



*Cepas transgénicas de Caenorhabditis elegans TJ 356 y VC 128 como biomarcadores ambientales de toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas*

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**  
**TRABAJO DE GRADO**  
**BOGOTÁ D.C 2021.**



*Cepas transgénicas de Caenorhabditis elegans TJ 356 y VC 128 como biomarcadores ambientales de toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas*

**Lizeth Dayann Márquez Díaz**  
**Erika Meneses Marin**  
**Yeimy Yisseth Moreno Guerrero**

**Asesora interna**

**Ruth Mélida Sánchez Mora, MSc, Ph. D**

**Docente Investigadora Grupo de Biotecnología y Genética UCMC**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**  
**TRABAJO DE GRADO**  
**BOGOTÁ D.C 2021.**



## UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

**Proyecto:**

**Cepas transgénicas de *Caenorhabditis elegans* TJ 356 y VC 128 como biomarcadores ambientales de toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas**

**Meritoria:** \_\_\_\_\_

**Laureada:** \_\_\_\_\_

**Aprobada:** \_\_\_\_\_

### JURADOS

Edgar Hernan Beltran Cruz

Escaneado con CamScanner

Andrés Rincón Riveros

### ASESOR(es)

Ruth Mérida Sánchez Mora

**ÉTICA, SERVICIO Y SABER**



## **DEDICATORIA**

Dedico con todo mi corazón este trabajo primeramente a Dios porque gracias a él he logrado concluir mi carrera, a mi madre, mi hermano y mis abuelos ya que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo incondicional en la parte moral y económica para poder llegar a ser de mí una mejor persona y formarme como una profesional de la patria; por último y no menos importante agradezco a mis compañeras Erika Meneses Marin y Yeimy Yisseth Moreno Guerrero por estar a mi lado y brindarme su amistad en el recorrido de este largo camino.

***Lizeth Dayann Márquez Díaz***

Este trabajo de grado está dedicado reconociendo primeramente a Dios y al espíritu santo, que fueron mi soporte espiritual, moral y ético en todo el trayecto de mi formación profesional, agradeciendo su infinito amor, sin dejar de lado a mis padres, mi abuela, mis hermanas, mis compañeras y amigas Yeimy Moreno y Lizeth Márquez quiénes me alentaron a continuar cada día. Por último y no menos importante a mi pequeña sobrina Sara Sofia quién me brindó su amor cuando más lo necesitaba. Mil gracias a todos por creer en mí.

***Erika Meneses Marin***

Dedico este trabajo a Dios, a mi familia y mi abuela Maria Oliva Gaspar por tenerme siempre en sus oraciones, su constante apoyo y amor incondicional. A mis compañeras y amigas Erika Meneses y Lizeth Marquez, a todas las personas que hicieron parte de este proceso haciendo de éste un recorrido lleno de experiencias y lecciones aprendidas contribuyendo a mi formación personal y profesional.

***Yeimy Yisseth Moreno Guerrero***

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos principalmente a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por brindarnos todos los conocimientos y herramientas intelectuales que hoy en día nos permiten llevar a cabo el presente proyecto y son la base de futuras investigaciones en calidad de profesionales.

También agradecemos el constante apoyo de la Dra. Ruth Mélida Sánchez docente de genética y la Joven Investigadora Dayana Rodríguez Morales quienes nos guiaron durante el desarrollo de esta monografía contribuyendo a nuestro desarrollo profesional y personal.

Junto con el semillero de Biotecnología y Genética de la Universidad por escuchar atentamente cada una de nuestras presentaciones y realizar las debidas sugerencias. Además, agradecemos a la red colombiana de semilleros de investigación por permitirnos participar en el encuentro regional RedCOLSI dando reconocimiento al proyecto inicialmente planteado.

Por último y no menos importante agradecemos a Dios, a nuestras familias y seres queridos por el apoyo incondicional brindado a cada una de nosotras.

## **TABLA DE CONTENIDO**

<b>SIGLAS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
2.1. General	12
2.2. Específicos	12
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>13</b>
<b>4. MARCO REFERENCIAL</b>	<b>16</b>
4.1. Caenorhabditis elegans	16
4.1.1. Clasificación taxonómica	16
4.1.2. Características fisiológicas y anatómicas	16
4.1.3. Ciclo de vida	17
4.2. Métodos para la producción de cepas transgénicas de C. elegans	18
4.2.1. Microinyección de ADN	18
4.2.2. Bombardeo de micropartículas	19
4.3. Metales pesados	20
4.3.1. Muestra de agua para la evaluación de metales pesados en fuentes hídricas	20
4.3.2. Muestra de sedimentos para la evaluación de metales pesados en fuentes hídricas	21
4.3.3. Análisis de metales pesados	21
<b>5. DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>22</b>
5.1. Tipo de investigación	22
5.2. Procedimientos	22
5.2.1. Búsqueda y selección de la información	22
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
6.1. Elaboración de base de datos y análisis de la información	23
6.2. Contaminación de fuentes hídricas por metales pesados	26
6.2.1. Generalidades de la contaminación por metales pesados	26
6.2.2. Fuentes hídricas contaminadas en Colombia	27
6.3. Impacto de los metales pesados en la salud humana	31
6.4. Tipo de muestra de preferencia para la evaluación de la presencia de metales en fuentes hídricas	32
6.5. Ventajas del modelo de C. elegans como biomarcador ambiental	34
6.6. Cepas de C. elegans utilizadas como biomarcadores ambientales para metales pesados.	35
6.6.1. Características de la cepa transgénica TJ 356 (Daf-16::GFP)	35

6.6.2. Importancia de Daf-16::GFP en la evaluación toxicológica y presencia de metales pesados en fuentes hídricas	37
6.6.3. Características de la cepa VC 128 de <i>C. elegans</i>	41
6.6.4. Metalotioneínas de <i>C. elegans</i>	42
6.6.5. Importancia de las metalotioneínas en la evaluación de la presencia de metales pesados en fuentes hídricas	43
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Características anatómicas de *C. elegans*.

**Figura 2.** Ciclo de vida *C. elegans*

**Figura 3.** Órganos afectados por metales pesados en el ser humano Pb, Hg, Cd, Cu, Mn, Zn, As.

**Figura 4.** Construcción de Daf-16::GFP.

**Figura 5** Acción de Daf-16 frente a algunos factores de estrés (estrés oxidativo, estrés osmótico, choque térmico e hipoxia)

**Figura 6.** Efectos de 4-heptanona y SVM en la localización nuclear de Daf-16::GFP

**Figura 7.** Localización de Daf-16::GFP en TJ 356 frente a la exposición a parabenos Mep, Etp, Pro, Bup

**Figura 8.** Translocación de Daf-16::GFP en *C. elegans* frente a compuestos individuales de Mn, Pb y Cd

**Figura 9.** Porcentaje de nematodos que muestran translocación de Daf-16::GFP frente a la exposición a los metales individuales y mezclas de metales.

**Figura 10.** Funciones diferenciales de mtl-1 y mtl-2 e interacciones entre las MT y el Uranio.

**Figura 11.** Expresión de las MT mtl-1::GFP y mtl-2::GFP en la cepa VC128 de *C. elegans* por exposición al Uranio

**Figura 12.** Expresión de mtl-2::GFP en *C. elegans* por exposición al Cd (25uM)

**Figura 13.** Inducción de mtl-2::GFP en respuesta al Zn

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Número de investigaciones por tema de estudio

**Gráfica 2.** Origen de la literatura científica utilizada.

**Gráfica 3.** Cantidad de estudios por año de publicación.

**Gráfica 4.** Idioma de publicación.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Tabla resumen de contaminación en algunas fuentes hídricas de Colombia

**Tabla 2.** Metales pesados y su grado de afinidad por la materia orgánica

## SIGLAS

**ADNc:** ADN complementario

**BPA:** Buenas prácticas agrícolas

**CGC:** *Caenorhabditis* Genetics Center

**Daf-16:** Factor de transcripción

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**L1:** Estadios larvarios de *C. elegans* más joven

**L4:** Estadios larvarios de *C. elegans* más adulto

**MT:** Metalotioneínas

**mtl-2:** Gen que permite actividad de unión a iones de Cadmio y Zinc

**N2:** Cepa salvaje de *C. elegans*

**NGM:** Nematode Growth Media

**Pb:** Pares de bases

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

## SÍMBOLOS QUÍMICOS

**Cd:** Cadmio

**Cr VI:** Cromo VI

**Cu:** Cobre

**Hg:** Mercurio

**Mn:** Manganeseo

**Ni:** Níquel

**Pb:** Plomo



**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA**  
**Cepas transgénicas de *Caenorhabditis elegans* TJ 356 y VC 128 como biomarcadores**  
**ambientales de toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas**

**RESUMEN**

Se considera que el agua es una sustancia de primera necesidad para el sostenimiento de los ecosistemas, por lo tanto, asegurar la calidad de esta es de vital importancia, de manera que en los últimos años ha cobrado interés la investigación de modelos que actúan como indicadores biológicos permitiendo detectar la presencia de microorganismos o sustancias químicas que puedan llegar a afectar la salud humana. Así mismo, las prácticas y actividades humanas han generado un gran impacto ambiental, especialmente en las fuentes hídricas mediante el vertimiento de sustancias provenientes de la industria, la explotación minera, y el mal manejo de residuos, generando toxicidad por la presencia de metales pesados.

Por esta razón, se ha propuesto a *C. elegans* como biomarcador ambiental debido a que los ensayos con este nematodo como modelo biológico de contaminación, son económicos, sencillos y altamente sensibles. Una característica importante es su similitud genética con el humano, que ha sido reportada entre un 60 y 80% de genes ortólogos (27). De igual manera, su uso en experimentación está permitido y cuenta con un ciclo de vida corto, por lo que se puede obtener una gran población de nematodos a gran escala en corto tiempo, lo que asegura la reproducibilidad de los ensayos como se podrá evidenciar en esta monografía. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es presentar las principales causas de contaminación de fuentes hídricas por metales pesados y la importancia del uso de las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 del nematodo *C. elegans*, usadas como biomarcadores de contaminación hídrica.

**Palabras clave:** Toxicidad, metales pesados, *C. elegans*, cantera, material de arrastre, nematodo, Daf-16, mtl-1, mtl-2, fitosanitarios.

Lizeth Dayann Márquez Díaz, Erika Meneses Marín, Yeimy Yiseth Moreno Guerrero, Ruth Mélida Sánchez Mora, MSc, Ph. D. Docente Investigadora Grupo de Biotecnología y Genética UCMC, 3 de septiembre del 2021.

## INTRODUCCIÓN

De acuerdo con diversos estudios se ha llegado a establecer que existen múltiples factores de contaminación por metales pesados como, Plomo (Pb), Cromo (Cr), Cadmio (Cd), Zinc (Zn), Mercurio (Hg), Arsénico (Ar), Estaño (Sn), Níquel (Ni), Cobalto (Co) y compuestos tóxicos a altas concentraciones como Manganeseo (Mn) y Bario (Ba) (1, 2, 3). Estos metales pesados pueden llegar a afectar las fuentes hídricas debido al mal manejo de desechos generados por parte del área industrial, agrícola, el sector minero y doméstico. Algunos ejemplos de fuentes hídricas contaminadas por metales pesados en Colombia son: el río Ocoa, río Guatiquía (4), río Coello, río Algodonal, Caño Grande, río Magdalena, río Bogotá y el río Medellín (5, 6, 8). Debido a la falta de acueducto en algunos lugares de Colombia la población se ve obligada muchas veces a hacer uso de aguas superficiales naturales para consumo humano sin el debido tratamiento previo, además del uso agrícola, pecuario, recreativo e industrial, como lo establece el Decreto 3930 de 2010 que hace referencia a los usos del agua y residuos líquidos (7). Estas fuentes hídricas se encuentran bajo condiciones que no aseguran su inocuidad debido a la falta de control y vigilancia a lo largo de su cauce, provocando grandes afectaciones en la salud humana de los habitantes aledaños, ya que se encuentran continuamente expuestos a los contaminantes anteriormente mencionados (8, 9).

La exposición a estas fuentes hídricas contaminadas con metales pesados, conduce a enfermedades como, cáncer, osteoporosis, neumonía, artritis, afectación a nivel renal, fibrosis alveolar, enfermedades en ojos, piel y mucosas, lo cual ocurre de manera dependiente al tiempo, dosis, duración y frecuencia de exposición, debido a que los metales pesados son compuestos bioacumulables en suelos, sedimentos, cultivos, animales y humanos (2,10).

