°C y se realizó conteo de larvas días posteriores a la muerte de la larva madre. Los ensayos se realizan por triplicado.

4.4 Observación por microscopio de fluorescencia

La observación de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) en las neuronas GABA del nematodo se realizó mediante microscopio de fluorescencia, con el fin de cuantificar la intensidad de la misma. Los nematodos observados fueron ubicados en una lámina con una delgada capa de agarosa como césped e inmovilizados con levamisol. Tres nematodos en estadio L4 fueron evaluados para la caracterización fenotípica de la cepa EG1285. Adicionalmente el producto de la sincronización de la cepa EG1285 sin tratamiento se observó diez días después y al igual que la cepa de estudio la cual se mantuvo en contacto con el tratamiento durante el mismo periodo. Para la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia se tomaron fotografías de los nematodos observados y se evaluaron por el programa Image J mediante el cual los píxeles adquieren valor dando lugar a la cuantificación.

4.5 Análisis del agua del rio Tunjuelito

Se tomó una segunda muestra para determinar y cuantificar los niveles de cromo, esta se preservó con ácido nítrico concentrado un 1.0 por litro de muestra(36), que fue proporcionado en los recipientes otorgados por Hidrolab, se transportó al laboratorio en nevera de icopor con pilas de enfriamiento para mantener la cadena de refrigeración y conservar las características originales de la muestra de agua, esto en un tiempo menor a cuatro horas y con su respectiva cadena de custodia. Tras la recolección de la muestra se decidió denominar esta como el tratamiento para la realización de los ensayos; lo cual permitiría evaluar el efecto del agua sobre la cepa EG1285.

4.6 Análisis estadístico de los datos

Cada ensayo arrojó un grupo de datos provenientes de los tres triplicados. Las tres observaciones fueron sometidas a la determinación de una media con sus respectivas desviaciones estándar con intervalo de confianza del 95%. El valor de la media fue el valor graficado, esto mediante el programa GraphPad Prism Versión 8.0.

El análisis de los datos para el ensayo de motilidad y reproducción se realizó mediante la prueba T student. La prueba compara las medias de dos grupos poblacionales en una muestra inferior a 30 individuos entre grupos, muestra si las poblaciones son idénticas o no. Las curvas de supervivencia se estimaron para cada grupo, se consideran por separado, utilizando el método de Kaplan-Meier y se comparan estadísticamente mediante la prueba de log rank.

Para evaluar si los datos obtenidos son estadísticamente significativos se definió:

-Hipótesis nula: El tratamiento no tiene ningún efecto sobre la característica evaluada.

-Hipótesis alternativa: El tratamiento tiene efecto sobre la característica evaluada.

La hipótesis nula puede ser rechazada si el P value es menor al valor crítico siendo este 0.5.

5. RESULTADOS

Las cepas EG1285 y N2 se obtuvieron del *Caenorhabditis Genetics Center* de la Universidad de Minnesota en Estados Unidos, con el fin de evaluar el efecto del agua del río Tunjuelito a la altura de las curtiembres. Las dos cepas fueron alimentadas con *Escherichia coli OP50* y mantenidas en medio NGM. La cepa EG1285 fue sometida al tratamiento con agua para evaluar los ensayos de motilidad, supervivencia y reproducción.

5.1 Los estadios de la cepa N2 y EG1285 no presentan diferencias

La identificación de los estadios larvarios se realizó días después de la recepción de las cepas mediante visualización microscópica de cajas con abundante población. Los aspectos que se tuvieron en cuenta fueron tamaño, presencia de estructuras internas como sistema reproductor y velocidad en el movimiento.

El ciclo de vida de la cepa EG1285 duro aproximadamente 24 días a partir de la sincronización e inicia con la postura de huevos. El huevo presenta forma ovalada y es grande a la observación microscópica, dicha estructura da origen a la larva L1 la cual se identifica por su tamaño inferior a las demás y su rapidez al desplazarse. Con respecto a las larvas L2 y L3 los únicos criterios para la clasificación de estadio fueron el aumento de la longitud y disminución en la velocidad locomotora ya que no se evidencian estructuras internas completamente definidas y por lo tanto la diferenciación no es posible. En el estadio L4 se hizo evidente la presencia de una estructura que se asemeja al útero debido a su tamaño y posición anatómica, dispuesta entre dos zonas más oscuras que podrían tener lugar a las gónadas. (Ver ilustración 10)

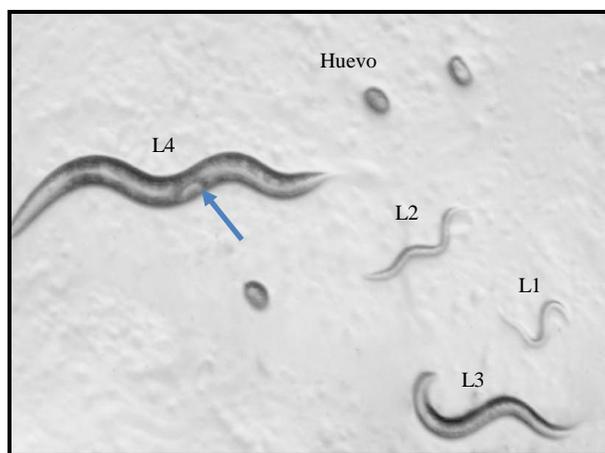


Ilustración 10. **Observación microscópica de estadios larvarios cepa EG1285.** Estadios larvarios desde huevo a L4, estadio en el cual se observa el útero señalado por la flecha ubicándose entre dos áreas más oscuras. Aumento de 10X. Tomada por autoras.

Al comparar los estadios larvarios más relevantes como huevo, L4 y adulto de la cepa EG1285 y la cepa silvestre N2 se pudo observar que: los huevos para ambas tienen forma ovalada, presentan un tamaño similar y se evidencian membranas que le confieren resistencia a condiciones adversas (Ver ilustración 11-12 imagen A). Por otro lado, en el estadio L4 se observan diferencias en cuanto a la morfología interna ya que en la cepa de estudio es más visible el útero y adicionalmente posee un tamaño similar con respecto a la cepa N2 (Ver ilustración 11-12 imagen B). En la larva adulta es notoria la aparición de huevos característica propia de este estadio, para las dos cepas estos se encuentran dispuestos de manera ordenada a lo largo del cuerpo del nematodo y en una proporción semejante de 6-7 huevos para EG1285 y N2 respectivamente (Ver ilustración 11-12 imagen C).

