

C. *Elegans* como organismo modelo en estudios de la toxicidad ambiental en agua y sedimentos

C. *Elegans* as a model organism in studies of environmental toxicity in water and sediments

Víctor González, Cristhian Romero, Ricardo Domínguez, Daniel Benítez

vgonzalez@utmachala.edu.ec

RESUMEN

En esta investigación se emplea el nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico para la evaluación toxicológica de agua y sedimentos, es fácil de manipular en el laboratorio, tiene un genoma pequeño, una anatomía simple, transparente y esto lo convierte en un organismo modelo muy atractivo para estudiar los mecanismos de acción de sus genes, su funcionamiento y respuesta toxicológico. En este organismo vamos a estudiar preguntas tan diversas en toxicidad tales como, ¿Qué determina el comportamiento de un organismo? ¿Cuál es el perfil toxicológico ante un medio contaminado?, Este organismo, puede auto fecundarse o cruzarse por reproducción sexual. y puede tener cerca de 200-300 embriones transparentes que se desarrollan fuera de la madre y que pueden ser observados fácilmente. El ciclo de vida de estos animales es muy corto, con un período de embriogénesis que dura aproximadamente 14 horas y su crecimiento larvario que se completa en tres días. Cuando alcanza la madurez sexual tiene 959 células que están organizadas en epidermis, aparato digestivo, reproductor, nervioso y muscular. De acuerdo con lo expuesto, el objetivo principal de este trabajo es generar fuente de información toxicológico en medios contaminados como agua y sedimentos usando el nematodo *C. elegans* como modelo biológico.

Palabras claves: *C. elegans*, toxicidad, aguas residuales, bioindicador.

ABSTRACT

In this research the nematode *Caenorhabditis elegans* is used as a biological model for the toxicological evaluation of water and sediments, it is easy to manipulate in the laboratory, it has a small genome, a simple, transparent anatomy and this makes it a very attractive model organism for study the mechanisms of action of their genes, their functioning and toxicological response. In this organism we will study such diverse questions in toxicity as: What determines the behavior of an organism? What is the toxicological profile before a contaminated environment? This organism can self-pollinate or cross by sexual reproduction.

And can have about 200-300 transparent embryos that develop outside the mother and that can be easily observed. The life cycle of these animals is very short, with a period of embryogenesis that lasts approximately 14 hours and their larval growth that is completed in three days. When it reaches sexual maturity it has 959 cells that are organized in epidermis, digestive, reproductive, nervous and muscular systems. According to the above, the main objective of this work is to generate a source of toxicological information in contaminated media such as water and sediments using the nematode *C. elegans* as a biological model.

Keywords: *C. elegans*, toxicity, wastewater, bioindicator.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad en nuestro mundo globalizado podemos observar por doquier que existe mucha contaminación en diversos ecosistemas debido a muchos factores como las industrias que generan un sinnúmero de desechos que terminan contaminando los suelos y aguas, además de las prácticas agrícolas, aguas residuales que contienen orina, heces y residuos de lavandería; en donde, en todas ellas el ser humano es el principal protagonista. Es por ello, que es necesario tomar medidas para minimizar y erradicar la contaminación de los ecosistemas a manos del hombre.

Para ello se debe determinar el nivel de toxicidad de los ecosistemas que se han visto afectados por este problema. Debido a esto en el presente trabajo investigativo se buscará dar a conocer descriptivamente el *C. elegans* como bioindicador de los niveles de toxicidad de aguas y sedimentos; Sídney Brenner (uno de los fundadores de la Biología Molecular) consideraba que la investigación en esta área debía ser dirigida hacia algo más biológico, como el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan el desarrollo de un organismo y el funcionamiento del sistema nervioso.

Las características que presentan este organismo modelo es ser multicelular, ciclo de vida corto, fácil crecimiento en el laboratorio y con una numerosa descendencia para poder hacer estudios genéticos y estadísticos, que lo hace un excelente organismo para realizar ensayos de laboratorio orientados hacia la identificación de contaminantes tóxicos en los ambientes marinos y terrestres (Vranken *et al.*, 1985; Williams y Dusenbery, 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sincronización: Es posible sincronizar los gusanos de *C. elegans* para que inicien su desarrollo en un mismo estadio al mismo tiempo, de manera que puedan obtenerse poblaciones uniformemente desarrolladas en sus estadios larvarios.