Por esta razón, es importante realizar una detección temprana de la presencia de metales pesados en aguas naturales superficiales, con el fin de minimizar el impacto ambiental y el daño que pueden ocasionar a la salud humana al consumir animales acuáticos o agua de fuentes hídricas contaminadas con metales pesados. En esta monografía se muestran los estudios que proponen como biomarcador ambiental al modelo biológico *C. elegans*, resaltando las cepas transgénicas VC 128 y TJ 356 por ser altamente sensibles frente a la presencia de metales pesados.

## OBJETIVOS

### 2.1. General

Realizar una revisión bibliográfica del uso de las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 de *C. elegans* como biomarcadores de toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas.

### 2.2. Específicos

- Identificar las causas de la contaminación en las fuentes hídricas por metales pesados.
- Revisar estudios previos que evidencian la presencia de metales pesados en algunas fuentes hídricas de Colombia y su impacto en la salud.
- Identificar por literatura el tipo de muestra ideal a usar en futuros ensayos con *C. elegans* para el análisis de metales pesados en fuentes hídricas.
- Describir estudios relacionados a la evaluación de metales pesados en las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 de *C. elegans* como biomarcadores ambientales frente a la presencia de metales pesados en fuentes hídricas.

## ANTECEDENTES

La contaminación de las fuentes hídricas es un problema a nivel mundial que afecta a países en vía de desarrollo, la falta de educación, concientización, las malas prácticas agrícolas y el mal uso que se le da a este recurso, se convierten en un serio problema de salud pública al afectar la salud de las poblaciones que habitan cerca de estas fuentes hídricas.

En primer lugar, Menzel R. planteó que la calidad de los ríos se ve reflejada en mayor proporción en sus sedimentos, puesto que, éstos suelen estar contaminados por productos químicos, sustancias tóxicas y metales pesados que se unen y se concentran en las partículas de los sedimentos (11). Por otro lado, Silva R. en el 2010, mencionó cómo los suelos en cultivos agrícolas pueden estar contaminados según el origen del agua de riego lo cual, puede representar un riesgo para la población que consume los alimentos cultivados (12).

Höckner M. en su estudio realizado en el 2011 resalta que *C. elegans* contiene dos metalotioneínas (MT) conocidas como mtl-1 y mtl-2 donde la primera actúa como un sensor de metales en la faringe y la segunda se expresa fuertemente en el intestino del nematodo tras la exposición a metales pesados (13)

Para el año 2012, Hall J. menciona cómo el ser humano se encuentra expuesto a diversos metales pesados que pueden ser perjudiciales para la salud, debido a que generan efectos negativos sobre la respuesta celular y molecular, ya que inhibe las vías de reparación de ADN (14).

Rudel D. durante el 2013 destaca que el Ni se encuentra naturalmente en el ambiente combinado con oxígeno y azufre. Por tal motivo, se puede encontrar en suelos, plantas, sedimentos y aguas ya que, las pequeñas partículas de Ni presentes en el aire o en la tierra pueden ser arrastradas hacia las aguas superficiales. Cabe mencionar que, el Ni es un compuesto esencial para muchos organismos, particularmente plantas y microbios. Sin embargo, la exposición a altas concentraciones de este produce reacciones alérgicas, erupciones cutáneas, afecciones respiratorias y cáncer en humanos (15).

En este mismo año, Turner y colaboradores realizaron la evaluación del río Mud para determinar la presencia de toxicidad en muestras de agua y sedimentos mediante el uso de algunas cepas de *C. elegans* (*gpdh-1*, *gpdh-2*, *mtl-2*, *N2*), partiendo del hecho de que el río Mud y las cuencas hidrográficas aledañas podrían verse afectadas por la extracción de carbón (16). Posteriormente en el 2014, Kronberg F. realizó un estudio toxicológico en el agua de la zona agrícola del arroyo Pergamino, en Argentina, usando como modelo biológico el nematodo *C. elegans* y sugiere que debido a que las muestras ambientales pueden contener indefinidos componentes tóxicos, es recomendable incluir un indicador animal para complementar el análisis de las mismas (17).

En el año 2014 Polak N. destaca en su estudio que las MT son pequeñas proteínas ricas en cisteína que son estimuladas frente a la exposición a metales pesados siendo actores clave en la protección contra la toxicidad inducida por metales y especies reactivas de oxígeno (ROS) (18).

Ramírez A. en el año 2015 realizó un análisis de metales pesados en suelos irrigados con agua del Río Guatiquía debido a algunas problemáticas presentes en el departamento del Meta como el vertimiento de aguas estancadas, residuales, explotación de petróleo y minería a nivel Industrial (4). Para esta misma época, Yu L. resalta la importancia de asegurar un alimento adecuado para el desarrollo del nematodo *C. elegans* debido a que este factor influye en su comportamiento alimentario, la vida media del nematodo, el tamaño de las crías y la fecundidad (19).

Para el año 2016 Tejada L. usó como modelo experimental al nematodo *C. elegans* en el río Magdalena de Colombia para evaluar la presencia de sustancias tóxicas por el vertimiento de diversos contaminantes a dicho río (20). Al mismo tiempo, Jiang Y. determinó los criterios de valoración subletal para desarrollar un sistema de detección y seguimiento de la toxicidad provocada en el nematodo *C. elegans* por 4 metales Cu, Zn, Cd y Cr, para lo cual, tuvo en cuenta parámetros fisiológicos como mortalidad, crecimiento y reproducción (21).

A su vez, Jiang Y, también, resalta la importancia de incluir en el estudio la evaluación de parámetros como la alimentación por ser considerado ideal para la evaluación de toxicidad por metales pesados debido a su simplicidad, precisión, reproducibilidad y costo (21). Mientras que, Sanadhya P. en el año 2018 resalta que la cepa transgénica TJ 356 de *C. elegans* fue modificada genéticamente para permitir la localización celular del factor de transcripción Daf-16 responsable de activar las vías de señalización como respuesta a la longevidad, lipogénesis, supervivencia y diversos tipos de estrés (22).

La base de datos Wormbase menciona que, Daf-16 cuenta con diversas funciones en el nematodo, principalmente es un factor de transcripción que actúa en la vía de señalización mediada por insulina regulando la formación de dauer, longevidad, respuesta al estrés e inmunidad innata (23).

Por otro lado, para el año 2019 Garzón E, Bastidas E, Betancur J y Solaque Y. coinciden en que los ríos Ocoa y Guatiquia ubicados en el departamento del Meta presentan una problemática de contaminación por metales pesados a causa de la extracción de material de arrastre que es una actividad común en el departamento (6, 24).

Sánchez A. y Martínez C. en su estudio realizado en el río Algodonal en el 2020, afirman que la extracción de material de arrastre por parte del sector minero ocasiona una afectación directa sobre los lechos fluviales. Cabe resaltar, que este río abastece al acueducto municipal de Ocaña, lo que representa un riesgo para la población aledaña.(8)

Por último Lara L, para el año 2021 define la transgénesis como una tecnología que permite la construcción de nuevas combinaciones de material genético mediante la inserción de un fragmento de ADN de interés en un vector (25).

## **4. MARCO REFERENCIAL**

### **4.1. *Caenorhabditis elegans***

#### **4.1.1. Clasificación taxonómica**

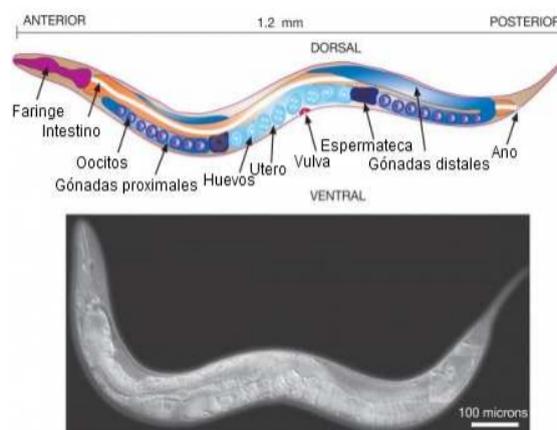
El nematodo saprófito de vida libre *C. elegans* inicialmente denominado *Rhabditis elegans* viene del latín *caeno* (reciente), *rhabditis* (palito), *elegans* (elegante), pertenece al reino *Metazoa*, subreino *Eumetazoa*, filo *Nematoda*, clase *Secernentea*, orden *Rhabditida*, familia *Rhabditidae*, género *Caenorhabditis*, especie *Elegans* (26). Fue aislado por primera vez en 1949 por Victor Nigon en Francia y años más tarde en 1974 fue conocida la cepa *Bristol N2* que hoy en día se conoce como una cepa tipo silvestre y es frecuentemente utilizada como control en diversos estudios (26, 44).

#### **4.1.2. Características fisiológicas y anatómicas**

*C. elegans* es considerado como el primer organismo multicelular en ser secuenciado genéticamente por completo, posee  $97 \times 10^7$  pares de bases con una similitud entre el 60% y 80% con el humano a nivel genético por la presencia de genes ortólogos; siendo el 38 % genes que codifican para proteínas que son ortólogos a genes humanos (26, 27). Además, posee un par de cromosomas sexuales y 5 pares de cromosomas autosómicos. Durante la reproducción se producen de 200 a 300 huevos de los cuales, en su mayoría son organismos hermafroditas y en su sexto par de cromosomas son XX por lo que producen tanto ovocitos como espermatozoides y pueden reproducirse mediante autofecundación pese a que, no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Aunque en un menor porcentaje (0,05%), la reproducción también puede dar lugar a especímenes masculinos XO del total de nematodos fertilizados.(17,26,27)

A nivel anatómico ambos sexos son de tamaño similar (1,3 mm), el adulto se observa con una estructura bilateral simétrica, cuerpo cilíndrico tubular vermiforme, conformado por boca, faringe, intestino, gónadas y cutícula de colágeno. Sin embargo, el macho posee una sola gónada, vasos eferentes y una cola para el apareamiento y los hermafroditas poseen oviductos, dos ovarios, una cavidad de almacenaje de esperma y un útero. Para alimentarse usa su orificio bucal ubicado en el extremo anterior de la cabeza, mientras que el ano se encuentra ubicado en la zona ventral (28, 29, 30).

También, es importante diferenciar las larvas dauer que se generan únicamente frente a condiciones adversas, estas se caracterizan por ser más delgadas y oscuras que la larva L3 y carecen de región gonadal definida y lumen intestinal visible (17,26,27).

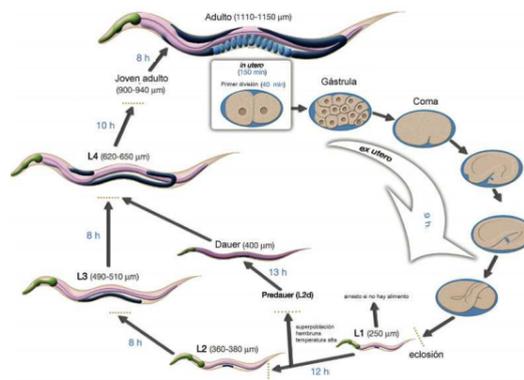


**Figura 1.** Características anatómicas de *C. elegans*. Tomado de: Araceli M. Clavijo L (26).

#### 4.1.3. Ciclo de vida

*C. elegans* tiene un ciclo de vida corto desde su fase embrionaria hasta el desarrollo de nematodos adultos donde pasa por 4 estadios larvales conocidos como L1, L2, L3 y L4. Si se encuentra en un ambiente con óptimas condiciones de alimento, pH, humedad y temperatura (16 a 25°C) puede desarrollarse de 3 a 4 días. La fase embrionaria puede transcurrir en un

periodo de 14 horas y la post-embrionaria en 46 horas, siendo 12 horas en el paso de L1 a L2, 8 horas de L2 a L3, otras 8 horas de L3 a L4, 10 horas para el desarrollo de una larva joven adulta y 8 horas en el paso de L1 a L2, 8 horas de L2 a L3, otras 8 horas de L3 a L4, 10 horas para el desarrollo de una larva joven adulta y 8 horas para finalmente tener un nematodo adulto (26).



**Figura 2.** Ciclo de vida *C. elegans*. Tomado de: Araceli M. Clavijo L (26).

## 4.2. Métodos para la producción de cepas transgénicas de *C. elegans*

La transgénesis es una tecnología que ha cobrado gran importancia actualmente, que permite la construcción de nuevas combinaciones de material genético mediante la inserción de un fragmento de ADN de interés en un vector que permita su replicación y expresión en las células de un organismo, para lo cual, cabe resaltar dos métodos conocidos como microinyección de ADN y bombardeo de micropartículas (25, 31).