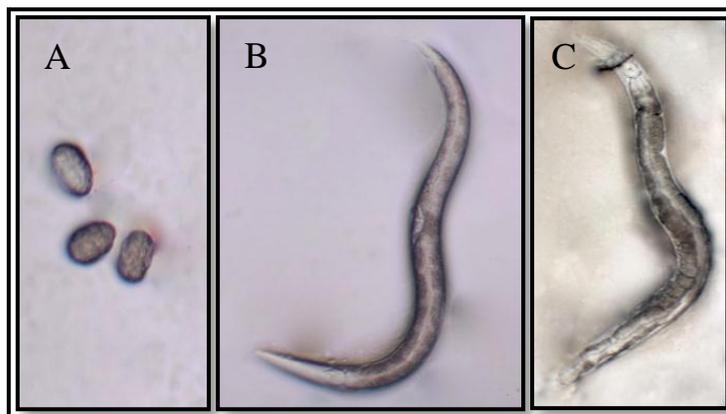


Ilustración 11. Observación microscópica de estadios larvarios cepa N2. (A) Huevos en aumento de 40X. (B) Estadio larvario correspondiente a L4 aumento 10x (C) Larva adulta con presencia de huevos en su interior aumento 10x.

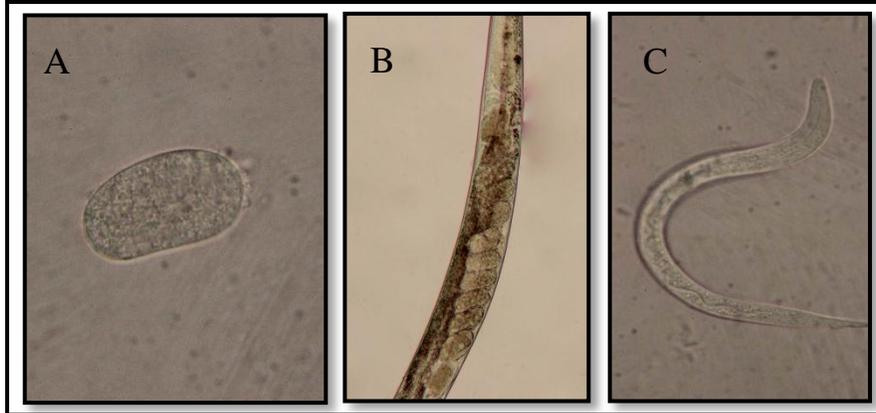


Ilustración 12. *Observación microscópica de estadios larvarios cepa EG1285. (A) Huevos en aumento de 10x. (B) Estadio larvario correspondiente a L4 aumento 10x. (C) Larva adulta con presencia de huevos en su interior aumento 10X. Fotografías tomadas por autoras.*

5.2 La cepa EG1285 expresa la proteína GFP en las neuronas GABA

La cepa EG1285 cuenta con la inclusión de un plásmido que permite la expresión de Proteína Verde Fluorescente (GFP) en los receptores de las neuronas GABAérgicas, para hacer posible su visualización y comprobar dicha inserción se observaron al microscopio nematodos en diferentes estadios larvarios, de lo cual se obtuvo que la intensidad de la fluorescencia expresada en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) correspondió a 16.969 UFR. Dicho resultado permite confirmar la expresión de GFP para hacer comparaciones entre la cepa al ser sometida a determinado tratamiento y la cepa en su condición original (Ver ilustración13).



Ilustración 13. *Vista lateral de Larva en estadio L4 de C. elegans en microscopio de fluorescencia. Neuronas GABAérgicas marcadas con GFP. Tomada por autoras.*

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

La caracterización fisiológica de la cepa N2 y EG1285 se realizó con los ensayos de supervivencia, motilidad y reproducción. Estos ensayos fueron realizados por triplicado y analizados estadísticamente con el programa de GraphPad Prism versión 8.0.

5.3.1 La supervivencia *C. elegans* no difiere entre la cepa EG1285 y N2

Para evaluar si la inclusión del plásmido con GFP en la cepa transgénica EG1285 tiene consecuencia en el tiempo de vida del nematodo se realizó el ensayo de supervivencia. Se tomaron 15 gusanos desde el estadio larvario L4 los cuales corresponden al 100% de la supervivencia que va disminuyendo con el paso del tiempo. Los 7 primeros días de desarrollo larvario no se tuvieron en cuenta debido a la compleja manipulación de las larvas en estadios primarios, por lo tanto, el día cero en la gráfica corresponde al primer día en el que las larvas alcanzan el estadio de adulto joven (L4).

En la cepa salvaje N2 se observó un promedio de supervivencia de 20 días y una disminución del porcentaje de supervivencia a partir del sexto día, que corresponde al 90% de la población que presentó un comportamiento descendiente, directamente proporcional al número de días transcurridos. Los nematodos de la cepa EG1285 se comportaron de manera similar obteniéndose como resultado disminución del porcentaje de supervivencia temprano con un 99.5% en el quinto día del ensayo, descenso de la longevidad directamente proporcional al paso del tiempo y un promedio de 19 días de vida; los resultados obtenidos no demuestran tener diferencia estadísticamente significativa ($p=0.6232$)(Ver ilustración 14).

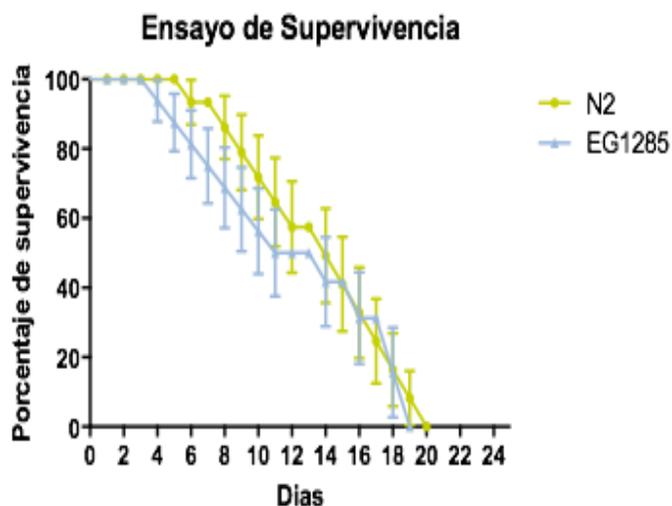


Ilustración 14. Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de *C. elegans*, ensayo de Supervivencia . Se muestra el resultado obtenido del ensayo realizado por triplicado con el fin de evaluar la posible diferencia existente entre las dos cepas respecto a la supervivencia, la cual es de 20 días para N2 y de 19 para la EG1285, diferencia que no representa una significancia estadística para el estudio ya que el valor de $p=0.6232$. Se realizó la prueba estadística Log-rank test mediante el programa GraphPad Prism versión 8.0.

