



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS
EFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***

LETICIA ASUCENA ALCARAZ GARCETE

Foz de Iguazú

2022

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS EFECTOS
TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***

LETICIA ASUCENA ALCARAZ GARCETE

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latino-Americano Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de grado en Biotecnología.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Priscilla Arantes.

Foz de Iguazú

2022

LETICIA ASUCENA ALCARAZ GARCETE

**EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS EFECTOS
TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al
Instituto Latino-Americano Ciencias de la Vida y de
la Naturaleza de la Universidad Federal de la
Integración Latinoamericana, como requisito
parcial para la obtención del título de grado en
Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leticia Priscilla Arantes
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Mtr. Larissa Marafiga Cordeiro
UFSM

Foz de Iguazú, 29 de Julio del 2022.

TÉRMINO DE PRESENTACIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS

Nombre completo del autor(a): Leticia Asucena Alcaraz Garcete

Curso: Biotecnología

	Tipo de Documento
(X) graduación	(.....) artículo
(.....) especialización	(X) trabajo de conclusión de curso
(.....) maestría	(.....) monografía
(.....) doctorado	(.....) disertación
	(.....) tesis
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuales
	(.....) _____

Título del trabajo académico: Evaluación del efecto protector de la rutina frente a los efectos tóxicos inducidos por atrazina en *Caenorhabditis elegans*

Nombre del orientador(a): Prof^a. Dr^a. Leticia Priscilla Arantes

Fecha de Defensa: 29 / 07 / 2022

Licencia no exclusiva de Distribución

El citado autor:

a) Declara que el documento presentado es su trabajo original y que tiene derecho a otorgar los derechos contenidos en esta licencia. Asimismo, declara que la entrega del documento no infringe, hasta donde es posible saber, los derechos de cualquier otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material sobre el cual no posee los derechos de autor, declara que ha obtenido la autorización del titular de los derechos de autor para otorgar a UNILA – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana los derechos requeridos por esta licencia, y que este material cuyos derechos pertenecen a terceros está claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento presentado se basa en un trabajo financiado o respaldado por una institución distinta a la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, declara haber cumplido con las obligaciones exigidas por el respectivo contrato o convenio.

Como titular de los derechos sobre el mencionado contenido, el autor autoriza a la Biblioteca Latinoamericana – BIUNILA a poner a disposición la obra, de forma gratuita y de acuerdo con la **Licencia Creative Commons 3.0 Unported**.

Foz de Iguazú, 29 de Julio del 2022.

Firma del Responsable

A mis preciados padres
Carlos y Lucia, y mi querido
hermano Alan, dedico este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida y la naturaleza.

A mis padres, Lucía y Carlos, los maestros de mi vida, por el apoyo incondicional de ambos, por los valores que me inculcaron, por los ánimos, consejos, enseñanzas, por nunca rendirse conmigo a pesar de las veces que yo quise rendirme, y por sobre todo, por el amor que siempre me demuestran. A mi hermano Alan, por la amistad, el apoyo y los consejos dados en los momentos más acertados.

A mi profesora y orientadora Dr^a Leticia Priscilla Arantes, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ella. Le agradezco por todas las valiosas enseñanzas, consejos, y correcciones, por toda la paciencia que tuvo conmigo al enseñarme a trabajar con este maravilloso animal, *C. elegans*. Por la pasión que tiene con su trabajo, por ser de esas personas que te inspiran a ser mejor, que te hacen amar la ciencia. También por el apoyo emocional y los momentos y risas compartidas a lo largo de estos meses.

Al Laboratorio de Neuroprotección y Neurotoxicología Experimental de la Universidad Federal de Santa María (UFSM) por la donación de los *C. elegans* y la rutina utilizada en este trabajo, y a la Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos, por la donación de la atrazina.

A todos mis profesores del curso de Biotecnología, por las enseñanzas de calidad dentro y fuera del ámbito biotecnológico, en especial a los profesores Cristian, Carla y Danúbia, que en cada clase impartían enseñanzas con una pasión inigualable.

Al Prof. Dr. Michel Passarini, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su proyecto en el 2019, y con ello iniciarme en la investigación científica. Agradezco todas las enseñanzas que recibí de su parte.

Al Prof. Dr. Cristian Rojas y la Mtr. Larissa Cordeiro, por aceptar mi invitación para ser los evaluadores de este trabajo, y por cada una de sus valiosas correcciones.

A mis mejores amigos, Rafa, Iara y Paola, quienes siempre estuvieron apoyándome y acompañándome, por la amistad incondicional, por los consejos en los momentos más oportunos y por los momentos de risas y diversión. También a mis amigos Ruby, Clarice y Puni, por el apoyo, consejos y risas. A Ariel por las enseñanzas en cálculo y su apoyo.

A los compañeros del curso de biotecnología quienes alguna vez extendieron su mano para ayudarme, en especial a Sarita, Cecilia, Bruno, Dahiana y Analía, con quienes compartí muchos momentos que hicieron que la facultad sea un lugar agradable.

A Fernando, Giseli y Emma por la ayuda que recibí de sus partes con cuestiones

técnicas en el laboratorio. A las señoras de la limpieza, quienes siempre me saludaban.

A mis mascotas siamecito, negrito, blancanieves y glotoncito, quienes indudablemente ayudaron a que yo pueda llegar hasta el final de mi carrera, aliviando los días pesados con cariño incondicional, y especialmente a mi gorda, quien estuvo ronroneando siempre a mi lado mientras estudiaba o escribía mi TCC.

Al Parque Tecnológico Itaipú (PTI) – Paraguay, por haberme apoyado económicamente por medio de una beca de 5 años. Agradezco la confianza que depositaron en mí.

Por último, agradezco a la Universidad Federal de la Integración Americana, por abrirme sus puertas y haberme proporcionado una enseñanza de calidad.

ALCARAZ GARCETE, Leticia Asucena. **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS EFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***. 64 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso II (Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, Foz de Iguazú, 2022.

RESUMEN

La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado para el control de malezas, y, desde su introducción al mercado, ha sido asociado con disrupción endócrina, neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y estrés oxidativo en múltiples organismos. En la búsqueda por compuestos que puedan presentar un efecto protector frente a los efectos tóxicos de la atrazina se encuentra la rutina, un flavonoide conocido por sus diversas propiedades farmacológicas, entre ellas, actividad neuroprotectora. Sin embargo, hasta el momento, no existen estudios evaluando el efecto protector de este flavonoide frente a los efectos tóxicos de la atrazina. En el presente trabajo fue investigado el efecto protector de la rutina frente los efectos tóxicos de la atrazina, utilizando al nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Para ello, primeramente se utilizaron tres concentraciones de atrazina: 2000, 3000 y 4000 μM , para comprobar la toxicidad de la atrazina en estos gusanos por medio de ensayos de sobrevivencia, desenvolvimiento, reproducción y comportamiento. Seguidamente, los gusanos fueron pre-tratados con 15, 30, 60 y 120 μM de rutina por 1 h, y luego fueron expuestos por 48 h a la mayor concentración de atrazina, para verificar si hubo un efecto protector mediante los ensayos de desenvolvimiento y comportamiento. Los resultados obtenidos en los ensayos para constatar la toxicidad de la atrazina indicaron una ausencia de letalidad, ningún efecto en la reproducción, retraso en el desenvolvimiento y reducción en la locomoción en todas las concentraciones probadas, siendo la concentración 4000 μM en donde se produjeron efectos más severos. El pre-tratamiento de los gusanos con las diferentes concentraciones de rutina no revertió el retraso en el desenvolvimiento, contrariamente, las concentraciones 30, 60 y 120 μM mejoraron la locomoción de los gusanos al aumentar la tasa de *thrashes* en 20 s en comparación a los gusanos expuestos a la atrazina que no fueron tratados con rutina. Tales resultados comprueban la toxicidad de la atrazina, por medio de posibles mecanismos de disrupción neuroendócrina y neurotoxicidad, esta última mediante desregulación del sistema serotoninérgico, así como el efecto protector de la rutina frente a la toxicidad producida por la atrazina, probablemente por un efecto neuroprotector

mediante la regulación del sistema serotoninérgico, demandando investigaciones posteriores para comprobar las citadas suposiciones acerca de los mecanismos envueltos en los efectos de estas sustancias, en *C. elegans*.

Palabras-clave: Atrazina; Rutina; Toxicidad; *Caenorhabditis elegans*; flavonoide.

ALCARAZ GARCETE, Leticia Asucena. **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS EFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***. 64 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso II (Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, Foz de Iguazú, 2022.

ABSTRACT

Atrazine is a widely used herbicide for weed control, and since its introduction to the market, it has been associated with endocrine disruption, neurotoxicity, reproductive toxicity and oxidative stress in multiple organisms. In the search for compounds that may have a protective effect against the toxic effects of atrazine, rutin, a flavonoid known for its various pharmacological properties, including neuroprotective activity, is an alternative. However, so far, there are no studies evaluating the protective effect of this flavonoid against the toxic effects of atrazine. In the present work, the protective effect of rutin against the toxic effects of atrazine was investigated using the nematode *Caenorhabditis elegans* as an experimental model. For this, first, three concentrations of atrazine were first used: 2000, 3000 and 4000 μM , to verify the toxicity of atrazine in these worms through survival, development, reproductive and behavior tests. Next, the worms were pre-treated with 15, 30, 60 and 120 μM rutin for 1 h, and then they were exposed for 48 h to the highest concentration of atrazine, to verify if there was a protective effect through the development and behavior tests. The results obtained in the atrazine toxicity tests indicated an absence of lethality, no effect on reproduction, delayed development and reduced locomotion at all concentrations tested, with the most severe effects occurring at 4000 μM concentration. Pre-treatment of worms with the different concentrations of rutin did not reverse the delay in development, nevertheless, the concentrations 30, 60 and 120 μM improved the locomotion of the worms by increasing the rate of thrashes in 20 s compared to worms exposed to atrazine that were not treated with rutin. The data obtained in this work proves the toxicity of atrazine, through possible mechanisms of neuroendocrine disruption and neurotoxicity, the latter through dysregulation of the serotonergic system, as well as the protective effect of rutin against the toxicity produced by atrazine, probably by a neuroprotective effect through the regulation of the serotonergic system, demanding further research to verify the aforementioned assumptions about the mechanisms involved by these substances, in *C. elegans*.

Keywords: Atrazine; Rutin; Toxicity; *Caenorhabditis elegans*; flavonoids.

ALCARAZ GARCETE, Leticia Asucena. **EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA RUTINA FRENTE A LOS EFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR ATRAZINA EN *Caenorhabditis elegans***. 64 páginas. Trabajo de Conclusión de Curso II (Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latino-Americana, Foz de Iguazú, 2022.

RESUMO

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas e, desde sua introdução no mercado, tem sido associado à desregulação endócrina, neurotoxicidade, toxicidade reprodutiva e estresse oxidativo em vários organismos. Na busca por compostos que possam ter efeito protetor contra os efeitos tóxicos da atrazina, encontra-se a rutina, um flavonoide conhecido por suas diversas propriedades farmacológicas, incluindo atividade neuroprotetora. Porém, até o momento, não há estudos avaliando o efeito protetor desse flavonoide contra os efeitos da atrazina. No presente trabalho, investigou-se o efeito protetor da rutina contra os efeitos tóxicos da atrazina, utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. Para isso, primeiramente foram utilizadas três concentrações de atrazina: 2000, 3000 e 4000 μM , para verificar a toxicidade da atrazina nestes vermes por meio de testes de sobrevivência, desenvolvimento, reprodução e comportamento. Em seguida, os vermes foram pré-tratados com rutina 15, 30, 60 e 120 μM por 1 h, e então foram expostos por 48 h à maior concentração de atrazina, para verificar o efeito protetor através de testes de desenvolvimento e comportamento. Os resultados obtidos nos testes para verificar a toxicidade da atrazina, indicaram ausência de letalidade, nenhum efeito sobre a reprodução, atraso no desenvolvimento e locomoção reduzida em todas as concentrações testadas, sendo a concentração 4000 μM onde os efeitos mais severos foram produzidos. O pré-tratamento dos vermes com as diferentes concentrações de rutina não reverteu o atraso no desenvolvimento, mas, as concentrações 30, 60 e 120 μM melhoraram a locomoção dos vermes aumentando a taxa de *thrashes* em 20 s em relação ao aqueles vermes expostos à atrazina que não foram tratados com rutina. Estes resultados provam a toxicidade da atrazina, através de possíveis mecanismos de desregulação neuroendócrina e neurotoxicidade, esta última através da desregulação do sistema serotoninérgico, bem como o efeito protetor da rutina contra a toxicidade da atrazina, provavelmente através de um efeito neuroprotetor através da regulação do sistema serotoninérgico, exigindo investigações posteriores para comprovar as suposições referidas sobre os mecanismos nos efeitos destas substâncias, em *C. elegans*.