### 4.2.1 Microinyección de ADN

La microinyección de ADN es el método que se usa con más frecuencia para la transformación de *C. elegans*, consiste en inyectar fragmentos de ADN o plásmidos en la gónada distal o el ovocito en desarrollo del nematodo. El ADN que se inyecta, forma grandes matrices extra-cromosómicas que incorporan entre 50 y 300 copias del material inyectado, las cuales, son heredadas por la progenie de los nematodos, posteriormente la identificación de

los nematodos transgénicos se logra a través de marcadores o reporteros que se inyectan junto con el ADN de interés (31). Debido a que las matrices extra-cromosómicas se heredan de una manera no mendeliana a las generaciones posteriores, para evitar la pérdida gradual de éstas, se pueden incorporar a un cromosoma induciendo una reparación de rotura de ADN de doble hebra no homóloga (31).

Este método, aparte de ser económico, permite la transformación de hermafroditas individuales, requiere de menor tiempo, cuenta con matrices extra-cromosómicas que llevan de 80 a 300 copias del transgen y los genes expresados en la línea germinal se silencian. Sin embargo, precisa de mucho cuidado para obtener resultados favorables (31).

#### **4.2.2. Bombardeo de micropartículas**

Este método consiste en disparar a altas velocidades unas micropartículas de oro recubiertas con el ADN de interés para introducir las en el nematodo, haciendo uso de un instrumento de bombardeo holístico especializado o una pistola genética (31). A diferencia del método microinyección de ADN, este método permite obtener directamente cepas transgénicas integradas estables, y aumenta la capacidad para analizar la regulación de genes durante el desarrollo y su función de la línea germinal (31).

El bombardeo de micropartículas permite la transformación de un gran número de hermafroditas. Por lo tanto, requiere de más tiempo, contiene matrices extracromosomales con bajo número de copias pero integrales, es un método costoso, es más fácil de realizar y no requiere de muchos cuidados para obtener resultados favorables (31).

### **4.3. Metales pesados**

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos de alta densidad, que se consideran tóxicos para la salud humana y el medio ambiente por ser bioacumulables, es decir, no pueden ser eliminados por el cuerpo (4, 10, 32).

De acuerdo con Kronberg F. la calidad de los resultados obtenidos en un análisis de metales pesados en aguas naturales superficiales depende de una adecuada toma de muestra. Por lo tanto, es importante tener en cuenta, el tipo de muestra, la metodología a utilizar y factores climáticos que pueden provocar un déficit o un exceso en los analitos (17).

#### **4.3.1. Muestra de agua para la evaluación de metales pesados en fuentes hídricas**

El propósito de un muestreo de agua es poder evaluar la condición de una fuente hídrica, por lo tanto, se debe garantizar el óptimo procedimiento de toma de muestra obteniendo resultados confiables, ya que según el estado del agua se tomarán decisiones frente al tratamiento y acciones correspondientes que permitan el aseguramiento integral de la fuente hídrica.

De acuerdo con lo anterior, es preciso resaltar que se debe muestrear una porción significativa que sea fácil de transportar pero suficiente para su análisis en el laboratorio. Para esta muestra se deben conocer muy bien las características de la fuente hídrica a muestrear, delimitando y haciendo una caracterización de la zona. El frasco de toma de muestra debe estar muy bien identificado. Por lo tanto, es recomendable tomar la muestra en dirección opuesta al flujo de la corriente. Mientras que, para las muestras tomadas en ríos se recomienda

hacer la toma en la zona central del mismo y se sugiere que el frasco se llene hasta el borde sin dejar burbujas para la determinación de metales pesados (4,17).

#### **4.3.2. Muestra de sedimentos para la evaluación de metales pesados en fuentes hídricas**

Los sedimentos interactúan con la biota del ecosistema y dependiendo de su exposición frente a distintos compuestos pueden ser nocivos para el organismo, generando toxicidad. Un ejemplo de ello está dado por Tejada L. y Oliveros J. quienes hacen uso de 1.0 Kg de muestra compuesta a partir de cuatro sub-muestras, obtenidas en un tramo del río Magdalena con ayuda de una draga Ekman aproximadamente a 50 metros de la orilla. Todas las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno y ubicadas en una nevera a 4 °C, luego transportadas al laboratorio y almacenadas a -20 °C, la humedad fue eliminada mediante liofilización a -50 °C mientras que, los sedimentos secos fueron triturados, tamizados y almacenados a -20 °C ( 4, 20,33).

#### **4.3.3. Análisis de metales pesados**

El análisis de metales pesados se puede realizar por diversas metodologías o métodos instrumentales de química analítica, ya que estos permiten medir concentraciones de mezclas o de un material específico permitiendo detectar gran variedad y pequeñas concentraciones de elementos en la muestra o solución de interés. Un ejemplo de ello, es el análisis mediante absorción atómica en horno de grafito-espectrofotometría (GF-AAS) y el análisis de Cromo (VI) mediante métodos colorimétricos como los describe Silva R y Bonilla H (12). Además, el análisis de metales traza por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (HR ICP-MS) (20).

Sin embargo, también existen equipos específicos para la detección de la presencia de metales pesados en agua como el analizador de metales pesados portátil HM1000, el cual cuenta con una sonda de montaje, electrodos, agitador, sensor de temperatura y un kit de consumibles para 50 pruebas que permite la detección de Cd, Pb Hg, As, Cu y Zn (34).

## **5. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **5.1. Tipo de investigación**

Monografía de compilación de tipo cualitativa - descriptiva centrada en literatura relacionada con las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 de *C. elegans* como biomarcador ambiental de la presencia de metales pesados en fuentes hídricas, se resaltan las principales fuentes de contaminación en algunas fuentes hídricas de Colombia, los efectos nocivos hacia la salud por la presencia de metales pesados, el tipo de muestra más idóneo para tal determinación y las ventajas de *C. elegans* como organismo modelo de contaminación.

### **5.2. Procedimientos**

#### **5.2.1. Búsqueda y selección de la información**

En primer lugar, se realizó una búsqueda de documentos científicos que abarcaran los diferentes temas de interés para la elaboración de la presente monografía, para ello fueron consultadas algunas bases de datos como Pubmed, Scielo, Science, national center biotechnology information NCBI, Wormbase, BioMed Central Genomics, Springer, Science, Business y PLOS ONE.

La literatura científica utilizada para el desarrollo del presente proyecto, fue seleccionada teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1. Investigación relacionada con las cepas TJ 356 y VC 128 del nematodo *C. elegans*.
2. Toxicidad por metales pesados en fuentes hídricas de Colombia.
3. Estudios realizados en inglés y/o español
4. Estudios publicados en revistas y bases de datos reconocidas o indexadas.

Por otro lado, como criterios de exclusión no se tuvieron en cuenta los documentos que no cumplan con los criterios de inclusión anteriormente descritos.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

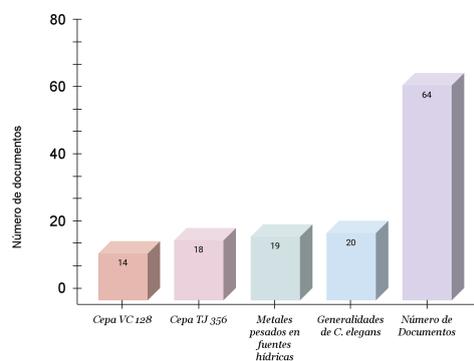
En total se recopilaron 64 documentos correspondientes a páginas web, trabajos de grado, artículos y bases de datos que destacan los temas de interés para el desarrollo del presente trabajo de grado, como las generalidades y la problemática de contaminación ecotoxicológica por metales pesados en cuerpos de agua de Colombia, su impacto en la salud, el tipo de muestra ideal para la evaluación de metales pesados y ventajas de *C. elegans* como biomarcador ambiental de la presencia de metales pesados en fuentes hídricas haciendo énfasis en las cepas TJ 356 y VC 128 de *C. elegans*.

### **6.1. Elaboración de base de datos y análisis de la información**

Cada documento de interés para la construcción de la presente monografía fue organizado en una matriz del programa excel, la cual se elaboró teniendo en cuenta criterios como: autores, nombre del artículo, años de publicación, revista y sitio web. A su vez, se realizó una división por temas en cuatro hojas de trabajo tituladas como generalidades de *C. elegans*, metales pesados en fuentes hídricas, cepa TJ 356 de *C. elegans* y cepa VC 128 de *C. elegans*

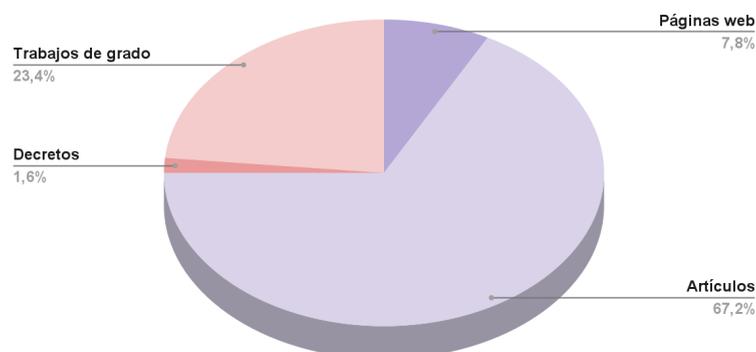
como se puede apreciar en la gráfica 1 donde se enumera la cantidad de estudios encontrados por cada tema. Cabe resaltar, que hay artículos que comparten categorías.

Por otro lado, se puede evidenciar que en total hay 64 documentos de los cuales, 14 abarcan temas de la cepa VC 128, 18 hablan acerca de la cepa TJ 356, 19 tratan de temas sobre metales pesados en fuentes hídricas y 20 documentos tratan las generalidades del nematodo *C. elegans*.



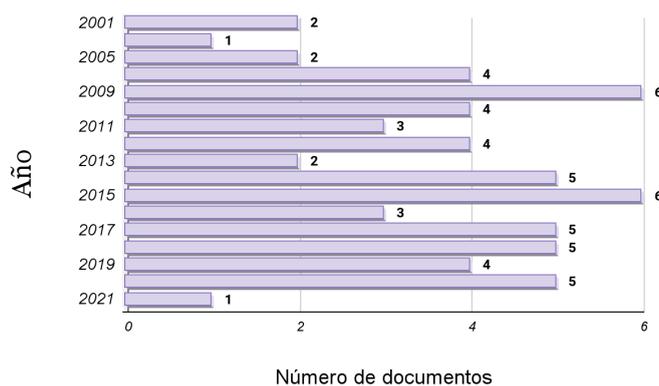
**Gráfica 1.** Número de investigaciones por tema de estudio. Elaboración propia. Marquez L, Meneses M, Moreno Y. 2021.

En la gráfica 2 se muestra la distribución porcentual de la literatura científica utilizada de acuerdo al origen, donde se puede evidenciar que de los 64 documentos utilizados para la realización de la presente monografía, el 67,2 % corresponde a artículos, el 23,4 % a trabajos de grado, el 7,8 % a páginas web y el 1,6 % a decretos.



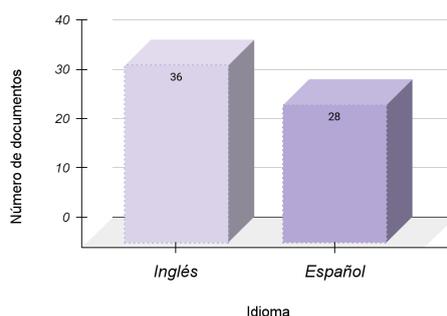
**Gráfica 2.** Origen de la literatura científica utilizada. Elaboración propia. Marquez L, Meneses E, Moreno Y. 2021.

Los años de publicación de las investigaciones utilizadas se evidencian en la gráfica 3. Abarcan un periodo a partir del año 2001 hasta el año 2021, siendo los más utilizados los comprendidos en los años 2015-2020.



**Gráfica 3.** Cantidad de estudios por año de publicación. Elaboración propia. Márquez L, Meneses E, Moreno Y. 2021.

Para la presente monografía, fueron utilizados estudios publicados en idioma Inglés y Español de los cuales, 36 documentos son en Inglés y 28 son en Español (Gráfica 4).



**Gráfica 4.** Idioma de publicación. Elaboración propia. Marquez L, Meneses M, Moreno Y. 2021.

## **6.2. Contaminación de fuentes hídricas por metales pesados**

La presencia de metales pesados en fuentes hídricas actualmente representa una de las mayores problemáticas en países en vías de desarrollo debido a la falta de normas que regulen los niveles permitidos y nocivos para la salud. Por esta razón, diversos estudios realizados en Colombia se basan en normas tanto nacionales como internacionales, con la finalidad de complementar los resultados obtenidos y dar a conocer el estado real de las fuentes hídricas puesto que, la presencia de metales pesados en aguas naturales superficiales puede llegar a afectar al ecosistema acuático y por ende la salud humana al consumir ya sea animales contaminados o directamente el agua en condiciones que no aseguran su inocuidad. Es así como se encuentran reportes de bioacumulación de metales pesados en peces, tortugas y diversas especies acuáticas (9,20).