5.3.2 La motilidad de *C. elegans* no difiere entre la cepa N2 y EG1285

Con el objetivo de evaluar la motilidad entre las cepas N2 y EG1285 se llevó a cabo la realización del conteo de ondas efectuadas por cada nematodo en 30 seg, en una población de diez individuos, teniendo en cuenta que las ondulaciones representan movimientos sinusoidales. El promedio en la cantidad de ondas efectuadas para el total de nematodos de la cepa N2 fue de 15.67 Hertz. El conteo de los diez nematodos de la cepa EG1285 consiguieron alcanzar un promedio de 15 Hertz. La diferencia de 0.67 Hertz (Ver anexo 3) entre las dos cepas, no reflejó una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.1365$), aun estando incorporada la GFP en la cepa EG1285 (Ver ilustración 15).

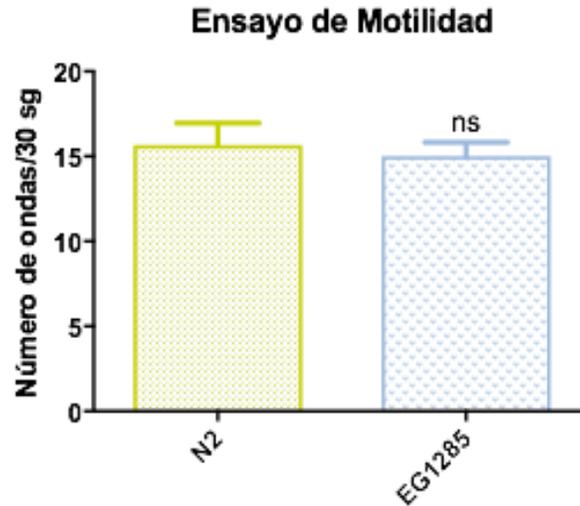


Ilustración 15. Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de *C. elegans*, ensayo de motilidad. Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a motilidad realizado por triplicado para evaluar la diferencia existente entre las cepas. Con promedio de los resultados equivalente a 15.67ondas/30seg para N2 y 15 ondas/30seg para EG1285. El valor de $p=0.1365$ demostró que no hay significancia estadística en la comparación. Se realizó la prueba T student con el programa GraphPad Prism versión 8.0.

5.3.3 La reproducción de *C. elegans* no difiere entre la cepa N2 y EG1285

El ensayo de reproducción se realizó por el recuento de larvas en estadios L1, L2 y L3 que se obtuvieron al final de la vida del nematodo, el conteo de larvas se realizó cada dos días a partir del primer día del ensayo; esto con el fin evitar la mezcla de las progenies. Observando que la cantidad de los nematodos de las cepas EG1285 y N2 al final de los conteos no diferían entre sí por lo tanto se determinó que no había significancia estadística para este ensayo. Respecto a la cepa EG1285 el promedio fue de 205 larvas durante su ciclo de vida y para la cepa N2 el número promedio de larvas obtenidas en el recuento fue 206. El valor de $p=0.6323$ permite establecer que no hay diferencia estadística significativa (Ver ilustración 16).

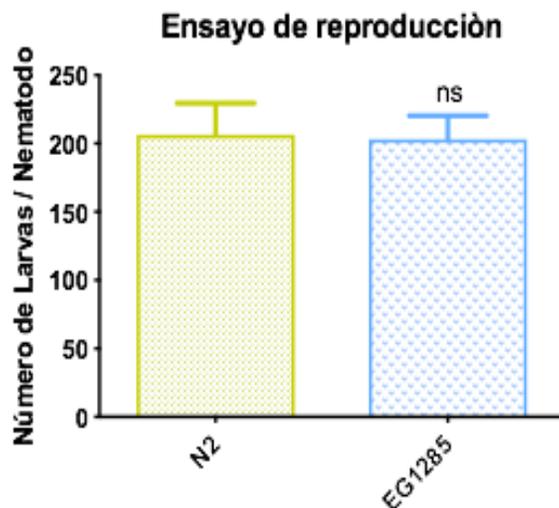


Ilustración 16. *Caracterización fisiológica de las cepas N2 y EG1285 de C. elegans, ensayo de reproducción.* Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a reproducción realizado por triplicado para evaluar la diferencia existente entre las cepas. Con promedio de los resultados equivalente a 206 larvas para N2 y 205 para EG1285. El valor de $p=0.6323$ demostró que no hay significancia estadística en la comparación. Se realizó la prueba T student con el programa GraphPad Prism versión 8.0.

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

La realización del ensayo de dosis respuesta se llevó a cabo para establecer si la muestra de agua en su condición original o diluida resultaba tóxica para el nematodo, este se realizó tomando una población total de 15 larvas en estadio L4. Se obtuvo como resultado que no existe dosis letal para las cuatro diluciones usadas (Ver tabla 2).

Tabla 2 Resultados de campo obtenidos en el muestreo puntual

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

El resultado de conductividad no se considera de relevancia ya que no genera interferencia en los ensayos a realizar, por el contrario el pH si se debe tener en cuenta ya que si es de carácter ácido o básico en sus picos máximos puede alterar el estudio, sin embargo se evidencia que el valor obtenido es cercano a pH neutro razón por la cual la muestra se puede usar sin que se generen inconvenientes a futuro.

En la gráfica se observa una tendencia de la cepa EG1285 a pesar de haber estado sometida a cuatro diluciones diferentes, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8. La realización del ensayo fue de 72 horas,

tiempo en el cual los nematodos consiguen desarrollar los cuatro estadios larvarios. Gracias a este resultado fue posible continuar el diseño experimental con la muestra original para estimar las características fisiológicas y el efecto del agua sobre el neurotransmisor GABA y la cepa EG1285 (Ver ilustración 17).