Palavras-chave: Atrazina; Rutina; Toxicidade; *Caenorhabditis elegans*; flavonóide.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Representación molecular de la atrazina	21
Figura 2 - Mecanismo de acción de la atrazina	22
Figura 3 - Representación molecular de la rutina	26
Figura 4 - Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	29
Figura 5 - Proceso de repique de <i>C. elegans</i>	36
Figura 6 - Protocolo de sincronización	38
Figura 7 - Comparación antes y después de la sincronización	39
Figura 8 - Etapas de la preparación para los bioensayos de los grupos expuestos a la atrazina	40
Figura 9 - Etapas de la preparación para los bioensayos de los grupos pre-tratados con rutina	42
Figura 10 - Morfología de la vulva en <i>C. elegans</i>	43
Figura 11 - Disolución de la cutícula de <i>C. elegans</i> por lisis alcalina	44
Figura 12 - Descripción gráfica del <i>thrash</i> de <i>C. elegans</i>	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentaje de sobrevivencia de <i>C. elegans</i> frente a la atrazina	46
Gráfico 2 – Progreso del desarrollo de los gusanos de cada grupo en el ensayo de desenvolvimiento	48
Gráfico 3 – Media de número de huevos en el útero luego de la exposición a la atrazina	51
Gráfico 4 – Efecto de la atrazina sobre la locomoción de <i>C. elegans</i>	53
Gráfico 5 – Efecto del pre-tratamiento con rutina sobre la disminución en la locomoción de <i>C. elegans</i>	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 – Propiedades físico-químicas de la atrazina	23
Tabla 2 – Composición de la atrazina comercial de marca Nortox	34
Tabla 3 – Media de las tres replicatas obtenidas en el ensayo de desenvolvimiento con los gusanos pre-tratados con rutina	49

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
ATZ	Atrazina
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CL ₅₀	Concentración Letal Media
EH	Enfermedad de Huntington
K ₂ HPO ₄	Fosfato Dipotásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotásico
KPO ₄	Fosfato de Potasio
LB	Caldo de lisogenia, del inglés: <i>Lysogen broth</i>
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de Sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Disódico
NGM	Medio de Crecimiento Nematoide, del inglés: <i>nematoid growth medium</i>
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza
IBAMA	Instituto Brasileño del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés: <i>reactive oxygen species</i>
UNILA	Universidad Federal de la Integración Latino-Americana

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	19
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	21
2.1. ATRAZINA	21
2.2. RUTINA	25
2.3. <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. OBJETIVO GENERAL	32
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. METODOLOGÍA	33
5.1. LOCALIDAD DE TRABAJO	33
5.2. CEPAS DE <i>Caenorhabditis elegans</i> Y <i>Escherichia coli</i>	33
5.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	33
5.3.1. Medio Caldo de Lisogenia LB	33
5.3.2. Medio Crecimiento Nematode NGM	33
5.3.3. Tampón M9	34
5.3.4. Soluciones	34
5.3.4.1. Solución acuosa de atrazina	34
5.3.4.2. Solución etanólica de rutina	35
5.3. MANUTENCIÓN DE LA <i>Escherichia coli</i>	35
5.3. CULTIVO Y MANUTENCIÓN DEL <i>Caenorhabditis elegans</i>	35
5.4. SINCRONIZACIÓN CRONOLÓGICA DEL <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
5.5. ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀) DE LA ATRAZINA	39
5.6. PRE-TRATAMIENTO CON RUTINA Y POSTERIOR EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA	40
5.7. BIOENSAYOS	42
5.7.1 Ensayo de sobrevivencia	42
5.7.2. Ensayo de desenvolvimiento	42
5.7.3. Ensayo de número de huevos en el útero	43
5.7.4. Ensayo de locomoción (<i>thrashing assay</i>)	44
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1. ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL ₅₀) DE LA ATRAZINA	46
6.2. BIOENSAYOS	47
6.2.1. Ensayo de sobrevivencia	47
6.2.2. Ensayo de desenvolvimiento	47
6.2.3. Ensayo de número de huevos en el útero	50
6.2.4. Ensayo de locomoción	52
7. CONSIDERACIONES FINALES	57
REFERENCIAS	59

1. INTRODUCCIÓN

La atrazina es un herbicida sistémico selectivo que actúa como un inhibidor fotosintético, y es aplicado para el control de malezas en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, soja y trigo (YUANXIANG *et al.*, 2014). Es uno de los herbicidas más utilizados por los agricultores. En Brasil, se sitúa en el cuarto lugar según datos del Boletín Anual del Instituto Brasileño del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (IBAMA, 2020). Desde su introducción en la agricultura, se han venido documentando sus efectos tóxicos tanto para el ecosistema como para la salud humana: (i) han sido detectados tanto su forma parental como sus metabolitos, además de en zonas cercanas a su aplicación, en aguas subterráneas, ríos, mares e incluso hielo del ártico (MARTINS *et al.*, 2018; SILVEYRA, 2019; CHERNYAK *et al.*, 1996), y particularmente, en el estado de São Paulo, la atrazina fue el analito más detectado en distintas muestras de agua potable, y el segundo más presente en muestras de aguas de ríos (MONTAGNER *et al.*, 2014); (ii) en anfibios, provoca estrés oxidativo, afecta el tiempo de metamorfosis de renacuajos, y causa hermafroditismo y feminización en machos (ROHR & McCOY, 2010), en peces *african catfish* interrumpió el proceso embrionario y retrasó la eclosión con severas deformidades en las larvas (OPUTE & OBOH, 2020), en ratones C57BL/6 provocó neurotoxicidad disminuyendo significativamente los niveles de serotonina de la corteza perirrinal (LIN *et al.* 2014); (iii) en lo que respecta a humanos, estudios epidemiológicos evidenciaron alteraciones en las hormonas envueltas en el ciclo menstrual en mujeres (CRAGIN *et al.*, 2011), reducción de la calidad del semen de la población masculina próxima al áreas de exposición a este herbicida (SWAN, 2006).

A la vista de las evidencias de los efectos tóxicos de la atrazina, se hace necesaria la búsqueda de compuestos que presenten un efecto protector frente a ello. Entre la vasta diversidad de compuestos con propiedades benéficas dentro del reino vegetal, se encuentra la rutina, un compuesto bioflavonoide presente en especies de trigo sarraceno, pasiflora, manzanos y planta de té (HOSSEINZADEH & NASSIRI-ASL, 2014). Este compuesto posee actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinógena, antitumoral y neuroprotectora, entre otras propiedades, las cuales han sido evidenciadas en estudios *in vivo* e *in vitro* (PATEL & PATEL, 2019). Empero, se presenta una escasez de estudios en relación a su efecto protector frente a herbicidas, y, concretamente ante la atrazina, no existe ningún dato publicado ni documentado hasta el momento.

Siendo así, emerge la necesidad de investigación del efecto protector de la

rutina ante la atrazina. En virtud de la similitud de genes y vías de señalización con los seres humanos, además de su fácil manipulación, bajo costo de manutención, y su morfología transparente que permite el uso de marcadores fluorescentes, el nematodo *Caenorhabditis elegans* se establece como un excelente modelo para toxicológicos y farmacológicos (ARANTES, 2012; DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Delante de todo lo expuesto, el presente trabajo evaluará el efecto protector de la rutina ante los efectos tóxicos provocados por el herbicida atrazina, en el nematodo *C. elegans*, frente a parámetros de sobrevivencia, desenvolvimiento, reproducción y comportamiento.

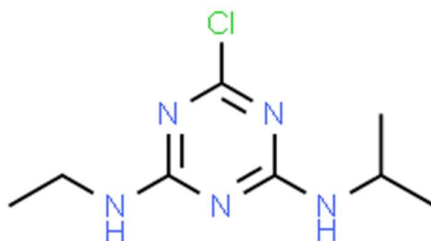
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ATRAZINA

Los herbicidas son vastamente utilizados en la producción agrícola para controlar las plantas indeseadas que compiten con el cultivo por luz y nutrientes. Sin embargo, existen preocupaciones serias asociadas a los riesgos que presentan estos compuestos al ecosistema y a la salud humana, en virtud de su lenta degradación, razón por la cual se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, y por su naturaleza tóxica (FLORES-GARCÍA *et al.*, 2011, OVALLES *et al.*, 2014). Entre los herbicidas más utilizados por los productores agrícolas a nivel mundial, se encuentra la atrazina. En Brasil, se sitúa en el cuarto lugar según datos del Boletín Anual del Instituto Brasileño del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (IBAMA, 2020).

La atrazina (6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (figura 1) es un herbicida sistémico selectivo, fue patentado en Suiza en el año 1958. Es ampliamente usado en E.E.U.U., Australia, Sudáfrica, Venezuela y la mayoría de los países europeos desde principios de la década de 1960, para controlar la aparición de malezas en cultivos, principalmente de maíz, sorgo, caña de azúcar, soja, trigo, ananá y varios tipos de pasturas, y el crecimiento de malezas acuáticas en lagos y estanques (GAGNETEN *et al.*, 2021).

Figura 1 – Representación molecular de la atrazina

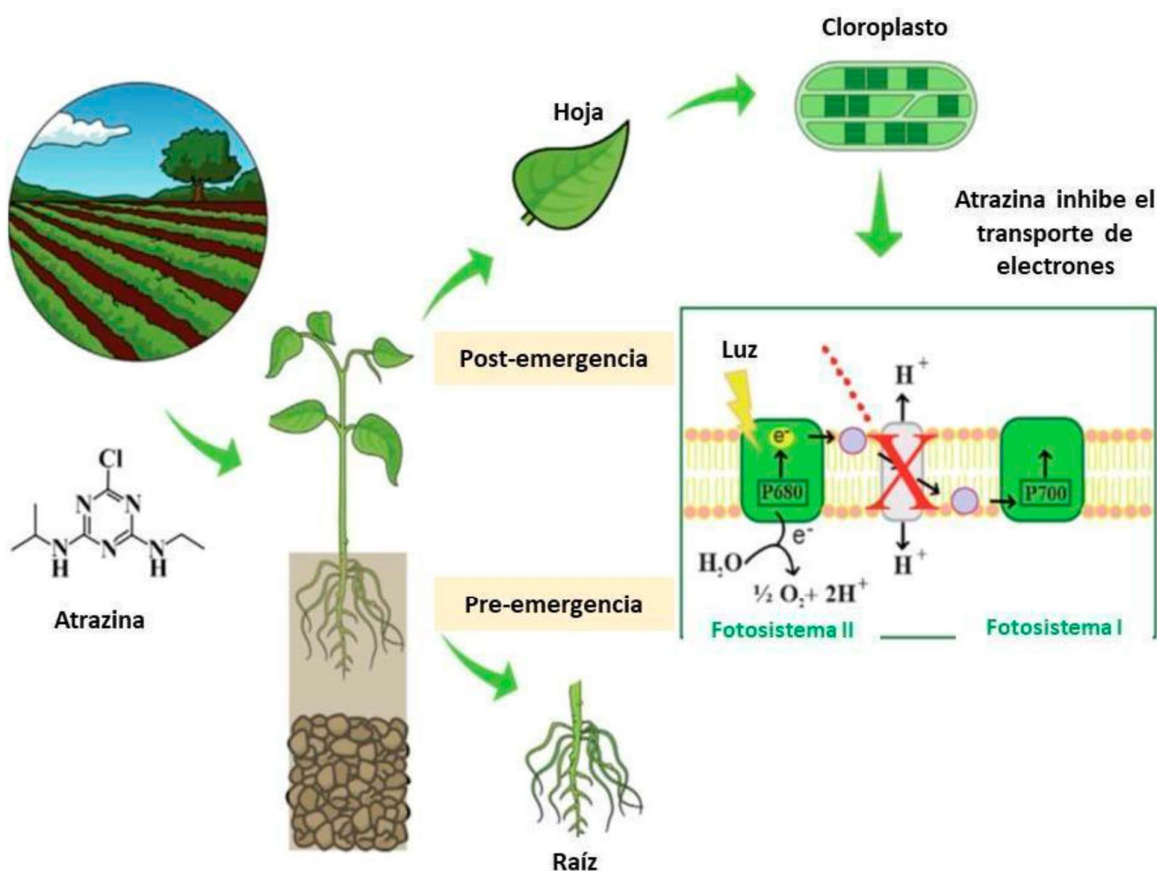


Fuente: PubChem.

El ingreso de la atrazina a la planta se produce principalmente por las raíces, translocándose a través del xilema con la corriente de transpiración y acumulándose en los meristemas apicales y hojas. El mecanismo de acción de este herbicida (Figura 2) es mediante el bloqueo del transporte de electrones del fotosistema II durante la reacción de

Hill, lo que provoca la inhibición de la síntesis de hidratos de carbono, la acumulación de dióxido de carbono dentro de la hoja, la peroxidación de lípidos en las membranas, la destrucción de la clorofila y reducción de la reserva de carbono, lo que además deriva en el daño de estomas y en la inhibición de la transpiración (GAGNETEN *et al.*, 2021; MARCHI *et al.*, 2008).

Figura 2 – Mecanismo de acción de la atrazina



La atrazina es absorbida por las raíces de las malezas durante la pre-emergencia, mientras que en la post-emergencia, la absorción ocurre a través de las hojas. La atrazina inhibe el transporte de electrones en el fotosistema II. **Fuente:** GAGNETEN *et al.*, 2021.

Debido a sus propiedades físico-químicas, la atrazina no se adsorbe fuertemente a sedimentos y es poco soluble en agua. Por ello, en las formulaciones comerciales son añadidos excipientes que le confieren una alta solubilidad en agua. Dependiendo de las características del suelo, condiciones climáticas y concentración utilizada, presenta una vida media de 2 a 6 meses (SYLVEYRA, 2019; JABLONOWSKI *et al.*, 2011). La tabla resume 1 sus propiedades físico-químicas:

Tabla 1 – Propiedades físico-químicas de la atrazina

Propiedad	Valor
Presentación	Sólido
Olor	Inodoro
Color	Blanco, incoloro
pH a 18,5°C	6,27
Densidad a 25°C (g ml ⁻¹)	1,23
Solubilidad en agua a 20°C (mg L ⁻¹)	35
Punto de ebullición (°C)	Se descompone antes de la ebullición

Fuente: GAGNETEN *et al.*, 2021.

La relativamente alta solubilidad en el agua y baja absorción en el suelo, así como la elevada persistencia es la causa frecuente de encontrar atrazina en cuerpos de agua (HANSEN *et al.*, 2013).