### **6.2.1. Generalidades de la contaminación por metales pesados**

De acuerdo a diferentes estudios revisados, se puede corroborar que los metales pesados más importantes son Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, As, Cd, Sn, Co y Zn. A pesar de que algunos de estos son indispensables para el cuerpo humano en bajas concentraciones, la exposición a altas concentraciones puede ser potencialmente tóxica como lo respaldan Rota M. y Bowen T. (2, 3). Sin embargo, estos metales son frecuentemente utilizados en gran variedad de actividades antropogénicas y muchas de estas actividades generan contaminación en el ecosistema afectando en gran medida las fuentes hídricas.

Siendo las principales fuentes de contaminación el área industrial por no tratar adecuadamente los desechos generados, el área agrícola debido al mal manejo de residuos de fertilizantes y pesticidas, el vertido de aguas residuales domésticas directamente a las fuentes hídricas cercanas (35). Además de, las curtiembres por el uso de productos químicos como el

Cr III para el procesamiento de toneladas de cuero crudo que puede llegar a parar a las aguas superficiales y al reaccionar con la luz ultravioleta puede formar cromo hexavalente Cr VI siendo potencialmente tóxico (62).

Otra fuente de contaminación considerable es el sector minero, como la minería aurífera por el inadecuado manejo de químicos como el Hg que al depositarse y acumularse en los sedimentos, es absorbido por organismos vivos como plantas y peces, que a su vez son consumidos por el hombre (63). Además de, las empresas encargadas de la extracción de material de arrastre que durante el proceso de extracción de la materia prima para construcción, pueden verter contaminantes potencialmente tóxicos a los ríos como combustible de la maquinaria con alto contenido de Pb como aditivo, la fundición, la fabricación y empleo de pinturas, que contiene metales pesados insolubles en agua, por lo que pueden precipitarse, adherirse a los sedimentos y partículas en suspensión (2, 36, 37).

### **6.2.2. Fuentes hídricas contaminadas en Colombia**

Estudios, investigaciones y reportes demuestran el estado de algunas fuentes hídricas y cómo las actividades antropogénicas han ido afectando la calidad del agua, a pesar de que Colombia se caracteriza por estar entre los países con mayor riqueza hídrica en el mundo por contar con numerosos ríos, lagos, humedales, acuíferos subterráneos, caídas de agua, cuerpos de agua del Amazonas y afluentes. Sin embargo, aún la humanidad no es consciente de que dicha riqueza hídrica se irá agotando con el transcurso del tiempo especialmente por el mal uso que se le da y la contaminación generada.

Un ejemplo de ello, es el río Ocoa de Villavicencio, Meta donde se han llegado a reportar altos niveles de contaminación por metales pesados como Ni, Cr y Pb, siendo el Pb el metal con mayor presencia en el tramo correspondiente a la desembocadura del caño Maizaro hasta el puente de Murujuy. Por lo que se puede inferir que la contaminación de este río puede afectar directamente a sus afluentes como Caño Grande (5). Además la presencia de dicho metal se encuentra relacionada principalmente a los centros de mecánica automotriz rudimentarios, el tráfico vehicular, el uso de combustibles, el desgaste de neumáticos, pastillas de frenos y lubricantes ( 6, 38, 39).

Otro claro ejemplo es el río Guatiquía el cual, nace en el Páramo Chingaza desde el municipio de Quetame hasta su desembocadura al río Meta donde gran parte de los suelos son de uso agrícola de acuerdo con el Esquema de Ordenamiento Territorial del Municipio de Quetame por lo que, es común el uso de agroquímicos, fertilizantes y pesticidas que muchas veces contienen Cr, Hg y Pb que al no ser correctamente desechados van a parar a las corrientes del río más cercano (río Negro) contribuyendo a la contaminación, el deterioro de la calidad del agua del río y la alteración de su composición natural (6, 35, 40). Lo que representa una problemática ya que los agricultores de la zona hacen uso de las aguas del río para el riego de cultivos (4, 24, 35, 56). Esto demuestra la importancia de capacitar al agricultor en buenas prácticas agrícolas (BPA) promoviendo la gestión responsable de los fitosanitarios.

Así mismo, se ha llegado a establecer que las empresas encargadas de la extracción de material de arrastre y producción de concreto presentes a lo largo del río Guatiquía generan

contaminación de los cuerpos de agua por descargas de efluentes con compuestos tóxicos como metales pesados (4 ,6, 24).

Al igual que, el río Coello y el río Algodonal donde Sánchez A. y Rojas V afirman que la calidad del agua también se ve afectada por la contaminación de gases y material particulado generado por la maquinaria utilizada para la extracción de material de arrastre. Además de, el derrame de aceites, lubricantes, grasas, gasolina, aceite combustible para motores (ACPM) generados durante las labores de extracción que representan una importante fuente de contaminación por metales pesados hacia las aguas superficiales naturales (8, 41). Este resultado respalda la idea de que el sector minero encargado de la extracción de material de arrastre puede contribuir a la contaminación por metales pesados generada en fuentes hídricas ( 8, 36, 41).

Además, cabe mencionar uno de los ríos más importantes de Colombia, como lo es el río Magdalena ya que, abastece a más del 70% de la población (9). Sin embargo, Tejada L. et al ratifica que, dicho río a lo largo de su cauce recibe contaminantes por parte del sector minero, vertidos agrícolas e industriales generando altas concentraciones de Cd y Pb en el río altamente tóxicos incidiendo y afectando directamente la flora y fauna del mar Caribe, ya que algunos sedimentos contaminados terminan llegando al mar, provocando la desaparición de arrecifes de coral y pastos marinos (9,20 ).

De igual forma, existen reportes de alto grado de contaminación en el río Medellín, el río Bogotá y algunos humedales de la sabana de la ciudad; un ejemplo de este último, está dado por Ardila T y Realpe E en su estudio realizado en odonatos como posibles indicadores de

contaminación, por lo que realizan un análisis de bioacumulación de metales pesados mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica mostrando resultados significativos para Cr, Cu y Pb (64). Por lo tanto, es importante resaltar la necesidad de realizar un control más riguroso a las fuentes hídricas puesto que, la contaminación generada en estas es responsabilidad de la población aledaña (12). En la tabla número 1 se evidencia el resumen de la contaminación generada en algunas fuentes hídricas en Colombia.

<b>TABLA RESUMEN DE CONTAMINACIÓN EN ALGUNAS FUENTES HÍDRICAS DE COLOMBIA</b>			
<b>Ríos</b>	<b>Tipo de contaminantes</b>	<b>Fuentes de contaminación</b>	<b>Usos de la fuente hídrica</b>
<b>Río Ocoa</b> Villavicencio- Meta	-Metales pesados: Pb, Ni, Cr.	-Centros de mecánica automotriz rudimentaria. -Sector agrícola e industrial	-Recurso hídrico industrial y de extracción.
<b>Caño Grande</b> Villavicencio, Meta	-Posible contaminación con los metales pesados Pb, Ni, y Cr	-Canteras -Minería -Sector agrícola e industrial	-Recreativo en la cuenca alta -Recurso hídrico
<b>Río Guatiquía</b>  Nace en el Páramo Chingaza desde el municipio de Quetame hasta su desembocadura al río Meta.	-Agroquímicos y fertilizantes  -Residuos de la extracción de material de arrastre	-Extracción de material de arrastre -Producción de concreto -Sector agrícola e industrial	-Riego de cultivos. -Recurso hídrico.
<b>Río Coello</b>  Nace en el nevado del Tolima y desemboca en el río Magdalena	-Gases de combustión y emisión de material particulado -Aceite quemado y derrames involuntarios de combustible	-Explotación de material de arrastre -Sector agrícola e industrial	-Recurso hídrico industrial
<b>Río Algodonal</b> Norte de Santander	-Gases y material particulado -Derrame de aceites, lubricantes, grasas, gasolina, aceite combustible para motores ACPM.	- Maquinaria utilizada para la extracción de material de arrastre -Sector agrícola e industrial	-Recurso hídrico para poblaciones cercanas en crecimiento.
<b>Río Magdalena</b> Nace en el Suroriente de Colombia	-Metales pesados Cd y Pb -Vertimientos -Agroquímicos, Pesticidas, Fertilizantes	-Sector minero -Sector agrícola e industrial	- Abastece a más del 70% de la población Colombiana
Existen reportes de alto grado de contaminación en el río Medellín, el río Bogotá y los humedales de la ciudad que requieren ser intervenidos para su recuperación			

**Tabla 1.** Tabla resumen de contaminación en algunas fuentes hídricas de Colombia. Elaboración propia. Marquez L, Meneses E, Moreno Y. 2021.

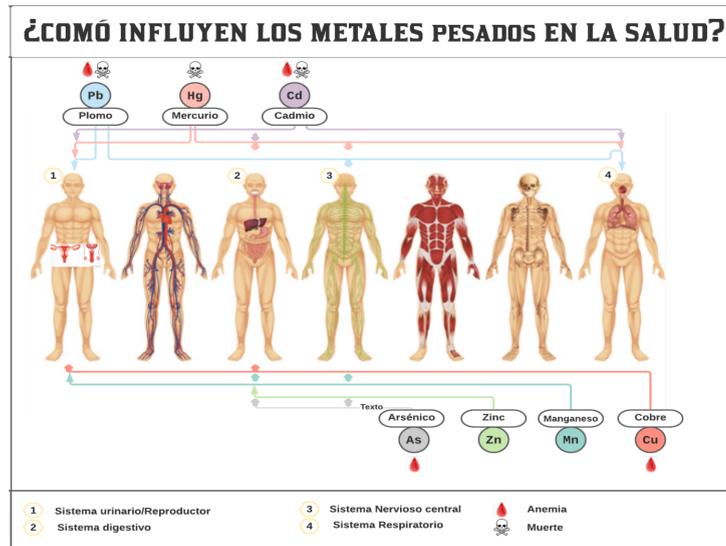
### **6.3. Impacto de los metales pesados en la salud humana**

Se ha evidenciado que, metales pesados de relevancia como el Pb, Hg, Cd, Co, Mn, Zn y Ar son utilizados en diferentes actividades, que tienen un efecto negativo en el ser humano y el medio ambiente, siendo estos los posibles causantes de múltiples enfermedades; Las cuales, pueden provocar desde síntomas leves como mareos hasta enfermedades graves, e incluso pueden causar la muerte en el ser humano y algunas especies animales, debido a su acción bioacumulable en suelos, plantas, sedimentos y organismos vivos provocando toxicidad, alteraciones metabólicas o mutagénesis. (2, 10).

Es de relevancia mencionar que, el Pb afecta al sistema reproductivo, urinario y SNC, produce anemia, enfermedades pulmonares, cáncer y muerte (2). Mientras que, el Hg se relacionado con enfermedades pulmonares e intestinales, afectación de la piel, daño al sistema urinario, sistema nervioso central (SNC), pérdida de sensibilidad en extremidades e incluso la muerte; el Cd se ha relacionado con anemia, enfermedades pulmonares e intestinales, cáncer y afectación al sistema urinario mientras que el Cu ocasiona anemia, enfermedades intestinales, afectación hepática y afectación al sistema urinario (2, 10).

Además, se ha visto que el Mn se ha relacionado con fallas hepáticas, afectación en sistema urinario, SNC, Parkinson y daño de páncreas mientras que, el Zn se ha relacionado con enfermedades intestinales, e infecciones en mucosas y por último el

As provoca anemia, enfermedades intestinales, afectación hepática, afectación al SNC, cáncer y ataxia (2, 10). Como se observa en la figura 3.



**Figura 3.** Órganos afectados por metales pesados en el ser humano. Pb, Hg, Cd, Cu, Mn, Zn Y As Construcción propia. Marquez L, Meneses E, Moreno Y. 2021

#### 6.4. Tipo de muestra de preferencia para la evaluación de la presencia de metales en fuentes hídricas

De acuerdo con Rosas H. es posible establecer que, la evaluación de metales pesados en fuentes hídricas se puede determinar a través de muestras tanto de agua como de sedimentos (36). Sin embargo, se ha observado que en las muestras de sedimentos los metales pesados suelen concentrarse más por lo que se puede afirmar que ésta última es la muestra ideal (20,32).

Este tipo de comportamiento se atribuye principalmente a la adsorción, coprecipitación y complejidad de los metales pesados en las capas más externas de las partículas de los sedimentos. Otra característica que convierte a los sedimentos en una muestra ideal es que tienen más área superficial respecto a su volumen por tal motivo, tienen la capacidad de retener más metales pesados (36). Influenciando en gran medida la textura de los sedimentos

puesto que, se puede observar una menor concentración de metales pesados en sedimentos donde la arena presenta gránulos separados o finos. Mientras que, en aquellos sedimentos donde la arena tiene gránulos más unidos se suele hallar mayor concentración de metales pesados. (20,32,36).