Transferencia: Es un mantenimiento que se le da con el fin de procrear nuevos individuos o para experimentos de exposición a tóxicos, según el criterio del investigador

Ensayos toxicológicos como:

Mortalidad:

- Se lleva a cabo usando aproximadamente 10 individuos previamente sincronizados en edad L4.
- Se usan placas de cultivo celular de 96 pozos.
- Los nematodos se exponen durante 24 horas a 20 °C al extracto total y a una solución al 50% del extracto en agua miliQ, realizando cuatro réplicas.
- Para determinar el punto final se cuentan los individuos vivos y muertos al cabo de 24 horas usando un microscopio de disección.

Crecimiento:

- Se usan aproximadamente 200 individuos en edad larval L1 en dos concentraciones de los extractos acuosos
- Se realizan cuatro réplicas por tratamiento en placas de cultivo celular de 24 pozos. Como fuente de alimento se adiciona *E. coli* OP50.
- Después de 72 horas de exposición fue medida usando el microscopio de disección LW Scientific con un aumento de 4x/0.10.

Reproducción:

- Se evalúan los *C.elegans* L4 después de 72 h de exposición a los extractos acuosos.
- Se coloca un adulto joven en un plato con agar K, *E. coli* OP50 y 300 mL de solución de extracto.
- Después de 72 horas se cuentan el número de crías en todas las etapas larvales y se realizan cuatro réplicas para cada tratamiento.

Locomoción:

- Se evalúa el comportamiento en la locomoción de los nematodos después de la exposición a dos concentraciones de los extractos durante 24 horas.

- Cada nematodo N2 en etapa L4 se transfiere a un pocillo que contiene 60 μ l de medio K en la parte superior del agar.
- Después de 1 min, fue registrado el número de veces que el cuerpo se dobla en un intervalo de 20 s.
- Se observa el curvamiento de los nematodos como un cambio en la dirección de la parte que corresponde a la vulva superior de la faringe a lo largo del eje Y.

Estrés oxidativo:

- Los nematodos se cultivan en placas de agar K y luego se lavan usando medio K enfriado con hielo.
- Se colocan alícuotas iguales (10 μ L) de *C. elegans*, en todas las etapas de cada cepa en micro placas negras de 96 pozos, no fluorescentes junto con las muestras de extractos y agua ultra filtrada y cuatro réplicas para cada tratamiento.
- Se incuban las placas a 20 °C durante 4 y 24 h.
- Se deja reposar en hielo durante 15 minutos
- Se cuantifica la fluorescencia mediante el uso de un lector de placas Perkin-Elmer Víctor 1420, usando filtros de paso de banda a 485 y 525 nm para la excitación y emisión, respectivamente.

DISCUSIONES

La toxicidad de los sedimentos y agua ha sido ampliamente estudiada en esteros, ríos, en diferentes escalas y a través de diversos modelos biológicos y puntos finales o toxicológicos. A continuación, se muestran algunos trabajos de años recientes. En un estudio de la toxicidad, los *C. elegans* silvestres expuestos a los extractos de los sedimentos superficiales del estero Huaylá de la Parroquia de Puerto Bolívar, mostraron efectos en la mortalidad, crecimiento, locomoción y reproducción, destacándose las estaciones D y E, como las de mayor mortalidad promedio, las muestras recolectadas en las estaciones A, B, D y G, con una reducción en la frecuencia de curvamiento del cuerpo, G, H e I como las de mayor disminución en la longitud del cuerpo, F con mayor efecto en el tamaño de la progenie y la estación I con las mayores sobre expresiones de los genes *mtl-2* y *sod-4* (González, 2017).

Efectos tóxicos en *C. elegans*

Mortalidad

La mortalidad, el crecimiento la reproducción y la locomoción son indicadores directo del grado de toxicidad que puede ejercer una sustancia sobre un organismo vivo; por ello se sugiere su uso durante la ejecución de bioensayos orientados al conocimiento de este aspecto. En tal sentido los resultados de exposición durante 24 horas para mortalidad, locomoción y reproducción y para crecimiento 3 días, de los especímenes de *C. elegans* a los extractos de los sedimentos experimentales, que se muestran en la figura evidencian el efecto negativo que estos ejercen sobre la supervivencia de este nematodo; principalmente cuando son sometidos a los extractos totales de cada estación de muestreo, destacándose las estaciones D y E, como las de mayor mortalidad promedio (18%).