A causa del crecimiento exponencial del uso de atrazina, han sido dispersados ampliamente tanto su forma parental como sus metabolitos, presentando un grado variable de persistencia y toxicidad en el ambiente (SYLVEIRA, 2019). Por ello, se hicieron necesarios estudios para el impacto de este herbicida sobre organismos no alvo. A continuación se describen sus efectos tóxicos sobre distintas especies en estudios de laboratorio:

- En experimentos conducidos en el insecto acuático *Chironomus tentans*, concentraciones superiores a 230 µg/L, redujeron la eclosión, y produjeron desarrollo larvario aberrante, así como la disminución de pupas (DEWEY, 1986; MACEK *et al.*, 1976);
- En peces *zebrafish*, concentraciones menores que 30 µg/L de atrazina provocó una disminución significativa en el recambio de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el tejido cerebral de hembras adultas (WIRBISKY *et al.*, 2015); en peces *African catfish*, exposiciones a 4, 8, 12 y 16 µg/L indicaron que la atrazina interrumpió el proceso embrionario y retrasó

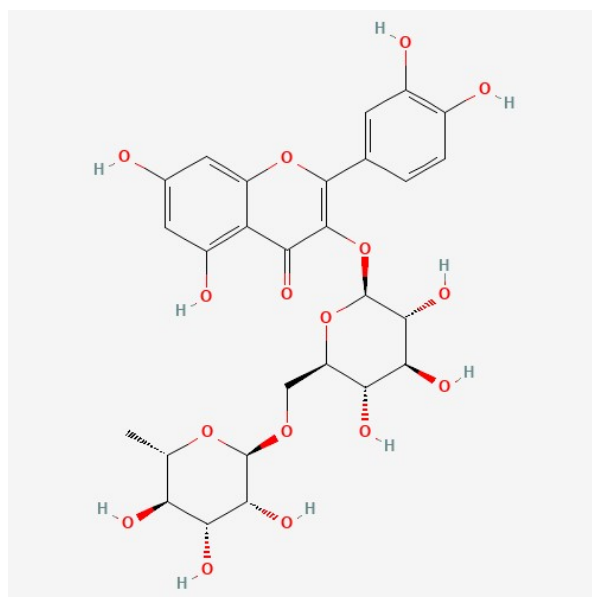
la eclosión com deformidades severas de las larvas (OPUTE & OBOH, 2020);

- En ranas de la especie *Xenopus laevis*, los machos expuestos a la atrazina sufrieron una depresión en los niveles de testosterona, disminución del tamaño de las glándulas reproductivas, desarrollo laríngeo desmasculinizado/feminizado, comportamiento de apareamiento suprimido, espermatogénesis reducida y fertilidad disminuida (HAYES *et al.*, 2009);
- En codornices japonesas (*Coturnix japonica*), la administración oral de atrazina durante 45 días a dosis de 0 a 500 mg/kg de peso corporal, resultaron en una disminución significativa en la ingesta de alimento, en el peso corporal, en el recuento de eritrocitos, en la hemoglobina y en los valores de hematocrito en comparación con el control. Asimismo, los testículos de las aves tratadas con atrazina eran comparativamente más pequeños (HUSSAIN *et al.*, 2011);
- En ratas Sprague-Dawley, tratamiento con 10 mg/kg a madres desde el día 1 de gestación hasta el día 21 postnatal, provocó alteraciones moderadas en el funcionamiento motor, redujo significativamente las concentraciones estriatales de dopamina (DA) y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), lo que sugiere que la exposición a la atrazina tiene el potencial de alterar las neuronas DA nigroestriatales y los comportamientos asociados con el funcionamiento motor (WALTERS, *et al.* 2015). En otro experimento, ratas Sprague-Dawley alimentadas con atrazina a 10, 70, 500 y 1000 ppm en la dieta durante 2 años mostraron una reducción del consumo de alimentos, aumento de peso corporal, anemia, disminución de la glucosa en sangre y triglicéridos a 500 y 1000 ppm (MAYHEW, 1986). En ratas Fischer 344/LAT1, hubo un aumento de tumores mamarios benignos en machos, un aumento de los tumores uterinos malignos en las hembras y un aumento de los tumores del sistema hematopoyético. Es posible que el tratamiento con atrazina haya afectado el equilibrio hormonal, ya que los tumores de la glándula mamaria y del útero pueden ser tumores dependientes de hormonas (PINTER *et al.* 1990).

La exposición humana a la atrazina probablemente ocurre a través del agua potable, con concentraciones de bebida entre 0,01 y 5 µg/L, independientemente de si se vive en una zona urbana o rural. La detección de atrazina en fluidos corporales humanos, incluidos fluido folicular, fluido de esperma y moco cervical, así como estudios que muestran una asociación con el nacimiento de bebés prematuros y pequeños para la edad gestacional, respalda su potencial para afectar negativamente la salud reproductiva humana. Los efectos sobre el sistema reproductivo están corroborados por la evidencia de estudios en animales que muestran que la atrazina tiene efectos disruptores endocrinos en múltiples clases de animales, incluidos anfibios, peces, reptiles y roedores (HARPER *et al.*, 2020).

2.3. RUTINA

Químicamente, la rutina (figura 3) es un glucósido de flavonol que se sintetizan principalmente en las plantas superiores; los protegen de la radiación ultravioleta dañina y de varios ataques patógenos. La rutina se encuentra en las plantas y sus partes, incluidas las frutas cítricas como el limón, la naranja, la lima y la toronja. Los espárragos, el trigo sarraceno, los frutos y flores del árbol Pagoda, el fruto del árbol Fava D'anta y bayas como la morera (*Morus alba*) y la ruda (*Ruta graveolens*) son algunas otras fuentes. El trigo sarraceno se considera una de las mejores fuentes dietéticas de rutina. La rutina se detectó por primera vez en *R. graveolens* y está mayormente presente en las plantas, pero rara vez está presente en la porción comestible. La rutina es uno de los flavonoides dietéticos más comunes consumidos regularmente por los seres humanos en forma de verduras, frutas y bebidas de origen vegetal como el vino y el té (PATEL & PATEL, 2019; HOSSEINZADEH & NASSIRI-ASL, 2014).

Figura 3 – Representación molecular de la rutina

Fuente: PubChem.

La rutina tiene distintos usos: en la industria farmacéutica, es utilizada como antioxidante y colorante, así como en las industrias de alimentación animal, cosmética y química. Además, también es utilizada como conservante de alimentos, estabilizador y absorbente de rayos UV. La rutina también está presente en varias medicinas herbales y preparaciones multivitamínicas disponibles en el mercado (TYSZCZUK, 2009; KIM *et al.*, 2005; PATEL & PATEL, 2019).

La rutina tiene varias actividades farmacológicas que incluyen antialérgica, antiinflamatoria, antitumoral, antibacteriana, antiprotozoaria, hipolipemiente, citoprotectora, antiespasmódica, anticancerígena, antiplaquetaria, antiviral, antiulcerogénica, antitrombótica, vasoprotectora y antihipertensiva (PATEL & PATEL, 2019). A continuación, se citan algunos estudios realizados demostrando algunas de sus propiedades farmacológicas:

- Efectos en el sistema antioxidante: La dieta de ratas conteniendo 1% de rutina, por 20 días, demostró un aumento en el nivel de antioxidantes hepáticos en la rata (GAO *et al.*, 2003); en ratas Wistar suplementadas con rutina por 7 semanas, aumentó el contenido de glutatión en el hígado, redujo el daño oxidativo en el hígado y el bazo (medido por el contenido de γ -cetoaldehído) y redujo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en el corazón (PATEL & PATEL, 2019);

- Efectos ante trastornos sanguíneos: los resultados de un estudio llevado a cabo por Fernandes y colaboradores (2010) sugieren que la rutina puede mejorar la hiperglucemia y la dislipidemia mientras inhibe la progresión de la disfunción hepática y cardíaca en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina; el efecto de la rutina a una dosis de 200 mg/kg p.o. en la diabetes tipo I en ratones, se encontró que la administración crónica de rutina redujo la prevalencia de diabetes y previno significativamente, pero no completamente, el desarrollo de hiperglucemia en ratones (SRINIVASAN *et al.*, 2005);
- Efectos ante el cáncer: Se estudió la actividad antiangiogénica de la rutina utilizando la formación de capilares inducida por células de melanoma B16F-10 en ratones C57BL/6, y se comprobó que la administración de rutina inhibía significativamente el número de capilares dirigidos por el tumor inducido al inyectar células de melanoma B16F-10 en el lado ventral de ratones C57BL/6. Además, la rutina fue capaz de inhibir la proliferación, la migración y la formación de tubos capilares de las células endoteliales humanas, que son los pasos clave de la angiogénesis (PATEL & PATEL, 2019);
- Efectos en el sistema nervioso central: Se investigaron los efectos de la rutina a 50mg/kg sobre el deterioro de la memoria espacial y la muerte neuronal inducidos por la isquemia cerebral repetida en ratas, y se descubrió que la rutina mejoraba el deterioro de la memoria espacial y la muerte neuronal en el área CA1 del hipocampo (PU *et al.*, 2007; PATEL & PATEL, 2019);
- Efectos en el sistema cardiovascular: se comprobó en modelos in vivo de isquemia (ratas wistar machos) que la rutina reducía significativamente el infarto de miocardio y la peroxidación lipídica, lo que probablemente se debía a la supresión del estrés oxidativo (ALI *et al.*, 2009).

La actividad farmacológica de la rutina también ha sido explorada en el modelo animal *Caenorhabditis elegans*:

- Se evaluó el efecto de la rutina sobre el metabolismo de los ácidos grasos y la actividad antioxidante, y los resultados indicaron que la rutina redujo el almacenamiento de grasa en función de la regulación de la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de los lípidos y, por tanto, de la regulación de la biosíntesis del correspondiente ácido graso insaturado (QIN

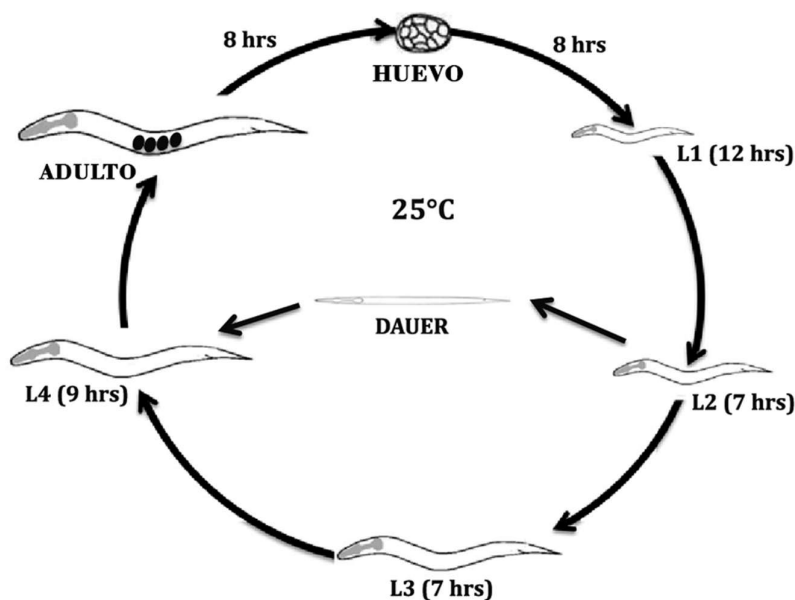
et al., 2021);

- Se investigó los efectos de la rutina en el modelo EH (enfermedad de Huntington) de *C. elegans*. Los resultados demostraron que el tratamiento crónico con rutina redujo la agregación de la proteína poliglutamina (polyQ) en el músculo, redujo la muerte neuronal mediada por polyQ en las neuronas sensoriales de ASH y prolongó la vida útil, mediante actividad antioxidante, la activación de la degradación de proteínas (autofagia) y las vías de señalización insulina/IGF1 (IIS). Estos hallazgos indican que el consumo de rutina podría ser útil para prevenir la EH (CORDEIRO *et al.*, 2020);
- Kampkötter y colaboradores (2007), estudiaron los efectos de los flavonoides quercetina y rutina en *Caenorhabditis elegans*. Encontraron que ambos flavonoides redujeron la acumulación de ROS en caso de estrés térmico y el grado de estrés oxidativo inducido.

2.4. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre introducido como organismo modelo en el mundo científico por Sidney Brenner en 1965. Es un nemátodo de suelo, cilíndrico, no segmentado, no parásito ni patogénico, y mide aproximadamente 1 mm de largor y 80 µm de diámetro en edad adulta (RIDDLE *et al.* 1997; BRENNER, 1974; ARANTES; 2016).

El *C. elegans* de tipo salvaje tiene dos formas sexuales: hermafroditas autofecundadas y machos, sin embargo, la cantidad de machos es mucho menor (~0,2%). Tienen un ciclo de vida corto (Figura 4) de aproximadamente 21 días. La hermafrodita grávida expulsa el huevo y, tras la eclosión, pasa por cuatro estadios larvarios, L1, L2, L3, L4 hasta llegar al estado adulto. Los hermafroditas adultos se autofecundan, iniciando un nuevo ciclo vital. Si los gusanos en la fase L1 son sometidos a condiciones adversas, como la privación de alimentos, pueden entrar en un estado de diapausa durante un máximo de 4 meses (larva Dauer). Cuando se restablecen las condiciones favorables, los animales reanudan su desarrollo (DE OLIVEIRA, 2019).

Figura 4 – Ciclo de vida de *C. elegans*

Fuente: adaptado de Pandey (2014).

Los *C. elegans* hermafroditas poseen 302 neuronas en su sistema nervioso, mientras que los machos poseen 79 neuronas adicionales. Cada neurona tiene una combinación de propiedades únicas, como la morfología, conectividad y posición, para que cada neurona pueda recibir una clasificación única. Fue el primer animal a tener su sistema nervioso completamente mapeado (WHITE *et al.*, 1986). Utilizan los mismos neurotransmisores presentes en mamíferos: acetilcolina, ácido gamma amino butírico, glutamato, dopamina, serotonina y numerosos neuropéptidos (WHITE *et al.*, 1986; ARANTES, 2016).