Por consiguiente, la concentración de metales pesados puede variar en los diferentes puntos de toma de muestra de la fuente hídrica de manera dependiente a la relación química de la materia orgánica con el metal pesado como se puede observar en la tabla 2.

Metal pesado	Relación química de la materia orgánica con el metal pesado.
Mercurio	Excelente
Cobre	Excelente
Plomo	Buena
Cromo	Buena
Níquel	Buena
Zinc	Buena
Cadmio	Aceptable
Arsénico	Aceptable

**Tabla 2.** Metales pesados y su grado de afinidad por la materia orgánica, la tabla indica el grado de afinidad que presenta el metal pesado respecto a la materia orgánica. Construcción propia. Marquez L, Meneses E, Moreno Y. 2021.

En sedimentos con alta materia orgánica se puede obtener una significativa recuperación de los metales pesados en caso de que haya presencia de estos, mientras que, el Cd y el Ar tienen una relación aceptable respecto a la materia orgánica debido a los cambios fisico-químicos.. También, se ha evidenciado una excelente relación entre los sedimentos y el Cu, por ser un compuesto que está fuertemente enlazado con la materia orgánica (36).

De igual forma. Rosas H. sugiere que los minerales de arcilla se caracterizan por ser ricos en Ni, en este orden de ideas en efluentes dónde hay baja concentración de minerales de arcilla existe la posibilidad de encontrar bajos niveles de este compuesto (36).

### **6.5. Ventajas del modelo de *C. elegans* como biomarcador ambiental**

La inclusión de biomarcadores ambientales para complementar el análisis en la presencia de algunos contaminantes como plaguicidas, metales pesados, compuestos bioacumulables y agroquímicos son valiosos en los programas de monitoreo para contaminación de aguas, permitiendo proporcionar alternativas tempranas de protección de riesgos ambientales (30,36).

Un ejemplo de biomarcador ambiental es *C. elegans* por ser un modelo mundialmente aceptado para la evaluación del impacto ambiental regulado por la normativa internacional ISO 10872:2010 (ISO, 2010) que hace referencia a la calidad del agua y la determinación del efecto tóxico en muestras de suelos y sedimentos sobre el crecimiento, la fertilidad y reproducción del nematodo. Además, cabe resaltar, la guía estándar ASTM E 2172 - 01 (2014) indicada para realizar pruebas de toxicidad del suelo en el laboratorio con el nematodo *C. elegans* (26).

Por otra parte, estudios realizados de expresión génica han demostrado que *C. elegans* puede ser apropiado al momento de evaluar contaminación por compuestos tóxicos mediante ensayos que demuestran su reacción a nivel anatómico, genético y fisiológico frente a parabenos, plaguicidas, metales pesados, entre otros. Postulando al nematodo como un biomarcador útil para evaluar el riesgo ecotoxicológico en aguas, sedimentos y suelos (42).

## **6.6. Cepas de *C. elegans* utilizadas como biomarcadores ambientales para metales pesados.**

La cepa N2 de *C. elegans* es comúnmente utilizada como control en diversos estudios ya que no posee ningún tipo de modificación genética, puesto que, desde su descubrimiento en 1968 fue congelada con el fin de establecer un stock ancestral, para posteriormente ser descongelada y cultivada en medio NGM y asegurar futuras reservas de referencia. Por lo que, es ideal para realizar otro tipo de ensayos que permitan evaluar toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas mediante ensayos de mortalidad, reproducción, alimentación y locomoción. De manera que, en presencia de altas concentraciones de metales pesados se ven afectados los parámetros fisiológicos del nematodo (43, 44).

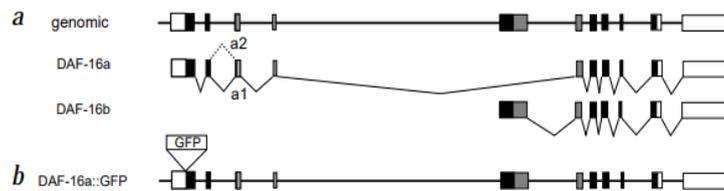
Teniendo en cuenta que un biomarcador ambiental debe ser altamente sensible y específico se considera que el nematodo *C. elegans* es un organismo modelo ideal para evaluar toxicidad por la presencia de metales pesados en fuentes hídricas, proponiendo las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 (37).

### **6.6.1. Características de la cepa transgénica TJ 356 (Daf-16::GFP)**

La cepa transgénica TJ 356 fue modificada genéticamente para permitir la localización del factor de transcripción Daf-16 mediante el uso de una proteína verde fluorescente (GFP), esto se hizo por medio de mutagénesis dirigida, basada en PCR de pGP30, plásmido que expresa Daf-16<sup>Prom</sup>::Daf-16a::gfp (45). Este plásmido contiene una transversión de adenina a timina en la posición 1747: (TTCCCGATCAGCCACTGATGG (a/t) ACTATGGATGTTGATGCATT

GA) en el ADNc de una variante de Daf-16a. Esta transversión resulta en un cambio de asparagina a valina en la posición 484 de la secuencia traducida.

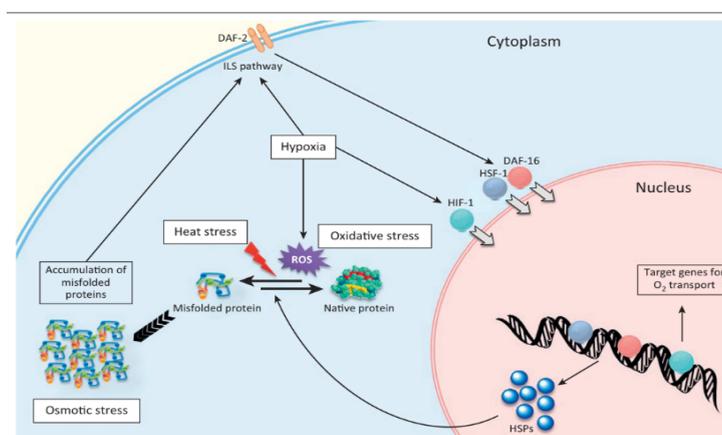
En la figura 4 se muestra la construcción de Daf 16::GFP para lo cual, se hace uso de dos constructos denominados Daf-16a y Daf-16b. En la figura 4a, se muestran las regiones codificantes (recuadros rellenos), las regiones no codificantes (recuadros vacíos) e intrones (lineales). Daf-16a presenta dos isoformas (a1, a2) las cuales se encuentran en la región hélice alfa (líneas en zigzag), lo cual difiere de Daf-16b en 6pb. En la figura 4b, se observa la construcción de Daf-16a::GFP, donde se introdujo GFP en el marco del N-terminal (46).



**Figura 4.** Construcción de Daf-16::GFP. Tomado de: Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon (46).

El factor Daf-16 cuenta con diversas funciones en el nematodo, principalmente como factor de transcripción que actúa en la vía de señalización mediada por insulina, regulando la respuesta al estrés, inmunidad innata y formación del estadio dauer en el nematodo. Así mismo, posee actividad de unión a proteínas, enzimas y ADN. Se puede afirmar que Daf-16 bajo condiciones normales se localiza en el citosol, sin embargo, cuando estas son desfavorables como hambre, calor, estrés oxidativo, hipoxia, obstaculización del crecimiento o reproducción se trasloca al núcleo y allí transcribe genes de respuesta al estrés (6, 47). Por lo tanto, la localización nuclear de Daf-16 como proteína, implica la activación de Daf-16 como gen, para proteger al organismo de factores que generan estrés en el nematodo aumentando la producción de antioxidantes (61).

Como se observa en la figura 5, una vez es provocado cualquier tipo de estrés en el nematodo se activa el receptor transmembrana Daf-2, iniciando la señalización intracelular para dirigir los factores de transcripción Daf-16 y Hsf-1 al núcleo donde se activan las proteínas de choque térmico entonces se transcriben genes de respuesta al estrés (48). Cabe resaltar que, la cepa transgénica TJ 356 ha sido utilizada en diversos estudios de toxicidad evaluando compuestos como Ba, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu y su respuesta al estrés oxidativo (9,21,32).



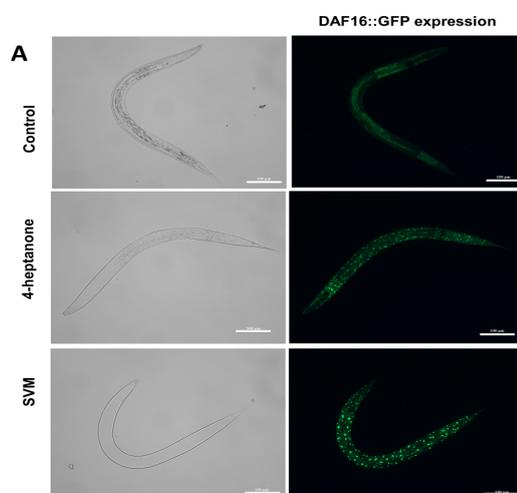
**Figura 5.** Acción de Daf-16 frente a algunos factores de estrés (estrés oxidativo, estrés osmótico, choque térmico e hipoxia). Tomado de: Rodríguez M, Basten L, Bono De M, Kammenga E (48).

### 6.6.2. Importancia de Daf-16::GFP en la evaluación toxicológica y presencia de metales pesados en fuentes hídricas

El nematodo *C. elegans* de vida libre se ha convertido en un modelo animal de gran importancia en varias áreas de estudio, como en el campo de la toxicología ambiental y genética. La cepa transgénica TJ 356 se ha empleado en diversos análisis para evaluar el efecto de compuestos volátiles orgánicos, la toxicidad de parabenos y la calidad tóxico-molecular de fuentes hídricas, (30,42,49) a causa de metales pesados como Cd, Pb, Mn, Ni y Cu (21,32).

En este orden de ideas, cabe destacar algunos estudios que afirman lo anteriormente mencionado, como el realizado por Sanadhya P *et al*, el cual plantea como objetivo observar la susceptibilidad de *C. elegans* frente a compuestos orgánicos volátiles (COV) (3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 4-heptanona y acetato de isoamilo); compuestos producidos por un hongo denominado *Daldinia cf*, que tiene posibles efectos antihelmínticos contra el nematodo *M. Javanica*, considerado una plaga en cultivos de tomate (22).

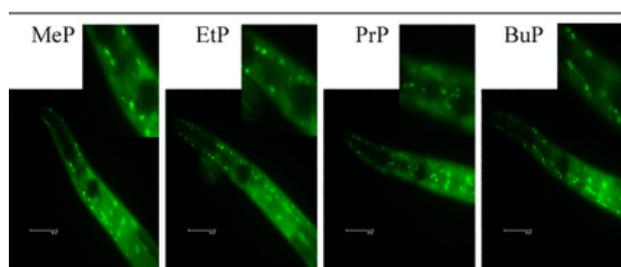
En este estudio, se hizo uso de una mezcla volátil sintética, compuesta por los cuatro COV producidos por el hongo, a una concentración conocida y los COV individuales, con la finalidad de estudiar la inducción de estrés oxidativo por parte de los COV y determinar si provocan alguna alteración en la expresión de genes de resistencia al estrés (22). Como se observa en la figura 6, la expresión de Daf-16::GFP es estimulada por la mezcla volátil sintética (SVM) y el 4-heptanone en el nematodo, por lo que permite evidenciar que al exponerlo a dichos compuestos que causan estrés, Daf-16 se trasloca al núcleo, y puede ser visualizado por la fluorescencia emitida gracias a la GFP (22).



**Figura 6.** Efectos de 4-heptanona y SVM en la localización nuclear de Daf-16 :: GFP. Tomado de: Sanadhya P, Bucki P, Liarzi O, Ezra D, Gamliel A, Braun S (22).

De esta misma manera Nagar Y et al. recalca la toxicidad provocada por parte de parabenos en el nematodo *C. elegans*, ya que estos compuestos son usados frecuentemente en la producción de conservantes para alimentos, productos de cuidado personal, farmacéuticos, entre otros. Estos parabenos se han detectado en aguas residuales, ríos y aguas superficiales, ya que pueden afectar tanto la salud humana como al medio ambiente (30).