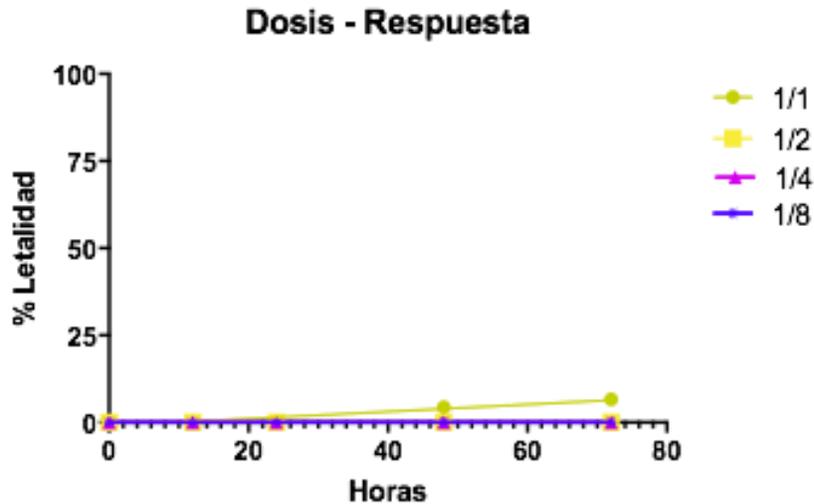


Ilustración 17. Curva de dosis respuesta para la cepa EG1285 sometida a tratamiento en diversas diluciones. Se muestra el resultado obtenido del ensayo realizado por triplicado con el fin de evaluar la respuesta de los nematodos sometidos a tratamiento para diluciones de 1/1, 1/2 1/4 y 1/8 respectivamente. Se realizó regresión lineal mediante el programa GraphPad Prism versión 8.0.

5.5 Efecto del agua sobre las características fisiológicas cepa EG1285

Con el fin de evaluar el efecto del agua proveniente del río Tunjuelito a la altura del barrio San Benito sobre las características fisiológicas de la cepa en estudio, los nematodos se expusieron a la muestra de agua sin diluir durante el desarrollo de ensayos correspondientes a supervivencia, motilidad y reproducción. Como control para los ensayos se usó la cepa EG1285 sin tratamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado y el análisis estadístico se realizó por medio del programa GraphPad Prism Versión 8.0.

5.5.1 La supervivencia de la cepa EG1285 varía con el tratamiento del agua del río Tunjuelito Después de sincronizada la cepa EG1285, quince larvas en estadio L4 fueron transferidas a una placa de Petri con medio NGM para ser sometidas a tratamiento con 1mL de agua; con lo que se determinó la supervivencia de los nematodos tratados. La cepa EG1285 sin tratamiento usada como control presentó una supervivencia de 19 días y una disminución en el porcentaje de

supervivencia a partir del día cinco, con un valor promedio de 95,6%, a partir de este punto se evidencia un comportamiento decreciente que hace notorio el final del ciclo de vida para algunas larvas usadas en el ensayo.

Los nematodos de la cepa EG1285 sometidos a tratamiento tuvieron un porcentaje de supervivencia inferior a la cepa control, con un valor promedio del 69%, a partir del día cinco igual que en la cepa sin tratamiento. Se observa que a pesar de que los nematodos de la cepa con y sin tratamiento comienzan a morir a partir del mismo día, la diferencia está dada en la cantidad de larvas por día y por lo tanto la esperanza de vida se va reduciendo en mayor proporción para la cepa con tratamiento (Ver anexo 1). El resultado obtenido se considera estadísticamente significativo con un valor de $p=0.0323$ (Ver ilustración 18).

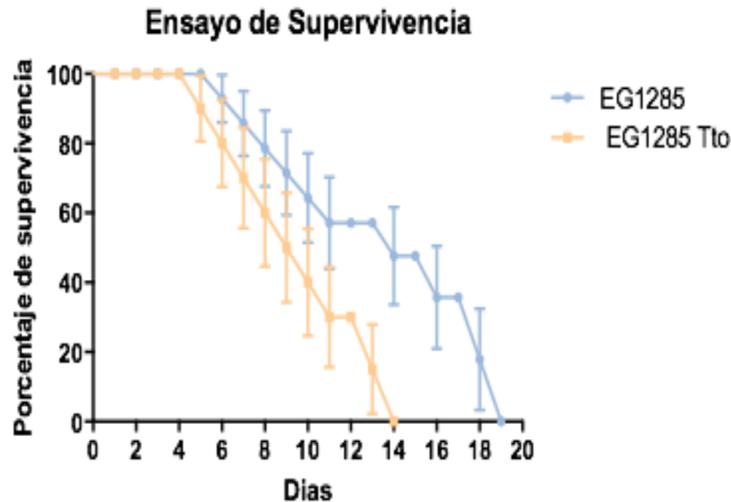


Ilustración 18. *Ensayo de Supervivencia en cepa de C elegans EG1285 en tratamiento dato expresado en porcentaje.* Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a supervivencia realizado por triplicado con el fin de evaluar la posible diferencia existente entre la cepa antes y después de ser tratada con agua del río Tunjuelito. Se realizó la prueba estadística Log-rank test mediante el programa GraphPad Prism versión 5. Valor de $P=0.0323$. Se rechaza la hipótesis nula.

5.5.2 La motilidad de la cepa EG1285 se afectó con el tratamiento del agua del río Tunjuelito Diez nematodos en estadio L4 provenientes del proceso de sincronización fueron transferidos a placas de Petri para ser sometidos a tratamiento con 1 mL de agua, pasados diez días de la exposición se realizó el conteo de las ondas efectuadas por cada nematodo en un periodo de 30 segundos, realizando el ensayo por triplicado. Se observó que la cepa control tenía una capacidad promedio de movimiento de 15 ondas/30seg.

El conteo para los diez nematodos de la cepa EG1285 sometidos a tratamiento fue un promedio de 9 Hertz. El valor de $p < 0.0001$ y una diferencia en la disminución de la característica fisiológica evaluada de 6 Hertz (Ver anexo 3), dicho valor permite evidenciar que existe significancia estadística en el resultado obtenido para este ensayo. Además de la disminución en el número de ondas efectuadas por la cepa EG1285 con tratamiento se observó una conducta inusual que puede describirse como un movimiento sin desplazamiento ya que las ondas las efectuaban en el mismo punto (Ver ilustración 19).