Hay muchos atributos que hacen de *C. elegans* un modelo animal tan exitoso y con un número creciente de publicaciones en biología del desarrollo, genética, neurociencias, envejecimiento y ecotoxicología (MOTA *et al.*, 2001):

- Su corto ciclo de vida permite realizar estudios relacionados con la longevidad en un espacio de tiempo prácticamente impracticable en los modelos clásicos de mamíferos (DE OLIVEIRA, 2019);
- Numerosas posibilidades relacionadas con la genética, ya que cerca del 60% de sus genes tienen ortólogos en humanos (KALETTA & HENGARTER, 2006). Esto abre puertas para el estudio de enfermedades humanas;

- La gran cantidad de cepas *knockout* y transgénicas existentes permite que análisis genéticos simples y de bajo costo sean realizadas (ARANTES, 2016);
- Gracias a su rápida reproducción, corto ciclo de vida y alto número de progenie por gusano, se consigue obtener una gran cantidad de stock. Por esta razón ofrece un mayor valor estadístico, debido al manejo de grandes cantidades de stock en relación a otros modelos biológicos como por ejemplo, ratones. Esto aumenta la fiabilidad de los resultados (DE LA MAZA, 2016);
- El mantenimiento y manipulación de este nemátodo en el laboratorio es bastante simple debido a su pequeño tamaño y simplicidad. En condiciones controladas, es mantenido en medio sólido (agar) o líquido, con *Escherichia coli* como fuente de alimento, generalmente a 20°C (BRENNER, 1974; ARANTES, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado en la agricultura, y en el Brasil, según datos del IBAMA, se sitúa entre los herbicidas más vendidos. Existe una amplia gama de resultados adversos para la salud que han sido descubiertos y estudiados con respecto a la exposición a la atrazina en muchos modelos animales: la exposición directa e indirecta a este herbicida provoca estrés oxidativo, inmunotoxicidad, neurotoxicidad, efectos reproductivos y de desarrollo, efectos endócrinos, genotóxicos y carcinógenos (FAN, 2014; STRADTMAN & FREEMAN, 2021). En lo que respecta a la salud humana estudios epidemiológicos revelan alteraciones hormonales y reproductivas (SWAN, 2006; CRAGIN *et al.*, 2011); además se constató neurotoxicidad en células de neuroblastoma dopaminérgico humano SH-SY5Y estimulados con atrazina (MA *et al.*, 2015).

Sustancias con efecto protector frente a la toxicidad inducida por la atrazina implicarían beneficios para la salud humana. La rutina, un flavonoide glucósido presente en frutas y verduras, posee varias propiedades farmacológicas, las cuales han sido evidenciadas por medio de estudios realizados con diversos modelos animales experimentales, incluido el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se conoce que posee actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticarcinógena, antitumoral y neuroprotectora, entre otras propiedades (PATEL & PATEL, 2019; HOSSEINZADEH & NASSIRI-ASL, 2014).

La cantidad de estudios demostrando el efecto protector de la rutina frente a la toxicidad de la atrazina es nula, hasta la fecha. Por ende, este trabajo pretende establecerse como un punto de partida para estudios relacionados a la actividad protectora de la rutina frente a la toxicidad de la atrazina, y contribuir con los datos obtenidos a futuras investigaciones similares.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la rutina en la protección contra la toxicidad inducida por la atrazina en el modelo *Caenorhabditis elegans*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos de la atrazina sobre la sobrevivencia, locomoción y desenvolvimiento de *C. elegans*;
- Verificar los efectos de las concentraciones de rutina sobre la sobrevivencia, locomoción y desenvolvimiento de *C. elegans* expuestos a atrazina.

5. METODOLOGÍA

5.1. LOCALIDAD DE TRABAJO

Todas las etapas relacionadas al cultivo y manutención, así como los distintos ensayos realizados con el nemátodo *C. elegans*, fueron llevados a cabo en los laboratorios Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular (Lab G009), mientras que las observaciones posteriores fueron realizadas en el mismo laboratorio, así como en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental (Lab G011), ambos ubicados en el Campus Jardín Universitario de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana.

5.2. CEPAS DE *Caenorhabditis elegans* Y *Escherichia coli*

La cepa de *C. elegans* utilizada en este proyecto fue la cepa salvaje N2, la cual fue cedida por el Laboratorio de Neuroprotección y Neurotoxicología Experimental de la Universidad Federal de Santa Maria (UFSM).

Para el alimento de los gusanos, fue empleada la bacteria *E. coli* cepa OP50, ampliamente utilizada en los protocolos de manutención del *C. elegans* cepa N2, debido a su crecimiento limitado por ser auxotrófico de uracilo, que, como resultado, no se forma una capa gruesa, el cual es útil para los ensayos realizados con este nemátodo (STIERNAGLE, 2011).

5.3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

5.3.1. Medio Caldo de Lisogenia LB

La bacteria *E. coli* OP50, fuente de alimento de los gusanos, fue mantenida en medio caldo de lisogenia LB (líquido). Para los fines de este trabajo, fue preparado con 0,025 g/mL de polvo LB ajustada para 20 mL de agua destilada. Luego de pasar por el autoclave y estar más frío, fue añadida 20 µL de sulfato de estreptomicina 100 mg/mL y 20 µL de nistatina. El frasco fue mantenido en la heladera a 4° C, hasta su uso.

5.3.2. Medio Crecimiento Nematode NGM

El medio de crecimiento de nematodos (NGM) es el medio estándar para el mantenimiento de *C. elegans* (BRENNER, 1974). Fue preparado con 2,5 g/L de peptona; 3 g/L de NaCl; 17 g/L de agar bacteriológico; para 1 L de agua destilada. Después de haberse autoclavado, y una vez que haya perdido suficiente calor, fue suplementado con 1 mL/L de CaCl₂ 1 M; 1 mL/L de MgSO₄ 1 M; 25 mL/L de tampón KPO₄ 1 M; 1 mL de solución

de colesterol 5 mg/mL de etanol 95%; 1 mL/L nistatina; 1 mL/L de sulfato de estreptomicina 100 mg/mL. El frasco fue almacenado en la heladera a 4° C, hasta su uso.

5.3.3. Tampón M9

Otro componente utilizado en todos los protocolos con *C. elegans* es el tampón M9. Este tampón no presenta toxicidad para los nematodos y es empleado para su crecimiento, como medio para distintos ensayos, o como buffer de lavado, entre otras aplicaciones.

El tampón M9 fue preparado con las siguientes sales: 3 g/L de KH_2PO_4 ; 6 g/L de Na_2HPO_4 ; 5 g/L de NaCl y 1 L de agua destilada. Seguidamente, fue llevado al autoclave, y, al haberse enfriado, se adicionó 1 mL/L de MgSO_4 1 M. El frasco fue conservado en la heladera a 4° C.

5.3.4. Soluciones

Las distintas soluciones utilizadas en este trabajo fueron preparadas de la siguiente manera: CaCl_2 1 M (3,675 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mL de agua destilada); MgSO_4 1 M (6,162 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mL de agua destilada); KPO_4 1 M (108,3 g de KH_2PO_4 , 35,6 g de K_2HPO_4 , 1 L de agua destilada); colesterol 5 mg/mL (0,125 g de colesterol, 25 mL de 95% etanol); sulfato de estreptomicina 100 mg/mL (2 g de sulfato de estreptomicina, 20 mL de agua destilada); nistatina 12500 UI. Todas las soluciones fueron almacenadas en la heladera a 4° C, excepto la nistatina y sulfato de estreptomicina, las cuales fueron congeladas en alícuotas de 2 mL.

5.3.4.1. Solución acuosa de atrazina

La atrazina comercial utilizada en este trabajo, de marca Nortox, fue donada por la Prof^a. Dr^a. Rafaella Costa Bonugli Santos (UNILA). Presenta la siguiente composición:

Tabla 2 – Composición de la atrazina comercial de marca Nortox

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
6-chloro-N2-ethyl-N4-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (ATRAZINA)	900,00 g/kg (90,0% m/m)
Otros ingredientes	100,00 g/kg (10,0% m/m)

Fuente: prospecto del producto.

Se preparó una solución madre de 5000 μM (0,010 g de atrazina, 10 mL agua destilada), de la cual se realizaron diluciones en agua destilada para obtener las distintas concentraciones de trabajo: 2000 μM , 3000 μM y 4000 μM . La solución madre fue almacenada a temperatura ambiente y protegida de la luz.

5.3.4.2. Solución etanólica de rutina

La rutina sintética en polvo utilizada en este trabajo fue donada por el Laboratorio de Neuroprotección y Neurotoxicología Experimental de la Universidad Federal de Santa Maria (UFSM).

Una solución madre de 12 mM (0,007 g de rutina, 1 mL de etanol absoluto) fue preparada y de ella se obtuvieron las diferentes concentraciones mediante diluciones en etanol absoluto: 6 mM, 3 mM y 1,5 mM. Estas soluciones fueron almacenadas a temperatura ambiente. De ellas fueron retiradas alícuotas para obtener las concentraciones finales de trabajo, se explicará apropiadamente el proceso en la sección 5.6. de este trabajo.

5.3. MANUTENCIÓN DE LA *Escherichia coli*

Las bacterias utilizadas para la alimentación de los gusanos fueron mantenidas en medio caldo de lisogenia LB. Una colonia de *E. coli* OP50 de una placa stock con LB sólido fue transferida al medio líquido LB previamente preparado. Se llevó a la estufa a 37° C, por 24 h para su crecimiento. Al concretar las 24 h, se trasladó a la heladera a 4° C para su almacenamiento. Fueron realizados repiques a cada 4 semanas, o cuando fuera necesario.

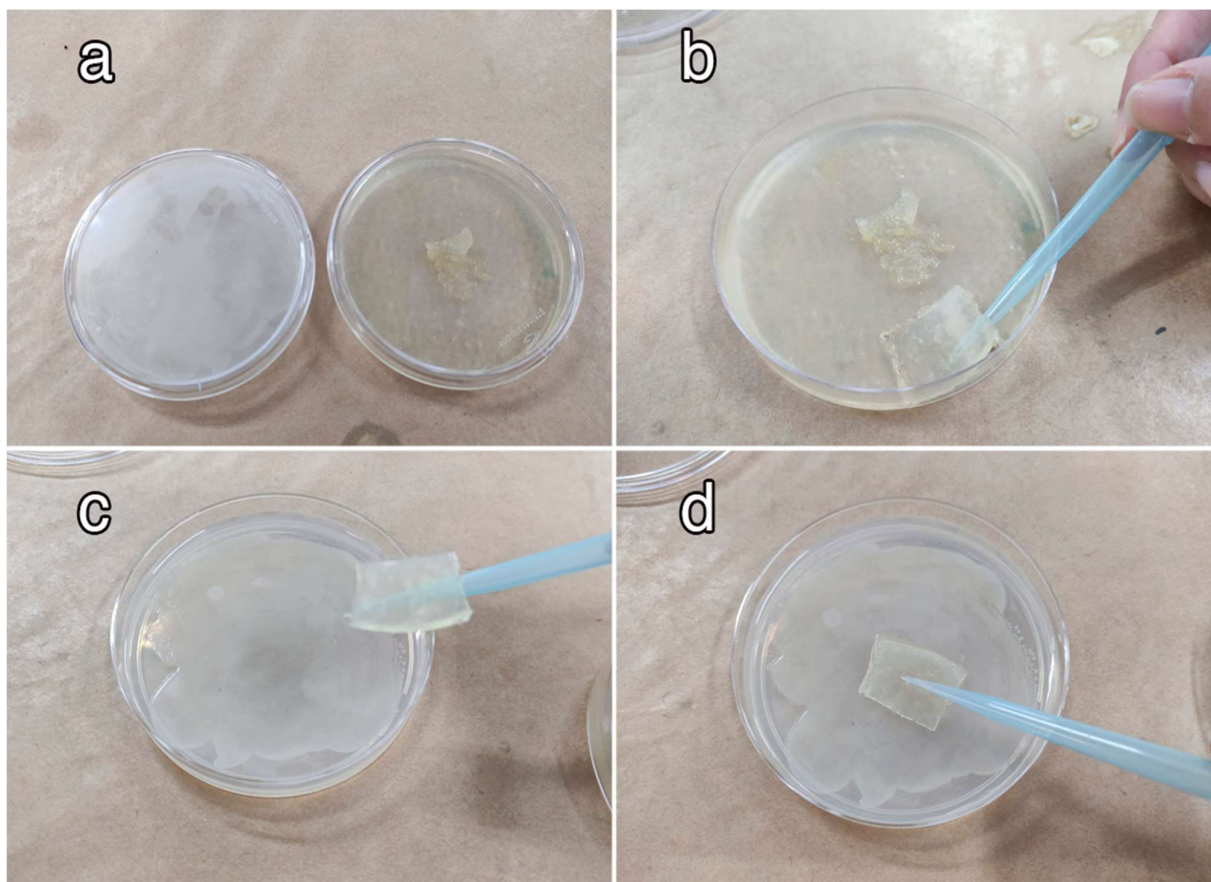
5.3. CULTIVO Y MANUTENCIÓN DEL *Caenorhabditis elegans*

Los *C. elegans* fueron mantenidos en medio de crecimiento nematoide sólido NGM, sembradas con *E. coli* OP50 como fuente de alimento, en placas de Petri de 60 mm de diámetro, a 20° C, conforme el protocolo de Brenner (1974).