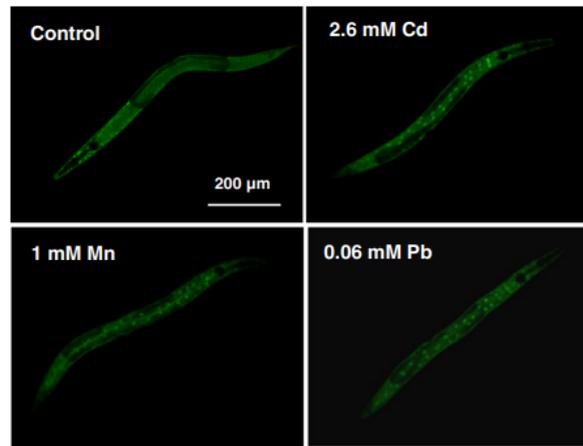
Los nematodos expuestos a parabenos evidenciaron altos niveles de (ROS) lo cual se demostró con la utilización de la cepa transgénica TJ 356 haciendo observación de la localización nuclear de Daf-16::GFP demostrando que los parabenos provocan estrés oxidativo, toxicidad y alteraciones endocrinas en el nematodo *C. elegans*, dependiendo de la concentración de estos (30). En la Figura 7, se puede observar la localización nuclear de Daf-16::GFP tras ser expuestos a los parabenos usados Mep (metilparabeno), Etp (etilparabeno), Pro (propilparabeno) y Bup (butilparabeno) (30).



**Figura 7.** Localización de Daf-16::GFP en TJ 356 frente a la exposición a parabenos MeP, EtP, PrP, BuP. Tomado de: Nagar Y, Singh R, Parveen T, Kumar D, Ravi K, Satish A (30).

Cailing Lu *et al* destaca el uso de la cepa TJ 356 de *C. elegans* como biomarcador, quien realizó un estudio donde analizó las interacciones de toxicidad de Mn, Pb Y Cd en el nematodo *C. elegans*, teniendo en cuenta parámetros como reproducción, esperanza de vida, respuesta al estrés y neurotoxicidad (1). Se observó que la exposición frente a Mn produjo en

primer lugar la translocación de Daf-16::GFP al núcleo de las células que se encuentran debajo de la cabeza y posteriormente se expandió por todo el cuerpo del nematodo a mayor concentración de Mn, cómo se puede apreciar en la figura 8 (1).

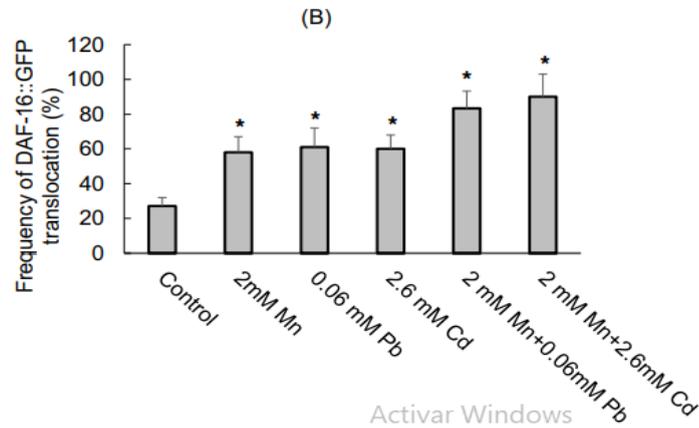


**Figura 8.** Traslocación de Daf-16 :: GFP en *C.elegans* frente a compuestos individuales de Mn, Pb y Cd. Tomado de: Lu C, Svoboda KR, Lenz KA (1).

Como hallazgo importante encontraron que la combinación de Mn+Pb indujo una toxicidad letal mientras que la mezcla de Mn+Cd indujo una toxicidad antagonista, una explicación para el primer hallazgo es que las interacciones de toxicidad entre sustancias químicas ocurren al afectar procesos clave, como es el caso del Pb que sustituye cationes como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$  de ésta manera afecta varios procesos biológicos, aparte de generar estrés oxidativo como el Mn (1).

También concluyeron que este compuesto intracelularmente se acumula dentro de las mitocondrias e interrumpe la síntesis de ATP lo que conlleva a niveles reducidos de ATP intracelularmente y aumenta el estrés oxidativo, lo cual provoca la estimulación de Daf-16, al igual que en el estudio anterior donde Daf-16 se trasloca al núcleo con la finalidad de transcribir genes de respuesta al estrés (1). Por otro lado, en la figura 9, los autores muestran

el porcentaje de translocación de Daf-16 al núcleo de manera dependiente a la concentración y tipo de metal pesado al que fue expuesto el nematodo (1).



**Figura 9.** Porcentaje de nematodos que muestran translocación de Daf-16::GFP frente a la exposición a los metales individuales y mezclas de metales. Tomado de: Lu C, Svoboda KR, Lenz KA (1).

### 6.6.3. Características de la cepa VC 128 de *C. elegans*

La cepa VC 128 hace parte del Internacional *C. elegans* Gene Knockout Consortium, fue modificada genéticamente para expresar el gen *mtl-2* ligado a la GFP, que al ser excitado por la luz UV (395 nm), emite una señal verde fluorescente (509 nm), la cual puede ser visualizada fácilmente mediante microscopía de epifluorescencia, esto con el fin de facilitar la localización de *mtl-2* al ser estimulada su expresión frente a la presencia de metales pesados (50).

Este procedimiento se realiza por medio de radiación gamma que provoca la escisión y posterior reparación del cromosoma V, donde se encuentran ubicados los genes de las metaloproteínas (*mtl-1* y *mtl-2*), durante el proceso de reparación del cromosoma, es incorporado el plásmido al ADN de los huevos del nematodo mediante co-inyección, con un gen de rescate pL15EK (vector). Para confirmar la incorporación exitosa del transgen, se

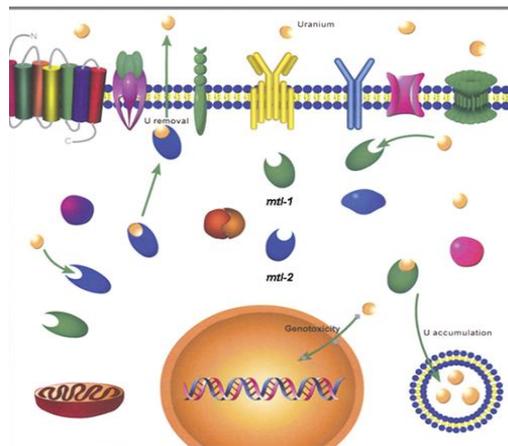
evalúa la presencia del vector por microscopía de epifluorescencia para seleccionar los individuos que muestran una mayor fluorescencia de GFP y posteriormente cruzarlos con la cepa silvestre N2 de *C. elegans* hasta obtener una progenie estable con las características deseadas. Esta incorporación es confirmada en la progenie final que es analizada por PCR para verificar la presencia del transgen *mtl-2::GFP* (44, 51).

#### **6.6.4. Metalotioneínas de *C. elegans***

Todas las cepas de *C. elegans* poseen unas proteínas conocidas como MT las cuales, han sido ampliamente estudiadas debido a su gran afinidad por los metales pesados, al expresar *mtl-1* y *mtl-2*, que son pequeñas proteínas ricas en tiol y cisteína de bajo peso molecular (75 y 63 aminoácidos respectivamente) involucradas en la protección contra agentes oxidantes, el secuestro y transporte de los metales que llegan a asimilar (58,59)

En general, la expresión de las MT es inducida cuando los nematodos se encuentran expuestos a un exceso de iones metálicos, con el fin de evitar la acumulación de metales y un mayor daño citosólico, este mecanismo funciona con ayuda de un transportador intracelular denominado *mtl-1* mientras que, la proteína *mtl-2* se le ha atribuido el rol de transportador de salida.

Por consiguiente, de acuerdo con Jiang G, quien realizó un estudio con uranio (U), un metal pesado que al ingresar a la célula se une a la proteína *mtl-1* la cual, posteriormente se encarga de retenerlo. Por el contrario, la proteína *mtl-2* se une al U con el fin de transportarlo al exterior de la célula y de esta manera evitar el estrés oxidativo y el daño celular como se muestra en la figura 10 (42,52,53).



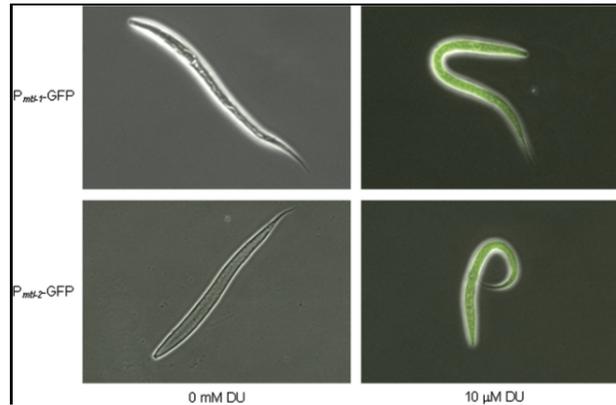
**Figura 10.** Funciones diferenciales de mtl-1 y mtl-2 e interacciones entre las MT y el Uranio. Tomado de: Jiang G , Sam Hughes , Stürzenbaum S , Evje L , Syversen T , Aschner M (52).

En concordancia con el motor de búsqueda de libre acceso PUBMED, la principal diferencia entre dichas proteínas se encuentra en el dominio C- terminal de ambas secuencias. El gen mtl-1 se encuentra ubicado en el cromosoma V, en la posición 6.691.371. 6.691.863, el cual codifica la proteína mtl-1 con una longitud de 75 aminoácidos, consta de 1 cisteína y 3 histidinas, que permite la unión a iones especialmente a Cd y Zn. Además, le confiere la capacidad de intervenir en respuesta al calor y frente a la presencia de iones metálicos, siendo mayor su expresión en intestino y faringe (57).

Mientras que la proteína mtl-2, únicamente posee una histidina terminal, tiene una longitud de 63 aminoácidos y se encuentra localizada en la posición 14.018.270 .14.018.673 del gen, cuya expresión es promovida cuando los metales se unen a las MT específicamente a Cd, Pb y Zn. Finalmente, se ha llegado a establecer que las MT de *C. elegans* actúan frente a los metales pesados de igual forma como lo harían en los mamíferos.

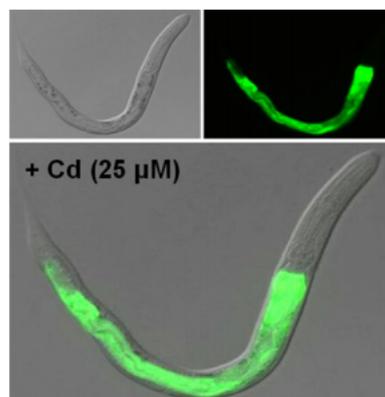
### **6.6.5. Importancia de las metalotioneínas en la evaluación de la presencia de metales pesados en fuentes hídricas**

*C. elegans* permite detectar la presencia de metales pesados al expresar las MT *mtl-1* y *mtl-2*, esta afirmación ha sido respaldada por Jiang G. el cual, usó como modelo experimental el nematodo *C. elegans* para evaluar la toxicidad dada por parte del Uranio, que es un metal pesado muy utilizado en la fabricación de armaduras, municiones y energía nuclear.



**Figura 11.** Expresión de las MT *mtl-1::GFP* y *mtl-2::GFP* en la cepa VC 128 de *C. elegans* por exposición al Uranio. Tomado de: Jiang G , Sam Hughes , Stürzenbaum S, Evje L, Syversen T, Aschner M (52).

Jiang G y colaboradores, también afirman que las MT confieren protección al nematodo frente a este compuesto lo cual, fue demostrado a través de un ensayo de RT-PCR en el que se observó una mayor regulación en la transcripción de las MT *mtl-1* y *mtl-2*, luego de la exposición al Uranio. De igual forma, cabe resaltar otro resultado de importancia en el mismo estudio donde la GFP se encuentra ligada a cada una de las proteínas permitiendo observar que la exposición a una baja concentración de Uranio (10  $\mu$ M) induce una fuerte expresión de GFP como se puede apreciar en la figura 11 (52).



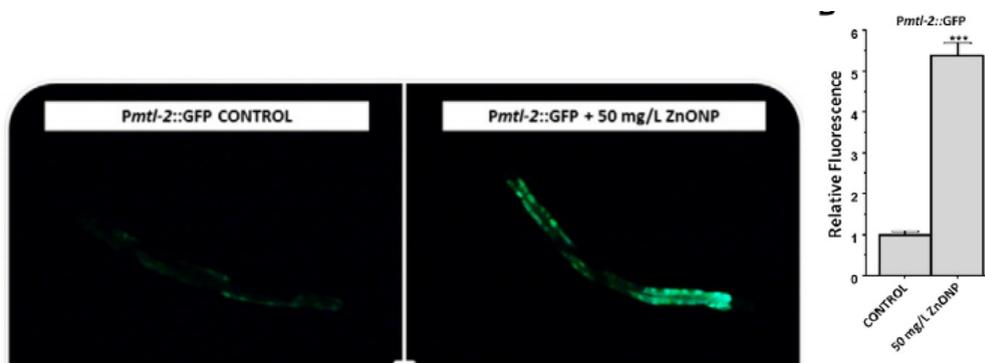
**Figura 12.** Expresión de *mtl-2::GFP* en el intestino de *C. elegans* por exposición al Cd (25uM). Tomado de: Höckner M, Dallinger R, Stürzenbaum S (13).