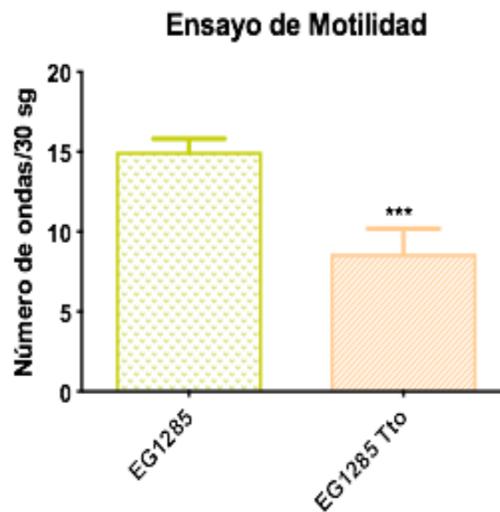


Ilustración 19. *Ensayo de movilidad en cepa de C elegans EG1285 en tratamiento.* Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a motilidad realizado por triplicado para evaluar la diferencia existente entre la cepa antes y después de ser tratada con agua del río Tunjuelito. Se realizó una prueba T student con el programa GraphPad Prism versión 8.0. Valor de $P=0.1368$. Se rechaza la hipótesis nula.

5.5.3 La tasa de reproducción de la cepa EG1285 disminuyó con el tratamiento del agua del río Tunjuelito

La evaluación que permite hacer el ensayo de reproducción acorde al número de larvas en estadio L1, L2 y L3 a las que puede dar origen una larva adulta sometida a 1 mL de agua y sin esta demostró que los nematodos de la cepa EG1285 mantenidos únicamente en medio NGM tenían mayor capacidad reproductiva que los nematodos tratados con agua. Dicho resultado se evidencia con que el promedio de larvas para cepa sin tratamiento fue de 209 nematodos, estando aproximadamente 33 larvas por debajo de la cepa EG1285 sin ser tratada, obteniendo esta última un valor promedio de 176. El valor de p para este ensayo fue de 0.0001 mostrando que existe una diferencia estadísticamente significativa (Ver ilustración 20).

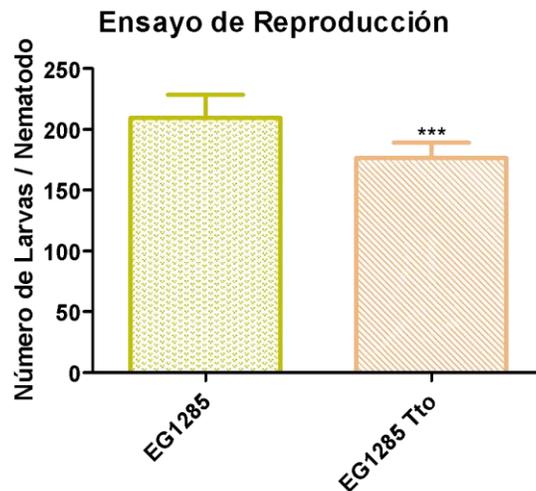


Ilustración 20. Ensayo de reproducción en la cepa de *C. elegans* EG1285 en tratamiento. Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a reproducción realizado por triplicado para evaluar la afección ocasionada por el agua sobre la cepa EG1285. Con promedio de los resultados equivalente a 209 larvas para EG1285 y 176 para EG1285 con tratamiento. El valor de $p=0.0001$ demostró que hay diferencias estadísticamente significativa en la comparación. Se realizó la prueba T student con el programa GraphPad Prism versión 8.0. Se rechaza la hipótesis nula.

5.6 Efecto del agua sobre las neuronas GABA

Finalmente, para determinar el efecto del agua del río Tunjuelito sobre las neuronas GABAérgicas de los nematodos de la cepa EG1285 se tomaron fotografías de la visualización en el microscopio de fluorescencia, gracias a esto es posible analizar la intensidad de la misma mediante su cuantificación expresada en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) en el programa Image J.

La cepa sometida a tratamiento demuestra cualitativamente una disminución en la intensidad de la fluorescencia observada relacionada con la disminución del gen reporte del neurotransmisor GABA (Ver ilustración 21B), en comparación con la cepa sometida a tratamiento en la cual se logra observar con bastante claridad, las moto neuronas del cordón ventral, aquellas que inervan los músculos de la cabeza y músculos entéricos. (Ver Ilustración 21A)

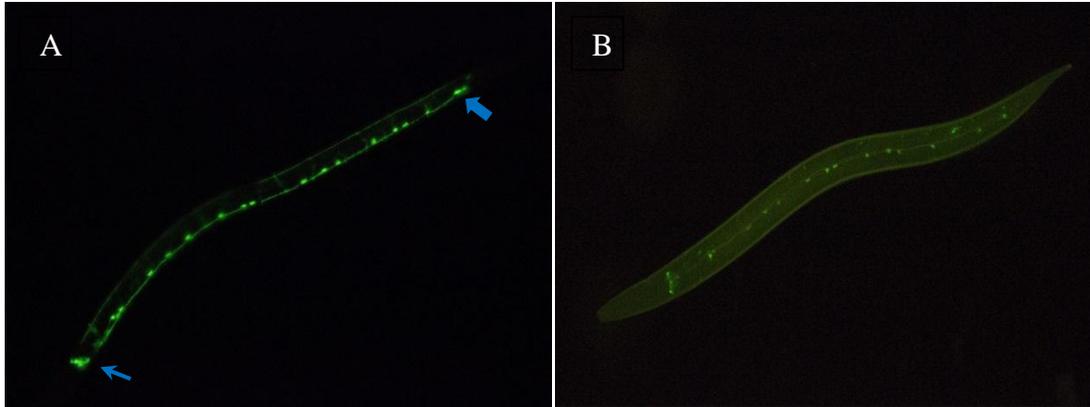


Ilustración 21. Neuronas GABAérgicas marcadas con GFP en larva L4 de *C. elegans*. A. Vista lateral de un nematodo de la cepa control EG1285. B. Vista superior de un nematodo de la cepa EG1285 sometido a tratamiento. Tomada por autoras

Para evaluar de manera directa la afección de las neuronas GABAérgicas se cuantificó la fluorescencia, determinando de esta manera la disminución real y numérica de URF de la cepa con tratamiento versus la cepa control. La cuantificación de la fluorescencia relativa demostró que las unidades para la cepa EG1285 sometida a tratamiento disminuyeron de manera significativa respecto a las unidades cuantificadas para las larvas del grupo control, obteniendo una diferencia de 7600 URF. Los promedios de la cuantificación se muestran en la Ilustración y corresponden a 10.775 URF para el grupo y 3.175 para el grupo en estudio (Ver ilustración 22).