Fueron realizados repiques de las placas stock a nuevas placas con NGM y *E. coli* frescas, aproximadamente cada 3 semanas, para la manutención de los gusanos (figura 5). Las placas utilizadas para la realización de los ensayos fueron repicadas de las placas stock 3 días antes de la sincronización cronológica. Esto se debe a que la ovogénesis ocurre en la etapa adulta (aprox. 56 h en su ciclo de vida, a 20° C (MACK *et al.*, 2018)), por lo que al tercer día, habrá una gran cantidad de gusanos grávidos, mientras que en el cuarto día la placa no presentará buen rendimiento, ya que los gusanos habrán puesto

sus huevos (los cuales serán perdidos en el proceso de sincronización).

Figura 5 - Proceso de repique de *C. elegans*



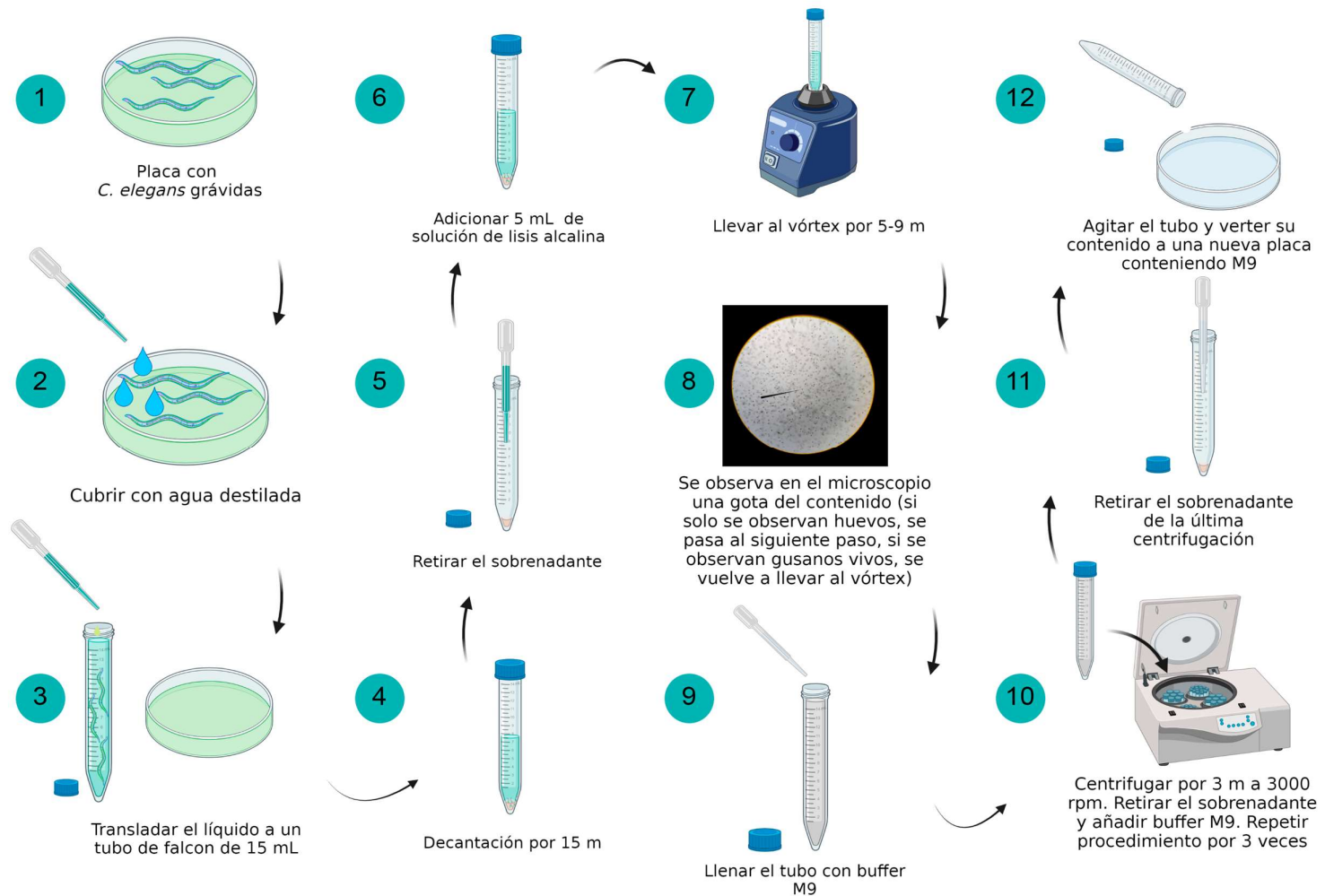
Proceso de repique de *C. elegans*. a: A la izquierda, una placa fresca con NGM y *E. coli*, a la derecha, placa stock de la cepa N2; b: es realizado un corte cuadrangular con la ayuda de una punta de micropipeta estéril al agar de la placa stock con N2; c: es retirada cuidadosamente la porción previamente cortada; d: es colocada la porción con los gusanos volteados para abajo en la placa nueva. Al finalizar el proceso, se rotula debidamente y se lleva a la incubadora a 20°C. **Fuente:** de la autora.

5.4. SINCRONIZACIÓN CRONOLÓGICA DEL *Caenorhabditis elegans*

Para poder llevar a cabo correctamente los distintos ensayos con estos nematodos, se debe realizar una sincronización cronológica, la cual permite que todos los gusanos estén en un mismo estadio (figura 6). Para ello, los gusanos adultos grávidos fueron sometidos a 5 mL de solución de lisis alcalina (1,5 mL NaClO 2%; 0,250 mL NaOH 10 M; agua destilada 3,250 mL), que disuelve la cutícula y permite que los huevos sean expulsados a la superficie. Además, esta solución lisa los huevos ya puestos por los gusanos antes del momento de sincronización, los cuales interfieren en los resultados de los ensayos. Los huevos resistentes al tratamiento fueron puestos en placas de petri conteniendo tampón M9, en

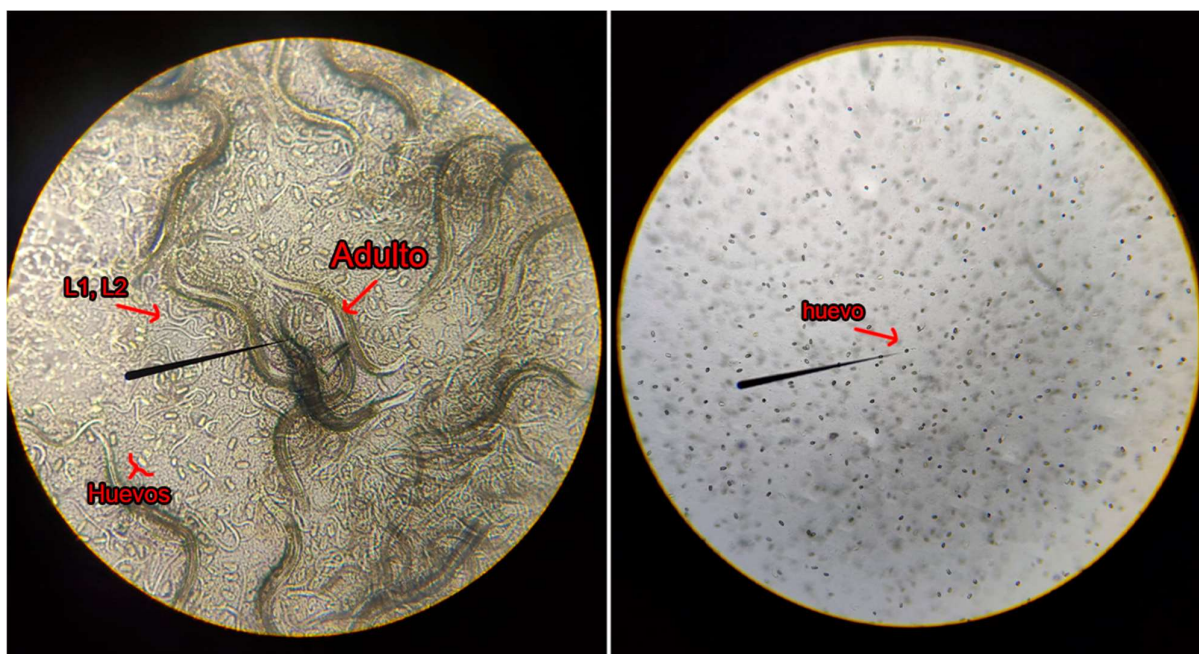
ausencia de alimento, y dejados 24 h a 20° C para que eclosionen y alcancen la etapa L1. La figura 7 muestra una comparación de las placas antes y después de la sincronización.

Figura 6 - Protocolo de sincronización



Protocolo de sincronización. Al finalizar, se traslada la placa conteniendo los huevos a una incubadora a 20° C, y se deja transcurrir un día para que todos los huevos eclosionen. **Fuente:** de la autora

Figura 7 - Comparación antes y después de la sincronización



Comparación antes y después de la sincronización. A la izquierda, una imagen de microscopía óptica en aumento 10x de una placa repicada 3 días antes, en donde se observan individuos en distintas etapas de la vida del *C. elegans*; a la derecha, imagen de microscopía óptica en aumento 4x mostrando el resultado del proceso de sincronización, cada punto constituye un huevo. **Fuente:** de la autora.

5.5. ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) DE LA ATRAZINA

Aproximadamente 1000 gusanos en estadio larval L1 fueron expuestos por 48 h a las siguientes concentraciones de atrazina: 2000 μM , 3000 μM y 4000 μM . Para ello, se prepararon cuatro eppendorfs, con volumen final de 500 μL , uno para cada grupo y un control negativo, que contenían lo siguiente:

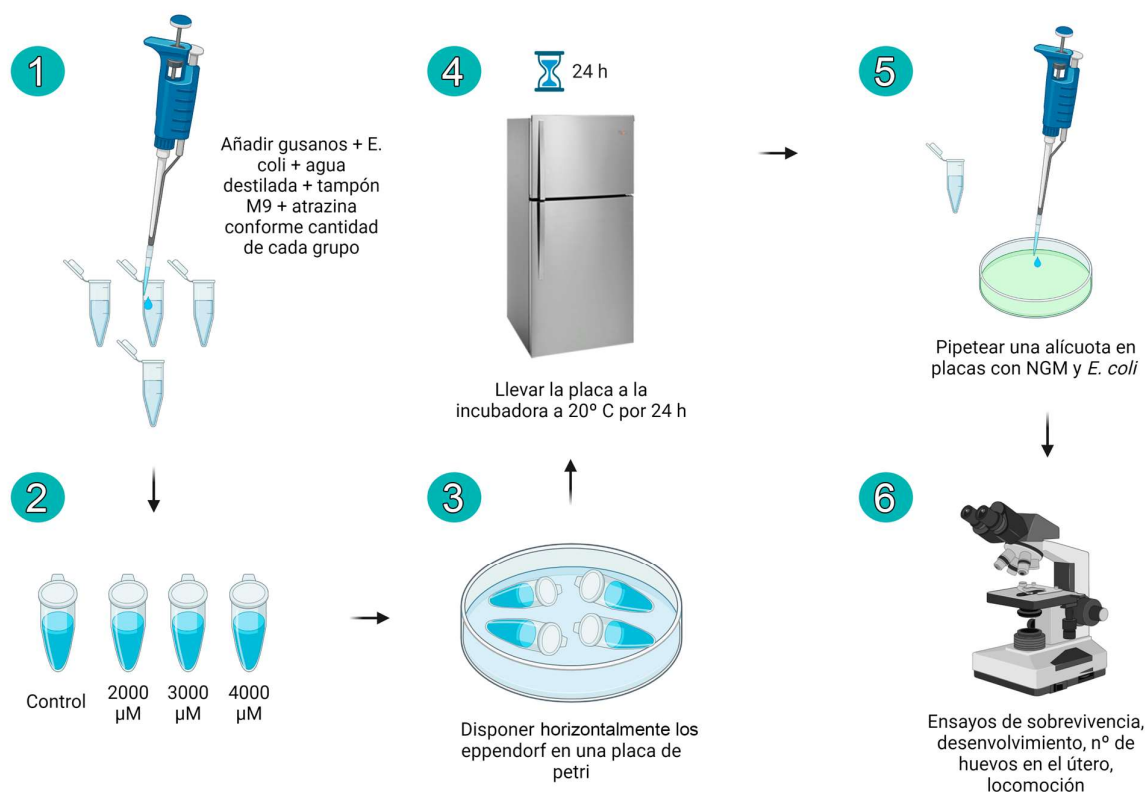
- Grupo 1 - Control negativo: 45 μL de gusanos; 10 μL de *E. coli*; 45 μL de tampón M9, 400 μL de agua destilada.
- Grupo 2 - 2000 μM : 45 μL de gusanos; 10 μL de *E. coli*; 45 μL de tampón M9; 200 μL de sol. madre; 200 μL de agua destilada.
- Grupo 3 - 3000 μM : 45 μL de gusanos; 10 μL de *E. coli*; 45 μL de tampón M9; 300 μL de sol. madre; 100 μL de agua destilada.
- Grupo 4 - 4000 μM : 45 μL de gusanos; 10 μL de *E. coli*; 45 μL de tampón M9; 400 μL de sol. madre.

A las 24 h de exposición, se tomó separadamente una alícuota de 5 μL de cada eppendorf (aproximadamente 100 gusanos), y fueron colocados en distintas placas de Petri de 35 mm de diámetro con NGM y *E. coli*. Seguidamente, se realizó el ensayo de

sobrevivencia.

Para los ensayos de desenvolvimiento, número de huevos en el útero y locomoción, se esperó al día siguiente a que alcancen la etapa adulta. Finalmente, fueron hechas comparaciones entre los distintos grupos para obtener el valor LC_{50} , necesario para poder realizar los ensayos con la rutina. Todo este procedimiento fue realizado 3 veces. La figura 8 resume gráficamente todos los procedimientos de esta sección:

Figura 8 – Etapas de la preparación para los bioensayos de los grupos expuestos a la atrazina



Fuente: de la autora.