De igual forma, cabe mencionar el estudio realizado por Höckner M, et al donde se contrastan los mecanismos moleculares, proteicos y celulares de *mtl-1* y *mtl-2* en el nematodo *C. elegans* y en caracoles, haciendo énfasis en las funciones de las MT, en la figura 12 muestra a la MT *mtl-1* que se expresa principalmente en la faringe del nematodo y posiblemente actúa como un sensor de metales tóxicos. Mientras que, *mtl-2* no desempeña un rol significativo a nivel fisiológico en condiciones normales, sin embargo, se ve estimulado fuertemente en el intestino tras la exposición a metales pesados como se observa en el ensayo realizado con el Cd donde se evidenció, que en concentraciones bajas del metal hay una expresión insignificante mientras que, a mayor concentración se observa una expresión de *mtl-2* estadísticamente significativa en el intestino de la cepa *mtl-2::GFP* de *C. elegans* (13).

Mientras que al exponerlo al zinc (Zn) en concentraciones similares no generó cambios significativos en la expresión de las MT (13). Al igual que en otro estudio realizado por Anbalagan C, et al, donde se demuestra que las MT y fitoquelatina sintasa tienen la capacidad de conferir al nematodo protección contra las nanopartículas de óxido de Zn (47, 54,60).

Este estudio también corrobora, que la exposición al Zn genera altos niveles de radicales libres en *C. elegans* activando a su vez a las MT, por lo que se cree que están implicadas en la generación de ROS en *C. elegans*, lo cual, se confirmó haciendo uso de un colorante permeable a la célula Dichloro-dihidro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) que permite la medición cuantitativa de ROS intracelular como se puede apreciar en la figura 13 donde la mayor expresión de *mtl-2::GFP* se observa en el intestino del nematodo. Además, se observó

en el mismo estudio alteraciones en algunos parámetros fisiológicos como crecimiento, capacidad reproductiva y vida útil (47, 54).



**Figura 13.** Inducción de *mtl-2* :: GFP en respuesta al Zn. Tomado de: Polak N, Read D, Jurkchat K, Matzke M, Kelly F, Spurgeon D, et al (55). La imagen de fluorescencia muestra la inducción de *mtl-2*:: GFP en respuesta al Zn mientras que la gráfica de barras muestra la fluorescencia relativa de la metalotioneína *mtl-2*.

## CONCLUSIONES

En conclusión, de acuerdo a la investigación realizada con base en diversas fuentes de información consultadas, las fuentes hídricas mencionadas presentan una problemática de contaminación por metales pesados, generados por parte de los sectores minero, industrial, agrícola y las curtiembres al no tratar adecuadamente los desechos generados y el vertido de aguas residuales, lo cual genera un impacto negativo directamente sobre la salud humana, animal y ambiental.

*C. elegans* es un biomarcador ambiental ideal para la determinación de metales pesados en fuentes hídricas específicamente con el uso de las cepas transgénicas TJ 356 y VC 128 por permitir realizar ensayos altamente económicos y sencillos. Las cepas modificadas genéticamente de *C. elegans* permiten observar el efecto tóxico que generan los metales

pesados por medio de genes ligados a una GFP que son estimulados frente a cualquier tipo de estrés ecotoxicológico provocado en el nematodo.

Se logró evidenciar que el uso de las cepas mencionadas anteriormente permiten la evaluación de diversos compuestos potencialmente tóxicos, haciendo énfasis en los metales pesados más comunes (Cd, Hg, Cu, Ni, As, Cr, Pb, U y Zn) y los compuestos como Mn, Sn, Ba que se consideran tóxicos a altas concentraciones siendo el tipo de muestra más apropiado para los análisis en fuentes hídricas los sedimentos por tener mayor afinidad con los metales pesados al ser compuestos bioacumulables.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Lu, C., Svoboda, KR, Lenz, KA y col. Interacciones de toxicidad entre manganeso (Mn) y plomo (Pb) o cadmio (Cd) en un organismo modelo, el nematodo *C. elegans* . *Environ Sci Pollut Res* 25, 15378-15389 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1752-5>
- (2) Rota M. Torres H Explotación minera y sus impacto ambientales y en salud. El caso de Potosí en Bogotá .[internet] 2017 [citado 25 Jun 2020].Disponible en: <https://www.scielosp.org/pdf/sdeb/2017.v41n112/77-91/>
- (3) Bowen T, Ping T , Kathy S Phillip L , Jia-S et al. High-throughput assessment of toxic effects of metal mixtures of cadmium(Cd), lead(Pb), and manganese(Mn) in nematode *Caenorhabditis elegans*. *ELSEVIER* [internet] 2019. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31220657/>
- (4) Ramírez Á. Navarro Á. Análisis de metales pesados en suelos irrigados con agua del río Guatiquía. (Heavy Metal Analysis on Soils Irrigated with Water from the Guatiquía River.) *Revista ciencia en desarrollo* [Internet] 2015 vol 6.[ cited 01 Oct 2020] Available in: [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia\\_en\\_desarrollo/article/view/3787/3332](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_en_desarrollo/article/view/3787/3332)
- (5) Aguilar S, Solano G. Evaluación del impacto por vertimientos de aguas residuales domésticas, mediante la aplicación del índice de contaminación (ICOMO) en Caño Grande localizado en

Villavicencio - Meta. [Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Ambiental]. Villavicencio: Universidad Santo Tomás; 2018. Disponible en: <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/14218/2018aguilarsantiago.pdf?sequen>

(6) Garzón E, Bastidas E. Evaluación de la incidencia de los ríos Ocoa y Guatiquia sobre la calidad de agua subterránea de la vereda el Guamo, ubicada en el municipio de Villavicencio, Meta. [Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Ambiental]. Villavicencio: Universidad Santo Tomás; 2018.

(7) Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. DECRETO 3930 DE 2010. Internet. 2010. [cited 18 August 2021]. Disponible en: [https://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2010/dec\\_3930\\_2010.pdf](https://www.minambiente.gov.co/images/normativa/decretos/2010/dec_3930_2010.pdf)

(8) Sanchez A, Martinez C. Evaluación ambiental del proceso de explotación de material de arrastre en el tramo San Miguel del río Algodonal. Universidad Francisco de Paula Santander Ocaña. [Trabajo de grado para optar el título de Ingeniería Ambiental ] Ocaña, Colombia. 2020. Disponible en: <http://repositorio.ufps.edu.co/bitstream/123456789/496/1/33312.pdf>

(9) Tejada. L, Flegal.R, Odigie.K, Olivero J. Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis elegans*. Environmental Pollution [internet] 2016 [25 Mar 2021]. Available in: <https://escholarship.org/content/qt7cz8f5ww/qt7cz8f5ww.pdf>

(10) Rodríguez D. Intoxicación ocupacional por metales pesados. MEDISAN. [internet] 2017 [citado 19 Abr 2021] Available in: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30192017001200012#:~:text=Se%20define%20a%20los%20metales,las%20plantas%20y%20los%20animales](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017001200012#:~:text=Se%20define%20a%20los%20metales,las%20plantas%20y%20los%20animales)

(11) Menzel R, Suresh C, Hoess S, Claus E, Menzel E, Steinberg C, et al. Gene expression profiling to characterize sediment toxicity – a pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. BCM Genomic [internet] 2009 [cited 14 Oct 2020]. Available in: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-160>

(12) Lora, R., Bonilla, H. " Remediation of a soil contaminated with the heavy metals cadmium and chromium on the high basin of the Bogota". U.D:C.A [Internet] 2010 [Cited 23 Sept 2020] Available in: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262010000200008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262010000200008)

(13) Höckner M, Dallinger R, Stürzenbaum S. Nematode and snail metallothioneins. JBIC [internet] 2011 [cited Jun 23 2021] Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-011-0826-3>

(14) Hall, J., Hass, L., Freedman, H. Role of MTL-1, MTL-2, and CDR-1 in Mediating Cadmium Sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. Toxicol Sci [internet] 2012 [cited 07 Apr 2021]. Available in: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493192/?fbclid=IwAR0WFmW3YmMBUdFREKHFurjKoKW4nWJQdPDprx34FREF6eb2\\_qbYfulDQY8](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3493192/?fbclid=IwAR0WFmW3YmMBUdFREKHFurjKoKW4nWJQdPDprx34FREF6eb2_qbYfulDQY8)

(15) Rudel D, Douglas C, Huffnagle I, Besser J, Ingersoll C. Assaying Environmental Nickel Toxicity Using Model Nematodes. SCIELO [Internet] 2013 [cited 23 Oct 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792034/pdf/pone.0077079.pdf>

(16) Turner E, Kroeger G, Arnold M, Thornton BL, Giulio R, Meyer J. Assessing Different Mechanisms of Toxicity in Mountaintop Removal/Valley Fill Coal Mining-Affected Watershed

Samples Using *Caenorhabditis elegans*. Plos One [internet] 2013 [cited 22 Feb 2021] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24066176/>

(17) Kronberg F, Clavijo A, Aldana O, Pagano E, Munarriz E. Utilización del nematodo *Caenorhabditis elegans* en ensayos de toxicidad de muestras de agua. Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales. [internet] 2014 [cited February 2021] Disponible en: <http://www.ina.gob.ar/ifrh-2014/Eje2/2.19.pdf>

(18) Polak N, Read D, Jurkchat K, Matzke M, Kelly F, Spurgeon D, et al. Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. ELSEVIER [internet] 2014 [cited Abr 28 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045613001427>

(19) Yu L, Yan X, Ye C, Zhao H, Chen X, Hu F, et al. Bacterial Respiration and Growth Rates Affect the Feeding Preferences, Brood Size and Lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Plos One . [internet] 2015 [cited 18 Feb 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0134401>

(20) Tejada L, Oliveros J. Perfil toxicológico de los sedimentos del Río Magdalena usando como modelo biológico *Caenorhabditis elegans* UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA. SERVICIO DE PUBLICACIONES [internet].2016.[ cited 2020 Sept 23] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27343944/>

(21) Jiang Y, Chen J, Wu Y, Wang Q, Huixin L. Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. Plos One [internet] 2016 [cited February 2021] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4732754/>

(22) Sanadhya P, Bucki P, Liarzi O, Ezra D, Gamliel A, Braun S. *Caenorhabditis elegans* susceptibility to *Daldinia cf. concentrica* bioactive volatiles are coupled with expression activation of the stress-response transcription factor *daf-16*, a part of distinct nematicidal action. Plos One. [internet] 2018 [cited 09 Oct 2020]. Available in: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196870>

(23) Riddle D. *Caenorhabditis elegans* / *Daf-16*. Wormbase. [internet] 2015. [cited 2020 Oct 24] Available in: <http://www.wormbase.org/db/get name=WBGene00000912;class=Gene>

(24) Betancur J. Solaque Y. Análisis del impacto ambiental generado por la explotación de material de arrastre en el río Guatiquía en el municipio de Villavicencio – Meta: caso Mina Guatiquia Centro. S.A.S. universidad cooperativa de colombia [seminario de profundización]. Villavicencio: Universidad cooperativa de colombia ; 2019. Disponible en: [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6656/1/2018\\_analisis\\_impacto\\_ambiental.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/6656/1/2018_analisis_impacto_ambiental.pdf)

(25) Lara L. Transgénesis: una aproximación a sus riesgos y beneficios. Acta méd centro. [internet] 2021. [citado 18 Agosto 2021]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2709-79272021000100141](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2709-79272021000100141)

(26) Araceli M. Clavijo Lara. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico de estudios tóxico-moleculares para la evaluación de la calidad de aguas. [ título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias]. España: Universidad de Granada; 2017. Disponible en: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/107590/CONICET\\_Digital\\_Nro.cce60c38-e767-44fa-b524-c6de0624bba8\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/107590/CONICET_Digital_Nro.cce60c38-e767-44fa-b524-c6de0624bba8_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

(27) WormBook [internet] ed. The *C. elegans* Research Community [internet] 2005 [cited 24 Oct

2020] Available in: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html)

(28) Nass R , Hamza I The nematode *C. elegans* as an animal model to explore toxicology in vivo: solid and axenic growth culture conditions and compound exposure parameters. *Current Protocols in Toxicology* [Internet] 2007 [cited 23Sept 2020]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20922756/>

(29) Y.Wang. Phenotypic and Behavioral Defects Caused by Barium Exposure in Nematode *Caenorhabditis elegans*. Springer [internet] 2007 [cited 24Oct 2020] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17932710/>