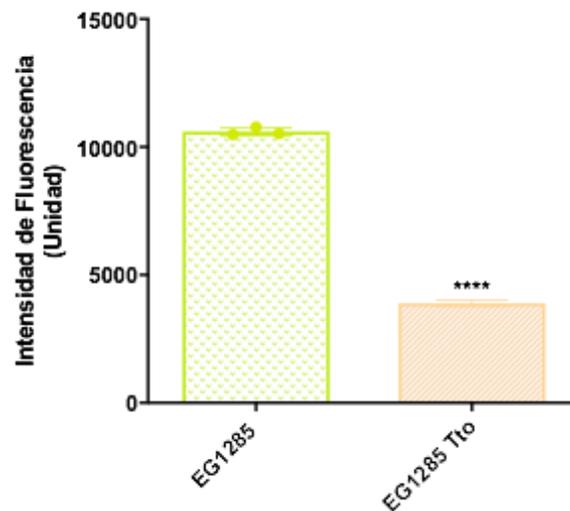


Ilustración 22. Cuantificación de la fluorescencia. Se muestra el resultado obtenido del ensayo correspondiente a fluorescencia para evaluar la afección ocasionada por el agua sobre las neuronas GABAérgicas de la cepa EG1285. Con promedio de los resultados equivalente a 10.775 URF para la cepa control y 3.175 URF para la cepa tratada.

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

Obtenidos los resultados de la caracterización fisiológica para la cepa EG1285 sometida a tratamiento se decidió analizar la muestra de agua empleada en el estudio con el fin de determinar la presencia de Cromo y su cuantificación.

La muestra de agua recolectada en el sector de San Benito se remitió al laboratorio Hidrolab para analizar, de ello se obtuvo que la muestra contenía traza de Cromo en concentraciones de 0.024 mg/L (Ver anexo 4); las cuales no superan los límites permitidos según lo establecido en la resolución 631 de 2015 (Ver tabla 3).

Tabla 3 Valor obtenido de la concentración de Cromo. Se muestra el resultado de la muestra de agua correspondiendo la al efluente del río. .

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

6. DISCUSIÓN

C. elegans ha sido destacado como modelo biológico desde 1974 cuando Brenner describió a profundidad su fácil manejo en el laboratorio gracias a que posee propiedades accesibles de mantenimiento y alimentación, adicionalmente la homología genética con el ser humano lo convierte en un atractivo para la investigación(37). Desde hace aproximadamente treinta años se ha empleado en ensayos de toxicidad para evaluar el efecto de pesticidas Du y cols. para el año 2012(10), Harada y cols en el 2007 realiza bioensayos con exposición a metales(9), el análisis de sedimentos se presentó por Tejada y cols. a partir de muestras del río Magdalena(14), entre otros, esto con el fin de evaluar los efectos generados por tóxicos sobre características tales como supervivencia, reproducción y motilidad(38).

Respecto a los ensayos realizados para la caracterización de la cepa EG1285 aún no se evidencia reporte en la literatura, sin embargo al ser un modelo transgénico se infiere que su comportamiento para ensayos de supervivencia, reproducción y motilidad son similares a la cepa salvaje. Según el estudio realizado por Parada y cols. en el año 2017 donde caracterizaron fenotípicamente la cepa N2 los resultados coinciden con los obtenidos en este estudio para las cepas N2 y EG1285, por lo cual se sugiere que la cepa transgénica no sufre ninguna afección relacionada con la inserción del plásmido que expresa la GFP y respecto a sus características fisiológicas difiere de la cepa N2 en proporciones mínimas que no se consideran significativas(39).

El agua del río Tunjuelito a la altura de las curtiembres se caracteriza por contener diversos materiales productos de desecho de la actividad industrial, entre ellos se encuentran la presencia de metales pesados, elemento esencial para la transformación de cuero animal en textil(15). Por tal motivo en este estudio se evaluó el efecto que tiene el agua de las curtiembres de San Benito sobre las características fisiológicas y neuronas GABAérgicas de la cepa transgénica EG1285 de *C. elegans*. De esto se obtuvo que existen alteraciones y disminución sobre el tiempo de supervivencia, motilidad y reproducción del nematodo, sugiriendo que esta afección se da por el Cromo presente en la muestra de agua recolectada.

La presencia de trazas de Cromo en agua del Río Tunjuelito se considera un riesgo para la salud humana y animal. *C. elegans* permite realizar bioensayos de toxicidad y al ser un nematodo con homología en el ser humano da la posibilidad de asociar los resultados obtenidos con las afecciones que puede generar en personas que tengan contacto con este metal, como lo es el personal que trabaja en el proceso de curtido. Según la Oficina de Evaluación de Riesgos para la Salud Ambiental el Cromo genera repercusiones en la salud de tipo dérmico, respiratorio y digestivo, generando este último disminución en la capacidad reproductiva. Por lo tanto el contacto bien sea de manera directa o indirecta con este metal produce daños sobre la salud humana, lo cual se vuelve tema de interés particular en este estudio(40).

El ensayo de letalidad desarrollado con los nematodos sometidos a cuatro diluciones de agua del río Tunjuelito 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 hizo posible determinar que ninguna dilución era completamente tóxica para un número significativo de nematodos, teniendo en cuenta que la cuantificación de Cromo para la muestra fue de 0.024 mg/L y se omitió el análisis de otros componentes. Por el contrario, los hallazgos de Williams y cols. en 1990 en cuanto a la Dosis Letal 50 (DL50) usando muestras de agua contaminada con metales pesados difieren de los presentados en este estudio, con un resultado de muerte para la mitad de la población a las 96 horas y una concentración de 0.06 mg/L de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$), por lo cual se sugiere que la presencia singular del metal es el causante directo de la muerte para los nematodos y que la concentración de metales pesados es directamente proporcional a la disminución en el porcentaje de la población(2).