Toxicidad

La toxicidad de sedimentos contaminados de varias cuencas fluviales de Europa fue estudiada utilizando modelos biológicos de tres niveles tróficos diferentes. Los ensayos de toxicidad fueron realizados usando *Lumbriculus variegatus oligochaete*, *C. elegans*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Chironomus riparius*, *Danio rerio* y *Vibrio fischeri*.

Los resultados mostraron mayor riesgo tóxico para los sedimentos contaminados en comparación con los sedimentos de referencia correspondientes, sin embargo, hubo diferencias en la sensibilidad de las especies (Tuikka et al., 2011). En otro estudio, el erizo *Arbacia spatuligera* fue usado en ensayos de fecundación para evaluar la toxicidad de sedimentos de cuatro puertos chilenos. La presencia de HAPs y MPs mostró ser sinérgica y estar correlacionada con la ausencia de fecundación encontrada (Aguirre et al., 2009).

Por otro lado, la toxicidad de los sedimentos del Río Ebro fue estudiada mediante el uso de las bacterias foto-luminiscentes *Vibrio fischeri*. Las respuestas tóxicas encontradas demostraron una fuerte relación con los niveles de contaminantes en la zona (Ocampo et al., 2008).

En un trabajo in vitro con hepatocitos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se evaluó la toxicidad de sedimentos de los Ríos Sava y Krupa (Eslovenia) con múltiples puntos finales, tales como citotoxicidad, inhibición metabólica, daño en el ADN, estrogenicidad y actividad 7-O-etoxiresorufina de etilasa (EROD). Los bioensayos permitieron discriminar entre sedimentos contaminados y menos contaminados para citotoxicidad, inhibición metabólica y la inducción de la actividad de la EROD, aunque no se observó aumento en el daño del ADN (Tollefsen et al., 2006).

En un estudio piloto, *C. elegans* fue usado para evaluar los efectos de los sedimentos de tres ríos alemanes con diferentes niveles de MPs y contaminantes orgánicos, Rin, Danubio y Elba, en la reproducción y patrón de expresión génica de *C. elegans*. Hubo inhibición del 50% de reproducción en los nemátodos expuestos a los sedimentos del Rin y el Elba.

El patrón de expresión génica de los gusanos expuestos a sedimentos del Elba coincidió con los expuestos a PCB52 en otro estudio (Menzel et al., 2009). En otro ensayo con los sedimentos del Elba, se evaluaron como puntos finales la longitud del cuerpo, el número de huevos dentro de los gusanos, el porcentaje de gusanos grávidas, y el número de crías por gusano (Traunspurger et al., 2006). Asimismo, *C. elegans* fue expuesto a 26 diferentes sedimentos de cuerpos de agua dulce no contaminados para evaluar el efecto del tamaño de partícula en el desarrollo. Los puntos finales evaluados fueron la longitud del cuerpo, número de huevos por gusano, y el porcentaje de gusanos grávidos.

Se encontró una correlación débil de la longitud del cuerpo con la distribución del tamaño de las partículas, lo que indicó que los nemátodos se desarrollan mejor en los sedimentos más gruesos. El número de huevos por gusano y el porcentaje de grávidos mostró variación relativamente alta entre los tratamientos (Höss et al., 2009b).

A nivel de Latinoamérica no se han desarrollado muchos estudios relacionados con la toxicidad de sedimentos de ríos. Algunos trabajos que se pueden mencionar son el estudio efectuado a los sedimentos del Río Ceará (Brasil), en el que se encontró fuerte contaminación con Al, Cu, Cr y Zn y alta toxicidad a través de ensayos con plancton marino mostraron (Nilin et al., 2007).

En el estudio de los sedimentos del Río Bío (Chile) usando *Oncorhynchus mykiss*, en las estaciones de muestreo impactadas por vertidos de la industria petroquímica, se encontraron altas concentraciones de HAPs, actividad del gen CYP1A1 (relacionada con la presencia de HAP) y daño genotóxico (Inzunza et al., 2006).