(30) Nagar Y, Singh R, Parveen T, Kumar D, Ravi K, Satish A. Toxicity assessment of parabens in *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. [internet] 2020 [cited 30 Sept 2020]. Available in: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125730>

(31) Rieckher M , Kourtis N , Pasparaki A, Tavernarakis N. Transgénesis en *Caenorhabditis elegans*. *Methods Mol Biol*. [internet] 2009. [cited September 18 2020]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19504062/>

(32) Laino R, Mendoza R ,González M, Ramírez N, Jiménez F ,Musálem K.. Concentración de metales en agua y sedimentos de la cuenca alta del río Grijalva, frontera México-Guatemala. *SCIELO*. [internet] 2015. [cited September 18 2020]. Available in: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-24222015000400004/](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-24222015000400004/)

(33) González V. C. *Elegans* como organismo modelo en estudios de la toxicidad ambiental en agua y sedimentos. *Conference Proceeding*. [internet] 2017 [cited 24 Oct 2020] Disponible en: <http://investigacion.utmachala.edu.ec/proceedings/index.php/utmach/article/view/308/252>

(34) InSak [internet] Bogotá; 2003 [consultado 29 Mar 2021]. Disponible en: <http://insak.com.co/nuestras-lineas/analisis-de-aguas/trace2o/analizador-de-metales-pesados-portatil-hm1000/17/26/202>

(35) Corporinoquia. Seguimiento agenda ambiental año 2011 Municipio de Quetame Cundinamarca. Corporinoquia. [internet] 2011 [citado 19 Abr 2021] Available in: [https://www.corporinoquia.gov.co/files/Agenda%20Cundinamarca/AGENDA\\_AMBIENTAL\\_Q UETAME\\_2011.pdf](https://www.corporinoquia.gov.co/files/Agenda%20Cundinamarca/AGENDA_AMBIENTAL_Q UETAME_2011.pdf)

(36) Rosas H. CONTAMINACIÓN DE SEDIMENTOS DEL RIO ANOIA POR METALES PESADOS (BARCELONA - ESPAÑA). Universidad privada bolivariana. [Internet] 2005 [Cited 20 Sept 2020] Available in: <http://www.upb.edu/sites/default/files/7RosasN5.pdf>

(37) Ramón P. Sobrevivencia del nematodos *caenorhabditis elegans* expuesto al agua del río calera afectado por la actividad minera en el cantón portovelo. [Trabajo de titulación de ingeniería química]. UTMACH Facultad de ciencias Químicas y de la salud. 2020. Recuperado de: [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16286/1/T-3913\\_BRAVO%20RAMON%20PATRICIO%20FABIAN.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/16286/1/T-3913_BRAVO%20RAMON%20PATRICIO%20FABIAN.pdf)

(38) Dorado A. Zamudio A. ""identificación de la Contaminación del Río Ocoa, en el Sector del Barrio Juan Pablo II de la Ciudad de Villavicencio, en el Primer Trimestre del Año 2018 para Buscar Estrategias que Mejoren la Calidad Ambiental del Mismo"" universidad cooperativa de colombia. [Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniero Civil]. Universidad Cooperativa de colombia ;2018. Disponible en: [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/7141/1/2018\\_Identificacion\\_Contaminacion\\_](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/7141/1/2018_Identificacion_Contaminacion_)

Rio.pdf

(39) Babativa I, Caicedo J. "Evaluación de la presencia y distribución de los metales pesados Cromo, Níquel y Plomo en el río Ocoa, en la zona comprendida entre la desembocadura del caño Maizaro hasta el Puente Murujuy, municipio de Villavicencio Meta. Universidad Santo Tomas. [Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de ingeniero ambiental]. Villavicencio. 2018. Disponible en: <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/12075/2018ivonbabativa.pdf?seque>

(40) Moreno B. Analisis a la adición de recursos ortorgada al convenio interadministrativo suscrito entre empresas publicas de Cundinamarca y el Municipio de Quetame-Cundinamarca. Universidad Catolica de Colombia. [internet] 2020 [citado 19 Abr 2021] Available in: [https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/24581/1/PROYECTO\\_551400%20%281%29.pdf](https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/24581/1/PROYECTO_551400%20%281%29.pdf)

(41) Rojas V. Estudio de impacto ambiental "explotación de material de arrastre del río Coello" [internet] 2012 [cited 25 Oct 2020]. Available in: [https://cortolima.gov.co/sites/default/files/images/stories/edictos/estudio\\_imapacto\\_amb\\_coello.pdf](https://cortolima.gov.co/sites/default/files/images/stories/edictos/estudio_imapacto_amb_coello.pdf)

(42) Hughes S, Stürzenbaum S. Single and double metallothionein knockout in the nematode *C. elegans* reveals cadmium dependent and independent toxic effects on life history traits. ELSEVIER. [internet] 2007 [cited May 12 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749106003721>

(43) Enshassi A, Kochendoerfer B, Rizq E. Evaluación de los impactos medioambientales de los proyectos de construcción. SCIELO. [internet] 2014 [citado 24 Oct 2020] Disponible en : [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-50732014000300002](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-50732014000300002)

(44) Breder G. CENTRO DE GENÉTICA DE CAENORHABDITIS (CGC) Cepa N2. University of minesota. [internet] 2001 [Cited August 18 2021] Available in: [https://cgc.umn.edu/strain/N2%20\(ancestral\)](https://cgc.umn.edu/strain/N2%20(ancestral))

(45) Coleen T, Masahori T, Takashi N, Yuichi L. DAF-16/FOXO promotes taste avoidance learning independently of axonal insulin-like signaling. PLOS GENETICS. [internet] 2019 [Cited Agust 09 2021] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6668909/>

(46) Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. "Regulation of the *Caenorhabditis elegans*. Nature Publishing Group. longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling" [internet] 2001 [Cited August 09 2021] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11381260/>

(47) Anbalagan C, Lafayette I, Antoniou-Kourounioti M, Gutierrez C, Martin J, Chowdhuri D, et al. Use of transgenic GFP reporter strains of the nematode *Caenorhabditis elegans* to investigate the patterns of stress responses induced by pesticides and by organic extracts from agricultural soils. Ecotoxicology. [internet] 2012 [cited May 22 2021] Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-012-1004-2>

(48) Rodriguez M, Basten L, Bono De M, Kammenga E. "Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging". CEL PRESS. [internet] 2012 [cited Agust 09 2021] available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23428113/>

(49) Udu I, Alastair G. The Function of Metallothionein in *Caenorhabditis elegans*: is

Detoxification of Copper or of Cadmium More Important?. ResearchGate [internet] 2015. [citado 29 jul 2021] Available in: [https://www.researchgate.net/publication/290391929\\_The\\_Function\\_of\\_Metallothionein\\_in\\_Caenorhabditis\\_elegans\\_is\\_Detoxification\\_of\\_Copper\\_or\\_of\\_Cadmium\\_More\\_Important](https://www.researchgate.net/publication/290391929_The_Function_of_Metallothionein_in_Caenorhabditis_elegans_is_Detoxification_of_Copper_or_of_Cadmium_More_Important)

(50) Hongbo Ma, Travis C Glenn , Charles H. Jagoe , Kenneth L Jones , Phillip L. Williams. Una cepa transgénica del nematodo *Caenorhabditis elegans* como biomonitor de la contaminación por metales pesados. Pubmed.[internet] 2009 [cited May 12 2021] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19175297/>

(51) Universidad de Minesota. CENTRO DE GENÉTICA DE CAENORHABDITIS. Universidad de Minesota.[internet][cited May 12 2021] Available in: [https://cgc.umn.edu/strain/N2%20\(ancestral\)](https://cgc.umn.edu/strain/N2%20(ancestral))

(52) Jiang G , Sam Hughes , Stürzenbaum S , Evje L , Syversen T , Aschner M. *Caenorhabditis elegans* Metallothioneins Protect against Toxicity Induced by Depleted Uranium. Toxicological sciences. [internet] 2009 [cited May 12 2021] Available in: <https://academic.oup.com/toxsci/article/111/2/345/1642841?login=true>

(53) Boping Ye ,Qi Rui ,Qiuli Wu,Dayong Wang .Metallothioneins Are Required for Formation of Cross-Adaptation Response to Neurobehavioral Toxicity from Lead and Mercury Exposure in Nematodes. PLOS ONE .[internet] 2010 [cited May 12 2021] Available in: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014052>

(54) Anbalagan C ,Lafayette I ,Antonioni M,Haque M , King J, Johnsen B , Baillie D ,Gutiérrez C ,Rodríguez J, Pomerai D et al  
Haque M, King J, Johnsen B. ""Transgenic nematodes as biosensors for metal stress in soil pore water samples"" Ecotoxicology [internet] 2011 [cited May 29 2021] Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-011-0804-0>

(55) Polak N, Read D, Jurkchat K, Matzke M, Kelly F, Spurgeon D, et al. Metalloproteins and phytochelatin synthase may confer protection against zinc oxide nanoparticle induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. ELSEVIER [internet] 2014 [cited Abr 28 2021] Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1532045613001427>

(56) Moreno B. Analisis a la adición de recursos ortogada al convenio interadministrativo suscrito entre empresas publicas de Cundinamarca y el Municipio de Quetame-Cundinamarca. Universidad Catolica de Colombia.[internet] 2020 [citado 19 Abr 2021] Available in: [https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/24581/1/PROYECTO\\_551400%20%281%29.pdf](https://repository.ucatolica.edu.co/bitstream/10983/24581/1/PROYECTO_551400%20%281%29.pdf)

(57) Swain S, Keusekotten K, Baumeister R , Stürzenbaum S.C. *elegans* metallothioneins: new insights into the phenotypic effects of cadmium toxicosis. ELSEVIER. [internet].2004.[cited May 12 2021] Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15328611/>

(58) Jeanne H. *Caenorhabditis elegans* as a model to study molecular mechanisms of methylmercury toxicity. "" Faculty of the Graduate School of Vanderbilt University"".[internet] 2010 [cited May 12 2021] Available in: <https://ir.vanderbilt.edu/handle/1803/10424>

(59) ""Phillip L. Kevin K. Dobbin Travis C. Glenn. Robert M. Gogal, Jr. Jia-Sheng Wang. ""MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF NICKEL IN THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS"" .The University of Georgia.[internet] 2015[cited May 12 2021]

Available in: [https://getd.libs.uga.edu/pdfs/meyer\\_dean\\_v\\_201508\\_phd.pdf](https://getd.libs.uga.edu/pdfs/meyer_dean_v_201508_phd.pdf)"

(60) Hughes S, Bundy J, Want E, Kille P, Stürzenbaum S. The Metabolomic Responses of *Caenorhabditis elegans* to Cadmium Are Largely Independent of Metallothionein Status, but Dominated by Changes in Cystathionine and Phytochelatins. *J. Proteome Res.* [internet] 2009 [cited May 12 2021] Available in: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/pr9001806>

(61) Kai H. Feeding a ROS-generator to *Caenorhabditis elegans* leads to increased expression of small heat shock protein HSP-16.2 and hormesis. *BMC* [internet] 2009 [cited 24 Oct 2020] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654055/>

(62) Haroun M, Idris A, Syed O. A study of heavy metals and their fate in the composting of tannery sludge. *Waste Manag* [internet] 2007 [cited octubre 04 2020]. Available in: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17113767/>

(63) Bermeo F. Impacto Medioambiental por la explotación ilegal de Oro en el Departamento del Chocó. Universidad Militar Nueva Granada. Especialización en Finanzas y Administración Pública [internet] 2014. [citado octubre 06 2020] Disponible en: <https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/13028/EnsayoFdoYasno.pdf;jsessionid=8ADF4DA2BAF83FC2E61D410716CA1B13?sequence=1>

(64) Ardila T, Realpe E. Bioacumulación de metales pesados en odonatos de humedales de la Sabana de Bogotá: una aproximación a estos como indicadores de contaminación de ecosistemas dulceacuicolas. Laboratorio de ecología y zoología acuática de la Universidad de los Andes. [citado octubre 06 2020]. Disponible en : [https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/18737/u722322.pdf?sequence=1#:~:text=Entre%20los%20principales%20residuos%20de,elementos%20esenciales%20en%20algunos%20insectos%20.&text=2010\)%3B%20El%20cobre%20\(Cu,hacen%20parte%20de%20numerosas%20enzimas](https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/18737/u722322.pdf?sequence=1#:~:text=Entre%20los%20principales%20residuos%20de,elementos%20esenciales%20en%20algunos%20insectos%20.&text=2010)%3B%20El%20cobre%20(Cu,hacen%20parte%20de%20numerosas%20enzimas)