La supervivencia de los nematodos de la cepa EG1285 tratados con la muestra de agua sufrieron una disminución de cinco días en relación con la cepa control, lo cual concuerda con el estudio desarrollado por Shen y cols. en el año 2009, donde se obtuvo como resultado que hubo aumento en el porcentaje de animales muertos con el paso del tiempo, y una duración total de 10 días(41).

En el 2009 Xing y cols comparó la locomoción de los nematodos en todos los estadios larvarios expuestos a diferentes concentraciones de cromo, ellos evidenciaron que las larvas en estadio L4 presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto al control al finalizar el período de exposición al metal. Dicho resultado coincide con el obtenido en nuestro estudio para

la evaluación de las larvas L4, sometidas a diferentes diluciones de agua en el cual también se dio la afección locomotora para este estadio. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el tiempo de exposición empleado por Zing y cols. fue de 24 horas y en nuestro caso fue de 10 días, por lo cual se sugiere que la alteración es directamente proporcional al tiempo de exposición al agua(38).

En el ensayo de reproducción la cepa EG1285 con tratamiento arrojó como resultado que disminuye el número de larvas a las que da origen un adulto hasta el final de su ciclo reproductivo, con un valor promedio de 176 larvas. Esto se puede relacionar con los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo por Harada y cols. en 2007 para evaluar la capacidad reproductiva de los nematodos de la cepa silvestre expuestos a metales como el CdCl₂ y CuSO₄, evidenciando la disminución en el número de la progenie dependiente de la concentración de metal a la que fueron sometidos. Acorde con lo anteriormente dicho se infiere que a mayor concentración de metal usado el número de larvas es menor (9).

Los resultados encontrados en esta investigación permiten sugerir que el agua del Río Tunjuelito a la altura de las curtiembres de San Benito causa afección en la supervivencia, motilidad y reproducción del nematodo *C.elegans* ya que los resultados arrojados durante el desarrollo de los ensayos evidenciaron disminución estadísticamente significativa en comparación con la cepa control. Sin embargo cabe destacar que a pesar de que el Cr se encontró en niveles inferiores a los permitidos desencadena daño y perjuicio en la salud del nematodo *C. elegans*, por lo tanto se sugiere realizar ensayos de toxicidad en modelos más desarrollados que brinden mayor orientación acerca de esta problemática involucrando un mayor número de componentes presentes en el agua.

7. 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

1. Tobergte DR, Curtis S. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. *J Chem Inf Model.* 2013;53(9):1689–99.
2. Williams L, Dusenbery DB. AQUATIC TOXICITY TESTING USING THE NEMATODE *CAENORHABDITIS ELEGANS* Environmental Protection Agency @ PA) has pub-. Society. 1990;9:1285–90.
3. Peter E, Candido M, Jones D. Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *Trends Biotechnol.* 1996;14(4):125–9.
4. Little EE, Greenberg BM, DeLonay AJ, ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate., *Environmental Toxicology and Risk Assessment* (7h : 1997 : St. Louis M. *Environmental toxicology and risk assessment. seventh volume.* ASTM; 1998. 418 p.
5. 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.
6. 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.
7. Anderson GL, Cole RD, Williams PL. Assessing behavioral toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem.* 2004;23(5):1235–40.
8. Bautista R. JJ. Las curtiembres del corredor Villapinzón- Chocontá y el Río Bogotá. *Rev Fac Ciencias Económicas Investig y Reflexión.* 2004;12(2):36–45.
9. 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.
10. 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.
11. 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. *Neurotox Res.* 2012;21(3):281–90.
12. Monteiro L, Brinke M, dos Santos G, Traunspurger W, Moens T. Effects of heavy metals on free-living nematodes: A multifaceted approach using growth, reproduction and behavioural assays. *Eur J Soil Biol.* 2014;62:1–7.
 13. McVey KA, Snapp IB, Johnson MB, Negga R, Pressley AS, Fitsanakis VA. Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicol Teratol.* 2016;55:23–31.
 14. Tejada L, Jesus O. Perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando como modelo biológico. 1st ed. Universidad Internacional de Andalucía, editor. España; 2016.
 15. Luis J, Rivera C. El Residuo Líquido De Las Curtiembres Estudio De Caso : Cuenca Alta Del Río Bogotá the Liquid Remainder of the Tanneries Case Study : High River Basin of the Bogota River. 2006;16(2):14–28.
 16. Téllez J, Carvajal M, Gaitán AM. Toxicología del Cromo. *Fac Med.* 2004;52(1ii):50.
 17. García-Espiñeira MC, Tejada-Benítez LP, Olivero-Verbel J. Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on caenorhabditis elegans. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(4).
 18. Chung M-C, Tsai M-H, Que DE, Bongo SJ, Hsu W-L, Tayo LL, et al. Fine Particulate Matter-induced Toxic Effects in an Animal Model of Caenorhabditis elegans. *Aerosol Air Qual Res.* 2019;19(5):1068–78.
 19. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics.* 2015;200(2):387–407.
 20. Davies JA. Gaba. *xPharm Compr Pharmacol Ref.* 2011;1:1–2.
 21. Vicente M, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España). Avances en ingeniería genética. Impresores. Matilde Hernandez, editor. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1994.
 22. Bedoya Contreras JF. Modelo De Simulación De Transporte De Metales Pesados En La Cuenca Baja Del Rio Tunjuelo ” John Fabricio Bedoya Contreras Facultad De Ingeniería Ambiental Y Sanitaria. Universidad de la Salle; 2007.
 23. Alberto AL, Sara MM, Johanna MC. Las Industrias Curtiembres Y Su Incidencia En La Contaminación Del Río Bogotá. *Isocuanta.* 2008;1(1).