5.6. PRE-TRATAMIENTO CON RUTINA Y POSTERIOR EXPOSICIÓN A LA ATRAZINA

Las soluciones de 1,5; 3; 6 y 12 mM fueron diluidas en etanol absoluto para obtener las concentraciones finales en los eppendorf de 15, 30, 60 y 120 μM y 1% de etanol, el cual no ejerce efecto sobre los gusanos, y que será también el grupo control. Las concentraciones fueron escogidas conforme al estudio de Cordeiro y colaboradores (2020).

Mil gusanos en estadio larval L1 fueron expuestos a las concentraciones

15, 30, 60 y 120 μM de rutina por 1 h como pre-tratamiento. Para esto, seis eppendorfs, con volumen final de 500 μL , fueron preparados, uno para cada grupo y un control negativo, de la siguiente manera:

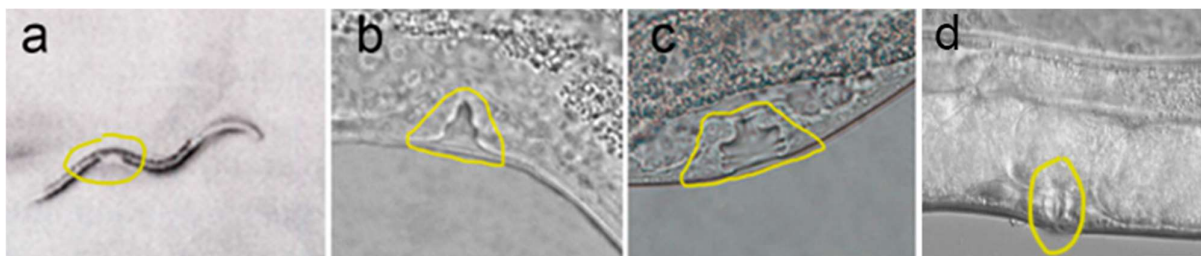
- Grupo 1 – Control negativo: 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL etanol 1%
- Grupo 2 – Gusanos con rutina en mayor concentración, 120 μM (para demostrar que la rutina sola no causa daño): 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL de sol. madre 12 mM.
- Grupo 3 – 15 μM : 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL de sol. madre 1,5 mM.
- Grupo 4 – 30 μM : 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL de sol. madre 3 mM.
- Grupo 5 – 60 μM : 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL de sol. madre 6 mM.
- Grupo 6 – 120 μM : 50 μL de gusanos; 445 μL de tampón M9; 5 μL de sol. madre 12 mM.

Concluida la 1 h de pre-tratamiento, los gusanos fueron lavados 3 veces con tampón M9 para retirar la rutina. A continuación, se proveyó a todos los grupos de 10 μL de *E. coli*; al control negativo y grupo 2 fueron añadidos 400 μL de tampón M9; a los grupos 3, 4, 5 y 6 fueron añadidos 400 μL de sol. madre de atrazina, la cual constituye una concentración de 4000 μM de dicha sustancia. Estos grupos fueron dejados nuevamente por 48 h en exposición. A las 24 h de exposición, se tomó separadamente una alícuota de 5 μL de cada eppendorf, y fueron colocados en distintas placas de Petri de 35 mm de diámetro con NGM y *E. coli*. Al día siguiente se realizó el ensayo de desenvolvimiento y locomoción. Todo este procedimiento fue realizado 3 veces. La figura 9 resume gráficamente todos los procedimientos de esta sección:

condiciones favorables (ARANTES *et al.*, 2016).

Mediante la observación de la vulva, es posible distinguir las distintas etapas de desarrollo de *C. elegans* (figura 9):

Figura 10 – Morfología de la vulva en *C. elegans*



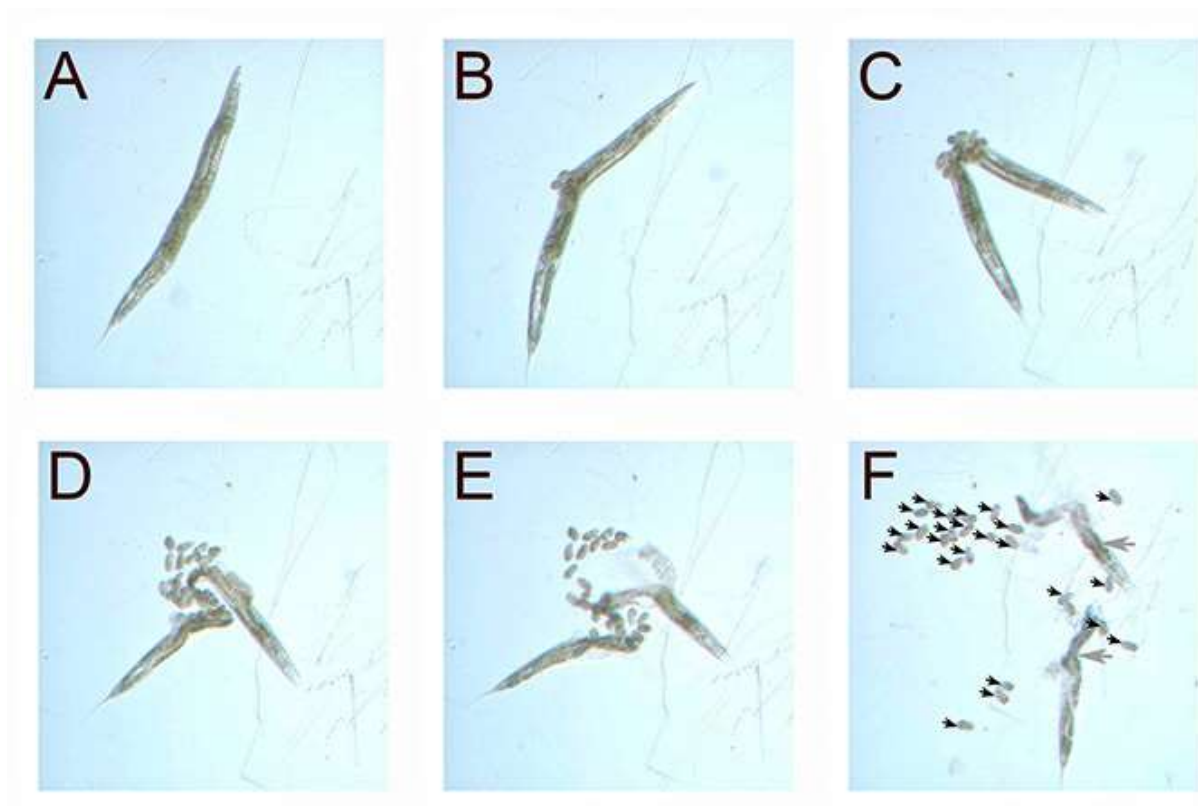
a: gusano en etapa L3. En esta etapa, aún no se hace visible la vulva. El círculo amarillo indica una hendidura, que representa el útero. b y c: morfología de la vulva en etapa inicial y tardía de su morfogénesis, respectivamente. El círculo amarillo indica la vulva. d: morfología de la vulva de un gusano adulto. El círculo amarillo indica la vulva. **Fuente:** adaptado de Porta-de-la-Riva *et al.* (2012).

Fueron analizados el desarrollo de la vulva de 100 gusanos de cada grupo experimental, mediante microscopía óptica en aumento 10x, a las 48 h de exposición. Los gusanos que presentaban una morfología de la vulva igual a la figura 9 b y c, fueron categorizados como larvas L4. Los gusanos que presentaban la morfología de la vulva semejante a una “raya” fueron categorizados como adulto joven (figura 9 d), mientras que los gusanos que presentaban huevos en el útero, se les categorizó como adulto con huevos. Este ensayo se realizó para verificar las diferencias en el desenvolvimiento entre los grupos experimentales con el control. El ensayo se realizó por triplicado.

5.7.3. Ensayo de número de huevos en el útero

Los ensayos de números de huevo en el útero (*egg in worm assay*) implican contar el número de huevos retenidos en el útero de *C. elegans*. Este ensayo implica una lisis alcalina de *C. elegans* adultas grávidas para eliminar la cutícula y separar los huevos retenidos del animal (figura 10). Antes de la lisis alcalina, los gusanos se exponen a un factor externo determinado, durante un período de tiempo fijo. Después de la lisis, es bastante sencillo contar el número de huevos retenidos dentro del útero de los gusanos (GARDNER *et al.*, 2013).

Figura 11 – Disolución de la cutícula de *C. elegans* por lisis alcalina



A: Un gusano hermafrodita grávido es puesto en una gota de solución de lisis alcalina. B a F: Durante cinco a diez minutos, la cutícula del gusano comienza a disolverse. F: Las flechas negras indican los huevos que fueron expulsados en la superficie. **Fuente:** GARDNER *et al.*, 2013.

Para el ensayo de número de huevos en el útero, se preparó una solución de lisis alcalina (2,5 mL NaOH 10 M; 5 mL NaClO 2%), el cual fue colocado en forma de gotas de 10 μ L en varios puntos de las placas donde se constataba presencia de gusanos. Se dejó que la solución actúe por 5 minutos, tiempo suficiente para que los gusanos mueran y la cutícula se deshaga.

Se contabilizó la cantidad de huevos, utilizando un microscopio óptico en aumento 10x, de 10 gusanos por grupo, a las 48 h de exposición. El ensayo se realizó por triplicado.

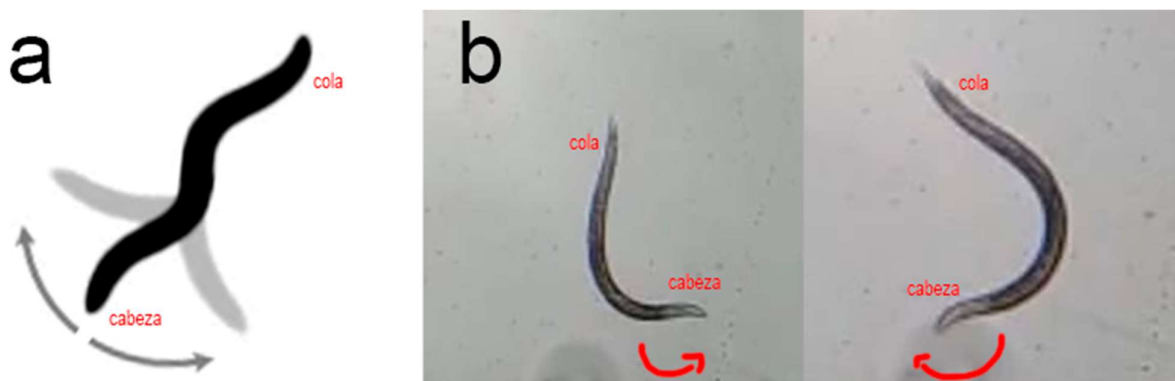
5.7.4. Ensayo de locomoción (*thrashing assay*)

El ensayo de locomoción requiere que los gusanos analizados estén libres de bacterias o cualquier partícula que pueda interferir en el nado, debido a la naturaleza quimiotáctica de estos nematodos. Para ello, los gusanos fueron lavados 3 o 4 veces,

dependiendo de la turbidez del líquido, con tampón M9. A seguir, fueron trasladados a una placa de Petri de 60 mm de diámetro con tampón, y dejados 10 minutos para que se adapten a la nueva superficie.

Se contabilizó el número de *thrashes*, es decir, el movimiento corporal completo hacia un lado y luego de regreso a la posición original (figura 11), en tres intervalos de 20 segundos por animal, de 10 gusanos por grupo por medio del microscopio óptico en aumento 4x, a las 48 h de exposición. El ensayo se realizó por triplicado.

Figura 12 – Descripción gráfica del *thrash* de *C. elegans*



a: movimiento de nado de *C. elegans*; b: se muestra una secuencia de fotografías correspondiente al movimiento de natación un mismo gusano. Las flechas indican la dirección del movimiento de la parte anterior del nematodo. **Fuente:** a: adaptado de Zhan *et. al.*, 2022; b: de la autora.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico, así como todos los gráficos generados en este trabajo, fueron realizados utilizando el software *GraphPad Prism* v. 8.0. La significación estadística se evaluó mediante ANOVA de una vía para comparar concentraciones en el mismo grupo, y ANOVA de dos vías para comparar grupos (etapas de desarrollo), ambas con múltiples comparaciones de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

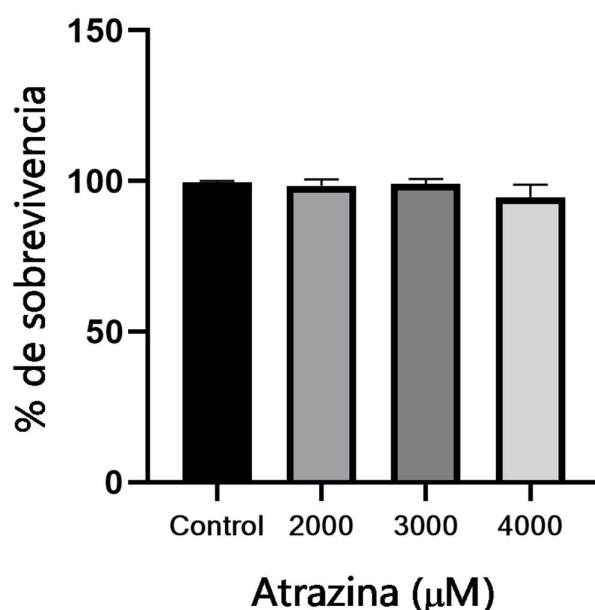
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. ESTABLECIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL₅₀) DE LA ATRAZINA

La concentración letal media (CL₅₀) es una medida para evaluar el efecto tóxico de sustancias peligrosas, equivale a la concentración de la sustancia medida que causa la muerte del 50% de los organismos en un periodo de exposición determinado (VÁZQUEZ-VILLEGAS *et al.*, 2018).