Por otro lado, en el Río Paraná (Argentina) se utilizó la *Hyaella curvispina* como bioindicador de la toxicidad de los sedimentos, hallándose que las principales perturbaciones detectadas se presentaron en el sector medio de la cuenca, donde prevalecen aportes de materia orgánica de las diversas actividades combinadas, donde los sedimentos inducen alta letalidad, y una fuerte reducción consecuente de la comunidad bentónica población y la diversidad (Peluso et al., 2013).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados se puede obtener como resultados un perfil toxicológico en agua y sedimentos de estero, ríos y lagos usando el nematodo *C. elegans* como modelo biológico, identificando los efectos en los extractos acuosos sobre la reproducción, mortalidad, crecimiento y locomoción del *C. elegans*, así como los cambios sobre la expresión de genes asociados con choque térmico, estrés oxidativo, exposición a metales y respuesta a xenobióticos, empleando cepas del nematodo N2, no sólo como línea base para estudios temporales comparativos, sino como soporte científico para que los tomadores de decisiones puedan establecer estrategias que contribuyan con la conservación de esteros, ríos, como herramienta para garantizar la sostenibilidad del país y el presente y futuro de sus ciudadanos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bascietto, J., Hinckley, D., Plafkin, J. & Slimak, M. (1990). Ecotoxicity and ecological risk assessment. Regulatory applications at EPA. Part 1. *Environmental Science and Technology*, 24(1), 10-15.

Besser, J., Brumbaugh, W., Allert, A., Poulton, B., Schmitt, C. & Ingersoll, C. (2009). Ecological impacts of lead mining on Ozark streams: Toxicity of sediment and pore water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 516-526.

Byerly, L., Cassada, R. & Russel, R. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 51(1), 23-33.

Camilion, M., Manassero, M. & Hurtado. (2003). copper, lead and zinc distribution in soils and sediments of the south-western coast of the Rio de la plata estuary. *Journal of Solis and Sediments*, 3(3), 213-220.

Candido, E. & Jones, D. (1996). Transgenic *Caenorhabditis elegans* strains as biosensors. *Trends Biotechnol*, 14(4), 125-129.

Carballo, O., Arencibia, G., Concepción, J. & Isla, M. (2010). Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos. *Revista de Toxicología en línea*, 33-69.

Chapman, P., Long, E., Swartz, R., DeWitt, T. & Pastorok, R. (1991). Sediment toxicity test, sediment chemistry and benthic ecology do provide new insights into the significance and management of contaminated sediments-A reply to Robert Spies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(1), 1-4.

Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W. & Steinberg, C. (1999). Growth and fertility of *Caenorhabditis elegans* (nematoda) in unpolluted freshwater sediments: Response to particle size distribution and organic content. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), 2921-2925.

Ingersoll, C. (1995). Sediment Test. En G. Rand, *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. CRC Press.

Menzel, R., Swain, SC., Höss, S., Claus, C., Menzel, S., Steinberg, C., Reifferscheid, G. & Stürzenbaum, S. (2009). Gene expression profiling to characterize sediment toxicity—A pilot study using *Caenorhabditis elegans* whole genome microarrays. *BMC Genomics*, 10, 160.

Navarro, R. (2003). El nematode *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio del desarrollo. *Revista Mensaje Bioquímico*, 3(27).

Olivero-Verbel, J; Güette-Fernandez, J. & Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 419-427.

Peluso, M. (2012). *Evaluación de efectos biológicos y biodisponibilidad de contaminantes en sedimentos del Río de la Plata y afluentes*. La Plata: Repositorio UNLP.

Tejeda, L. & Olivero-Verbel, J. (2016). *Perfil toxicológico de los sedimentos del río Magdalena usando como modelo biológico Caenorhabditis elegans*. Sevilla: Universidad Internacional de Andalucía.

Tejeda, L., Flegal, R., Odigie, K. & Olivero-Verbel, J. (2016). Pollution by metals and toxicity assessment using *Caenorhabditis elegans* in sediments from the Magdalena River, Colombia. *Environmental Pollution*, 212, 238-250.

Tejeda, L. & Olivero-Verbel, J. (2016). *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 237, 1-35.

Tollefsen, K., Finne, E., Romstad, R. & Sandberg, C. (2006). Effluents from oil production activities contain chemicals that interfere with normal function of intra- and extra-cellular estrogen binding proteins. *Mar. Environ. Res.*, 62, 191-194

Traunspurger W. & Drews C. (1996). Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: a review. *Hydrobiologia*, 328, 215–261.