24. Osorio JA. La historia del agua en Bogotá: una exploración bibliográfica sobre la cuenca del río Tunjuelo. *Mem y Soc.* 2008;12(25):107–16.
25. GONZÁLEZ SEE. CITOTOXICIDAD POR CROMO EN ENCÉFALO, MÉDULA ESPINAL, TUBO DIGESTIVO, RIÑÓN E HÍGADO DE *Betta splendens* SEGÚN CONCENTRACIÓN DETERMINADA EN LA CUENCA BAJA DEL RÍO TUNJUELO (SECTOR CURTIEMBRES), BOGOTÁ D.C., COLOMBIA. Vol. 3, *IOSR Journal of Economics and Finance*. Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2016.
26. Presidencia de la Republica. Leyes desde 1992 - Vigencia expresa y control de constitucionalidad [DECRETO_2811_1974]. DECRETO 2811 DE 1974 1975.
27. Ley 9 de 1979. Ley 9 de 1979. 1979 p. 82.
28. Ministerio de medio ambiente y desarrollo sostenible. Decreto 1594 DE 1984 Usos del agua y residuos líquidos. Colombia; 1984.
29. Eduardo Uribe Botero. Resolución 1074 de 1997. Bogotá; 1997.
30. Juan Antonio Nieto Escalante. Resolución 3956 de 2009. Bogotá; 2009.
31. Oscar Lopez. Resolución 3957 de 2009. Bogotá; 2009.
32. Resolución 631 de 2015. Colombia ; 2015.
33. Fernández E. Muestreo de suelos. *Analab.* 2002;1–4.
34. Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *J Vis Exp.* 2012;(64):1–9.
35. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook.* 2006;(1999):1–11.
36. IDEAM. Toma De Muestras De Aguas Residuales Instructivo Para La Toma De Muestras De Aguas Residuales. 2010.
37. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* [Internet]. 1974;77(May):71–94. Available from: <http://www.genetics.org/content/genetics/77/1/71.full.pdf>
38. Xing X, Guo Y, Wang D. Using the larvae nematode *Caenorhabditis elegans* to evaluate neurobehavioral toxicity to metallic salts. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2009;72(7):1819–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.06.006>
39. Parada Ferro LK, Gualteros Bustos AV, Sánchez Mora RM. Phenotypic characterization of the N2 strain of *Caenorhabditis elegans* as a model in neurodegenerative diseases. *Nova.* 2017;15(28):69–78.
40. Oehha. Efectos del Cromo Hexavalente Sobre la Salud. *Sci a Heal Calif.* 2016;

41. Shen L, Xiao J, Ye H, Wang D. Toxicity evaluation in nematode *Caenorhabditis elegans* after chronic metal exposure. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009;28(1):125–32.

ANEXOS

Anexo 1 Resultados expresados en porcentaje para el ensayo de supervivencia.

Ensayo de supervivencia									
Día	N2			EG1285			EG1285 + H2O		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	87
5	100	100	100	87	100	100	67	73	67
6	93	100	100	73	80	73	60	73	60
7	93	100	93	67	67	73	53	60	53
8	93	87	87	53	67	47	40	53	40
9	80	73	73	27	47	47	27	40	33
10	73	73	73	20	47	33	20	27	27
11	67	67	53	13	47	27	13	20	13
12	53	60	53	13	40	27	13	20	7
13	53	60	53	13	40	27	0	7	0
14	47	53	47	6	27	20	0	0	0
15	33	47	33	6	27	20			
16	20	33	33	6	20	7			
17	13	20	20	6	20	7			
18	7	7	7	6	7	0			
19	0	0	7	0	0				
20	0	0	0						

Anexo 2 Resultados para el ensayo de reproducción.

Ensayo de reproducción									
	N2			EG1285			EG1285 + H2O		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Nematodo 1	220	180	194	192	205	195	160	192	187
Nematodo 2	201	217	179	228	230	203	180	174	184
Nematodo 3	168	250	217	215	228	240	152	176	193
Nematodo 4	213	198	201	188	172	199	185	189	166
Nematodo 5	234	188	235	224	215	212	163	168	179
Promedio	207,2	206,6	205,2	209,4	210	209,8	168	179,8	181

Anexo 3 Resultados obtenidos para el ensayo de motilidad.

Ensayo de motilidad									
POBLACIÓN	N2			EG285			EG285 + H2O		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
NEMATODO 1	16,00	14,00	15,00	15,00	14,00	15,00	10,00	12,00	11,00
NEMATODO 2	14,00	13,00	16,00	14,00	13,00	14,00	9,00	10,00	11,00
NEMATODO 3	14,00	14,00	14,00	15,00	15,00	15,00	7,00	8,00	9,00
NEMATODO 4	17,00	16,00	17,00	13,00	18,00	13,00	6,00	5,00	7,00
NEMATODO 5	18,00	17,00	18,00	18,00	15,00	16,00	13,00	11,00	7,00
NEMATODO 6	16,00	15,00	16,00	15,00	13,00	15,00	10,00	10,00	8,00
NEMATODO 7	14,00	14,00	15,00	21,00	14,00	14,00	11,00	7,00	5,00
NEMATODO 8	16,00	14,00	16,00	15,00	13,00	16,00	9,00	7,00	6,00
NEMATODO 9	16,00	16,00	17,00	15,00	15,00	15,00	8,00	8,00	7,00
NEMATODO 10	17,00	17,00	18,00	15,00	15,00	16,00	10,00	8,00	9,00

Anexo 4 Informe de resultados emitido por Hidrolab.

Informe de Ensayo (SN)

Nº Informe: 8376-02



Cliente: WENDY PAOLA SANCHEZ
Dirección: 34 bis # 68 c - 05 barrio la alqueria,,
Proyecto: Control muestras de agua residual doméstica
Identificación Cliente: WENDY PAOLA SANCHEZ
Lugar de Muestreo: Calle 59B N° 18D-72 SUR
Dirección:
Ciudad / Región: BOGOTÁ, Bogotá D.C
Punto de Muestreo: Aleatorio
Matriz: Aguas residuales
Término de Muestreo: 12/06/2018 08:50:00
Muestreado por: Cliente
 Latitud: 4° 33' 43.6" Longitud: 74° 8' 3.3"

Tipo de Muestreo: Puntual
Recepción Laboratorio: 14/06/2018 13:25:02

Parámetro	Unidades	Resultados	Fecha y Hora Análisis	Ref.Método
Cromo	mg/L Cr	0,024	20/06/18 16:51	SM 3111 B (2)

Notas:
 (2) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition 2012.

Marcelis Vargas
 Directora Operativa

Alex Contreras
 Jefe de área Físicoquímica

Fecha Emisión Informe: 26/06/2018