Los resultados de la exposición a las concentraciones 2000, 3000 y 4000 µM de atrazina por 24 h, como descrito en la sección 5.5., están indicados en el gráfico 1. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada grupo.

Gráfico 1 – Porcentaje de sobrevivencia de *C. elegans* frente a la atrazina



Efecto de la exposición por 24 h a la atrazina (2000 – 4000 µM) en la sobrevivencia de los nematodos. Los valores representan medias ± DE de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey.

En un estudio realizado por Espiñeira y colaboradores (2018), se obtuvo una letalidad de hasta 18% en concentraciones menores a 600 µM en gusanos que fueron expuestos por 24 h a la atrazina en etapa L4, sin embargo, en este trabajo, los gusanos fueron expuestos a concentraciones mucho mayores y en etapas larvales más sensibles, e incluso así, no se encontró diferencia estadísticamente significativa con la media, indicando

que la mortalidad observada, que no excedió del 2% en todos los grupos, se debió al acaso. La ausencia de letalidad presenciada en este trabajo concuerda con el estudio llevado a cabo por Zhou y colaboradores (2021), en donde larvas en estadio L1 fueron expuestas a distintas concentraciones de atrazina (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10 mg/L), hasta la etapa adulta, arrojó como resultado que todas las concentraciones no fueron letales para los nematodos. Asimismo, Fan A. (2014) afirma que la atrazina tiene una toxicidad aguda relativamente baja en animales de laboratorio.

Con todo esto, no fue posible establecer un valor CL_{50} para utilizar en las exposiciones posteriores a la atrazina. No obstante, en virtud de los efectos observados en los ensayos de desenvolvimiento y locomoción, fue escogida la concentración de 4000 μM como concentración de trabajo en los ensayos que involucraron el pre-tratamiento con rutina.

6.2. BIOENSAYOS

6.2.1. Ensayo de sobrevivencia

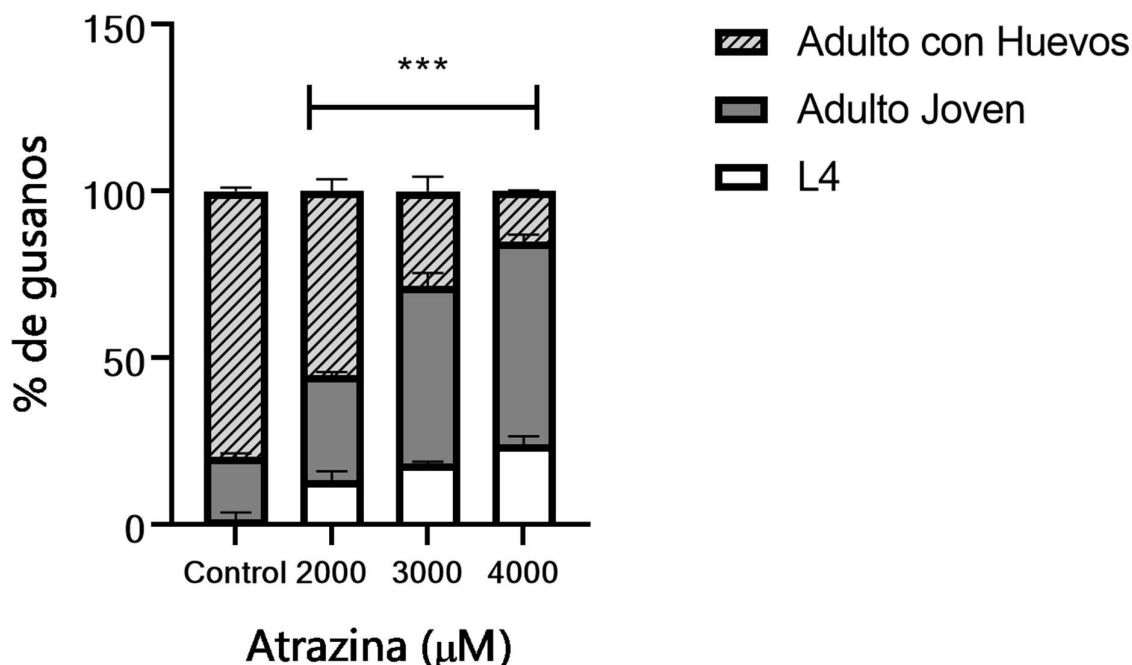
El resultado del ensayo de sobrevivencia de exposición frente a la atrazina se muestra en el gráfico 1.

En vista de que no hubo diferencias significativas con el control negativo en el ensayo de sobrevivencia de exposición frente a la atrazina, se decidió no realizar dicho ensayo para los grupos de pre-tratamiento con rutina.

6.2.2. Ensayo de desenvolvimiento

Los resultados del ensayo de desenvolvimiento, realizadas a las 48 h de exposición a las diferentes concentraciones de atrazina, mostraron un evidente retraso en el desenvolvimiento de los grupos expuestos a 2000, 3000 y 4000 μM de atrazina (gráfico 2). A las 48 horas de exposición, el 79% de los gusanos en el grupo control (agua destilada) ya se habían convertido en adultos con huevos, mientras que los grupos expuestos a las concentraciones 2000, 3000 y 4000 μM solamente poseían el 55% ($p < 0.001$), 28% ($p < 0.001$) y 15% ($p < 0.001$), respectivamente, de adultos con huevos.

Gráfico 2 – Progreso del desarrollo de los gusanos de cada grupo en el ensayo de desenvolvimiento



Efecto de la exposición por 48 h a la atrazina (2000 – 4000 µM) sobre el desarrollo de los nematodos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (***) entre todos los grupos con respecto al control, evidenciando un retraso en el desarrollo. Los valores representan medias $\pm$ DE de 3 réplicas biológicas independientes. La significación estadística fue evaluada mediante la prueba de ANOVA de dos vías con post-test de Tukey.

El 18% de los gusanos del grupo control (agua destilada) se encontraban en la etapa de adulto joven, entre tanto, el porcentaje de adultos jóvenes de los grupos expuestos a las concentraciones 2000, 3000 y 4000 µM fueron 31% ($p < 0.05$), 53% ($p < 0.001$) y 60% ($p < 0.001$) respectivamente. En lo que respecta a gusanos en etapa L4, el grupo control presentó un 1% de gusanos en esta etapa, contrariamente al 13% ($p < 0.05$), 18% ($p < 0.001$) y 24% ($p < 0.001$) de gusanos de los grupos expuestos a las concentraciones 2000, 3000 y 4000 µM, respectivamente.

La atrazina es el herbicida más conocido entre el grupo de los herbicidas triazinas. Este herbicida ampliamente utilizado ha sido asociado con citotoxicidad, estrés oxidativo, toxicidad reproductiva y retrasos en la maduración sexual de animales (NICOLOPOULOU-STAMATI *et al.*, 2016). El retraso en el desarrollo observado en el

ensayo de desenvolvimiento coincide con los resultados de Moya y colaboradores (2022) en donde observaron que 12 h después del final del tratamiento con atrazina, el porcentaje de *C. elegans* grávidos en la población tratada igualó al grupo control.

Los mecanismos por el cual la atrazina provoca un retraso en el desarrollo de *C. elegans* no son conocidos hasta el momento. No obstante, Moya y colaboradores (2022) manifiestan que el tratamiento de los nematodos durante la etapa L4 produciría un desequilibrio hormonal que conduciría a un retraso en el desarrollo de esta última muda larvaria, ya que ha sido demostrado que esta etapa está regulada con precisión por señales neuroendócrinas (MOYA *et al.*, 2022; RUSSEL *et al.*, 2011).

Al haber observado y corroborado el retraso en el desarrollo de los gusanos expuestos a la atrazina, se procedió a realizar este ensayo con los grupos pre-tratados con rutina, para observar si la rutina podría reducir el porcentaje de retraso evidenciado en la exposición a la atrazina. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2.

Tabla 3– Media de las tres replicatas obtenidas en el ensayo de desenvolvimiento con los gusanos pre-tratados con rutina

GRUPOS	ETAPAS DE DESARROLLO (%)		
	L4	Adulto Joven	Adulto con Huevos
Control	3,35 ± 5,8	27,88 ± 19,5	68,76 ± 23,3
15 µM	18,88 ± 14,4	51,63 ± 20,5	29,49 ± 17,3
30 µM	13,72 ± 10,7	55,69 ± 27,2	30,59 ± 31,7
60 µM	18,84 ± 18,1	51,74 ± 23,4	29,43 ± 25,6
120 µM	16,83 ± 19,6	56,34 ± 15,7	26,52 ± 21,3
120 µM (no atz)	-	-	-

Los números equivalen a las medias de las tres replicatas (%) ± DE de 3 réplicas biológicas independientes. Datos del grupo 120 µM (no atz) no son presentados debido a que solo se realizó el conteo de una replicata.

Es necesario realizar una aclaración sobre los datos de esta tabla. La tabla presenta la media de las 3 replicatas realizadas con sus respectivas desviación estándar, sin embargo, no constituyen una representación fidedigna de este ensayo debido a (i): las replicatas fueron hechas en el mismo día, sin embargo, en diferentes horarios (aprox. 6 h de diferencia entre replicata 1 y replicata 2-3). Esto resultó en una diferencia notable de medias entre replicatas, explicado por el hecho de que los gusanos pueden pasar de etapa L4 (tardía) a adulto joven en cuestión de horas, de la misma manera en que los adultos

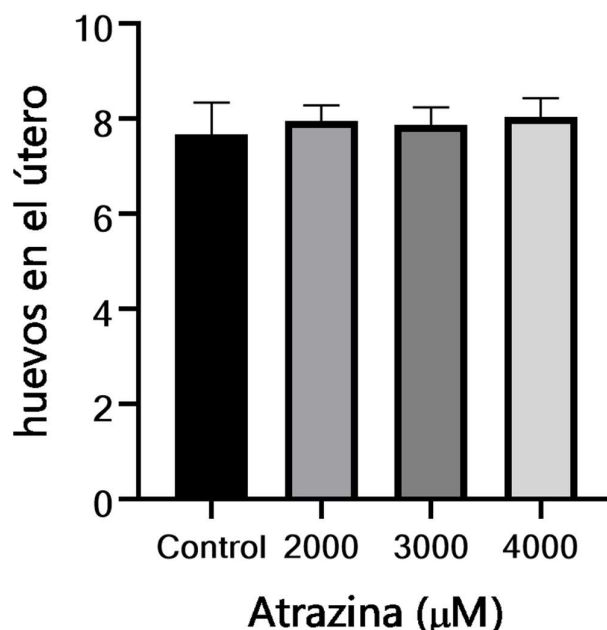
jóvenes pueden producir huevos también en cuestión de horas. Por ello, los datos obtenidos de cada replicata solo pueden ser comparados con su respectivo control. Todos estos factores imposibilitaron efectuar el análisis estadístico necesario para evaluar las diferencias entre grupos. Pese a todo lo expuesto, se pudo observar visualmente diferencias entre grupos con respecto al control. En las 3 replicatas, cada control presentaba una mayor cantidad de adultos con huevos y una menor cantidad de adultos jóvenes/L4, contrariamente a los grupos pre-tratados con rutina, en los que fueron observados una proporción mayor de adultos jóvenes/L4 y menor proporción de adultos con huevos. Como consecuencia a lo manifestado, no fue posible obtener un resultado preciso del efecto de la rutina ante el retraso en el desarrollo provocado por la atrazina.

6.2.3. Ensayo de número de huevos en el útero

Caenorhabditis elegans es un gusano hermafrodita que se autofecunda. Durante su ciclo de vida, *C. elegans* debe pasar por cuatro etapas larvales desde el momento que eclosiona, para alcanzar la etapa adulta, todo dentro de dos a cuatro días. Un gusano puede, en promedio, producir 300 crías en un período de 3 días (4 - 10 huevos puestos por hora). El número de huevos en el útero es una función tanto de la tasa de producción de huevos como de la tasa de puesta de huevos. Un circuito motor y neural intacto es necesario para que el proceso de puesta de huevos sea exitoso (GOHARI *et al.*, 2019; GARDNER *et al.*, 2013).

Los resultados del ensayo de número de huevos realizado en este trabajo están ilustrados en el gráfico 3.

Gráfico 3 – Media de número de huevos en el útero luego de la exposición a la atrazina



Efecto de la exposición por 48 h a la atrazina (2000 – 4000 μM) en el número de huevos en el útero de los nematodos. Los valores representan medias $\pm$ DE de 3 réplicas biológicas independientes. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA de una vía con post-test de Tukey.

No se encontraron diferencias significativas en la media de número de huevos en el útero de los tres grupos expuestos a la atrazina, con relación al control, así como tampoco entre grupos. En previos estudios (ZHOU *et al.*, 2021; GARCÍA-ESPIÑEIRA *et al.*, 2018; MOYA *et al.*, 2022), se investigó el efecto de la atrazina sobre el tamaño de cría en *C. elegans*, parámetro (*endpoint*) similar al número de huevos en el útero, y se encontró que la atrazina redujo considerablemente ($p > 0.01$ y $p > 0.001$) el tamaño de cría. En el estudio de Moya y colaboradores (2022), se halló que la atrazina produjo una subexpresión significativa de los genes asociados a la espermatogénesis y ovogénesis, lo que explicaría la disminución del tamaño de cría que se obtuvo en dicha investigación. Sin embargo, las concentraciones y tiempos de exposición, entre otros factores, de los estudios citados, fueron diferentes a los de este trabajo, lo que da lugar a discrepancias entre resultados. Aún así, sería recomendable modificar las concentraciones de exposición o algunos parámetros relacionados con la metodología, para poder obtener un resultado

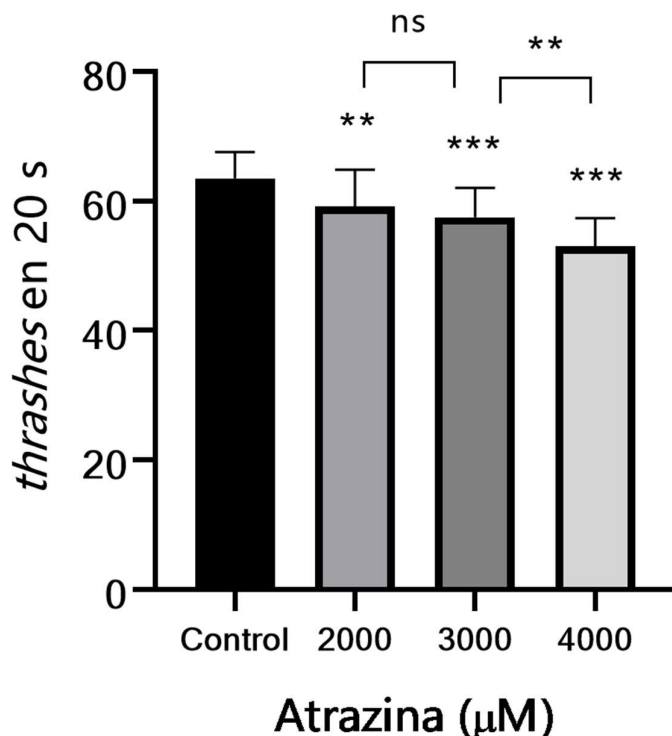
similar a los estudios anteriores y confirmar la hipótesis de que la atrazina impacta de manera negativa en los procesos relacionados a la espermatogénesis y ovogénesis, disminuyendo la cantidad de huevos producidos

Puesto a que no se encontraron diferencias entre los grupos expuestos a la atrazina con respecto al control, se decidió no efectuar este ensayo para los grupos de pre-tratamiento con rutina.

6.2.4. Ensayo de locomoción

El *thrashing assay*, en el que los nematodos se colocan en líquido y se estima la frecuencia de los movimientos laterales de natación (*thrashes*), es un método bien establecido para medir la motilidad en el organismo modelo genético *C. elegans*. Se utiliza como índice de los efectos de fármacos, sustancias químicas o mutaciones en la motilidad y ha resultado útil para identificar mutantes que afectan este comportamiento (BUCKINGHAM & SATTELLE, 2009).

En el *thrashing assay* realizado a los gusanos expuestos a la atrazina, se observó que los grupos expuestos a 2000, 3000 y 4000 μM de atrazina presentaron una media de 59, 57 y 52 *thrashes* en 20 segundos, respectivamente, mientras que el control (agua destilada) presentó una media de 63 *thrashes* en 20 segundos. La atrazina redujo el movimiento de nado de los gusanos en un 6,8% ($p < 0.05$), 9,4% ($p < 0.001$) y 16,6% ($p < 0.001$) en las concentraciones de 2000, 3000 y 4000 μM , respectivamente, en comparación al control. El post-test de Tukey indicó una diferencia no significativa entre los grupos 2000 y 3000 μM , y una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 3000 y 4000 μM ($p < 0.05$) como mostrado en el gráfico 4.

Gráfico 4 – Efecto de la atrazina sobre la locomoción de *C. elegans*

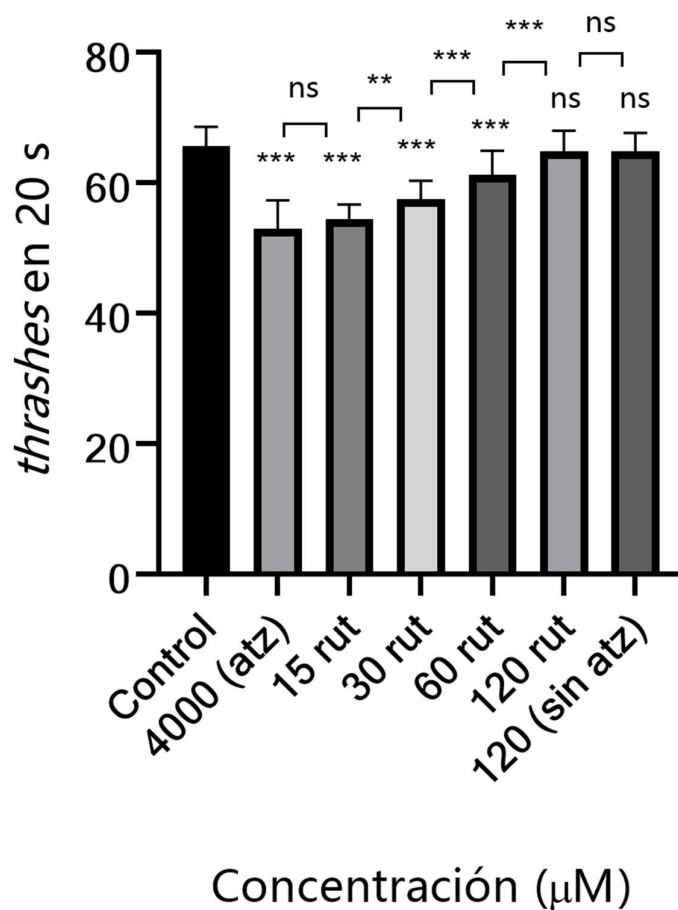
Media de los *thrashes* en 20 s del grupo control y los grupos expuestos a 2000, 3000, 4000 µM de atrazina por 48 h. Los valores representan medias $\pm$ DE de 3 réplicas biológicas independientes. ns: no significativo; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ según ANOVA de una vía con post-test de Tukey.

La disminución en la tasa de *thrashes* como consecuencia de la exposición a la atrazina concuerda con el resultado obtenido por Zhou y colaboradores (2021), en donde concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 mg/L de atrazina redujeron notablemente la media de *thrashes*/min de los gusanos.

En lo que respecta a los grupos de pre-tratamiento con rutina, el ensayo arrojó los siguientes resultados (gráfico 5): la media de *thrashes* en 20 s de los grupos con pre-tratamiento de 15, 30, 60 y 120 µM de rutina fueron 54, 57, 61 y 64, respectivamente, a la vez que la media de *thrashes* en 20 s del control (1% etanol) y el grupo de 120 µM de rutina (sin atrazina) fueron 65 y 64, respectivamente. La rutina en concentración 15 µM no mejoró el nado de los gusanos, ya que no presentó diferencia estadísticamente significativa con el grupo de exposición a 4000 µM de atrazina, contrariamente a las concentraciones 30 y 60 y 120 µM, que mejoraron significativamente el nado de los gusanos. El post-test de Tukey indicó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 15 y 30 µM

($p < 0,05$), 30 y 60 μM ($p < 0,001$), mientras que entre los grupos 120 y 120 (sin atrazina) μM , no hubo diferencia estadísticamente significativa, tampoco estos últimos con el control.

Gráfico 5 – Efecto del pre-tratamiento con rutina sobre la disminución en la locomoción de *C. elegans*



Media de los *thrashes* en 20 s del grupo control y los grupos pre-tratados con 15, 30 60, 120 μM y 120 μM (sin exposición a la atrazina) de rutina por 1 h. La media del grupo expuesto a 4000 μM de atrazina por 24 h se añadió para demostrar la no significancia estadística con el grupo de 15 μM . Los valores representan medias $\pm$ DE de 3 réplicas biológicas independientes. ns: no significativo; ** $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ según ANOVA de una vía con post-test de Tukey.

Los comportamientos de locomoción son un indicador de evaluación rápida que refleja si el sistema nervioso de los gusanos está dañado y se ha demostrado que es sensible a la toxicidad química (ZHANG *et al.*, 2022).

Caenorhabditis elegans es un gusano de vida libre capaz de moverse en el

agua y en la tierra. Se ha evidenciado que *C. elegans* usa distintos modos de andar para nadar en el agua y para arrastrarse en la tierra, y a su vez, son regidos por distintos circuitos neuronales (VIDAL-GADEA *et al.*, 2012). La dopamina induce a arrastrarse (*crawling*) en un ambiente de baja viscosidad, mientras que la serotonina induce a nadar en líquidos poco profundos, así como también es necesaria para mantener una natación normal (VIDAL-GADEA *et al.*, 2011; GJORGJIEVA *et al.*, 2014). Vías serotoninérgicas comprometidas pueden resultar en comportamientos de natación mal coordinados en *C. elegans*, como ha sido demostrado por Vidal-Gadea y colaboradores (2011). La atrazina es un conocido disruptor endócrino, pero poco se habla sobre las alteraciones en el sistema nervioso y nivel de neurotransmisores. A pesar de la escasez de estudios investigando el papel de este herbicida sobre la neurotoxicidad en comparación a su papel en la disrupción endócrina, existen algunos estudios que apuntan a una desregulación del sistema serotoninérgico a causa de exposición a dosis de atrazina: fueron reportados alteraciones en el sistema serotoninérgico y genes asociados a esta vía en *zebrafish* (WIRBISKY *et al.*, 2015; LAMB *et al.*, 2020), así como en ratas C57BL/6 (ZHOU MENG *et al.*, 2014) y ratas Wistar (RAJKOVIC *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha de hoy, no han sido investigados los mecanismos exactos por el cual la atrazina induce un daño en el sistema serotoninérgico. Dicho esto, con los resultados obtenidos en el ensayo de locomoción en este trabajo, en adición a los previos estudios que avalan la influencia de la atrazina sobre la vía serotoninérgica, se infiere que la reducción en la media de *thrashes* de los gusanos expuestos a la atrazina sea a consecuencia de un posible efecto neurotóxico ejercido por la atrazina por medio de una desregulación del sistema serotoninérgico. No obstante, para demostrar la veracidad de dicha hipótesis, son necesarios estudios midiendo la cantidad de este neurotransmisor entre los grupos no expuestos y los expuestos a la atrazina, o analizando la transcripción de ARNm de genes involucrados en la regulación del sistema serotoninérgico, así como también realizar este mismo ensayo con cepas mutantes serotonina-deficientes.

En cuanto a la mejoría observada en los grupos pre-tratados con rutina por 1 h, se deduce que la rutina ejerció un efecto protector posiblemente vía regulación del sistema serotoninérgico. Esta deducción es apoyada por los hallazgos de Shih-Hang y colaboradores (2013), en el cual la rutina incrementó la concentración de serotonina y otros neurotransmisores en distintas regiones del cerebro de ratas Sprague Dawley. Evidencias similares fueron presentadas por Machado y colaboradores (2007), que sostienen que la rutina aumentó la disponibilidad de serotonina y otro neurotransmisor en la hendidura

sináptica en ratones Swiss. Aun así, son necesarios estudios posteriores para validar la autenticidad de dicha deducción.

7. CONSIDERACIONES FINALES

- No se observó letalidad en *C. elegans* expuestos a las concentraciones probadas de atrazina, por ello, no fue establecido un valor de CL₅₀. Sin embargo, esto no significó que el producto no sea tóxico para los gusanos en las concentraciones evaluadas, puesto que los datos obtenidos en este trabajo evidencian diferencias significativas en los parámetros de desenvolvimiento y locomoción en las concentraciones subletales.
- La atrazina produjo retraso en el desenvolvimiento de *C. elegans* en todas las concentraciones probadas, evidenciado por el hecho de que el control presentó una mayor proporción de adultos con huevos, contrariamente a los grupos expuestos a atrazina, quienes presentaron una mayor proporción de adultos jóvenes/L4.
- A pesar de realizar el ensayo de desarrollo con los gusanos pre-tratados con rutina, no fue posible obtener un resultado concreto del efecto de la rutina ante el retraso en el desarrollo provocado por la atrazina.
- No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la media de huevos en el útero de *C. elegans* expuestos a las concentraciones de atrazina con respecto al control.
- Es imprescindible la repetición del ensayo de desenvolvimiento con los grupos de pre-tratamiento de rutina, para constatar el efecto de la rutina ante el retraso en el desarrollo provocado por la atrazina.
- Todas las concentraciones de atrazina utilizadas en este trabajo afectaron de forma negativa en la locomoción de *C. elegans*, reduciendo la tasa de *thrashes* en 20 s en un 6,8%, 9,4% y 16,6% en las concentraciones de 2000, 3000 y 4000 µM respectivamente.
- La rutina ejerció un efecto positivo en las concentraciones 30, 60 y 120 µM al aumentar la tasa de *thrashes* en 20 s de los gusanos expuestos a la atrazina (4000 µM)..
- La atrazina es reconocida como un disruptor endócrino, pero poco se habla sobre su papel en el sistema nervioso y alteraciones en los neurotransmisores. Los resultados obtenidos en el ensayo de locomoción indican un posible efecto neurotóxico ejercido por la atrazina por medio de una desregulación del sistema serotoninérgico;
- La mejoría en la locomoción de los gusanos pre-tratados con rutina probablemente

sea por un efecto neuroprotector mediante la regulación del sistema serotoninérgico;

- Se hace necesaria la realización de estudios adicionales para corroborar las hipótesis surgidas sobre el posible efecto neurotóxico y disruptor neuroendócrino de la atrazina, así como el posible efecto neuroprotector de la rutina, en *C. elegans*.

REFERENCIAS

ARANTES, L. P. *et al.* Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Research**, v. 5, n. 6, p.1629-1638, 2016.

ARANTES, L. P. **Caenorhabditis elegans como modelo experimental para estudos toxicológicos e farmacológicos dos extratos de Luehea divaricata e Paullinia cupana**. Tesis (Maestría en Ciencias Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidad Federal de Santa Maria – Santa María, 2012.

ALI, M. S. *et al.* Cardioprotective effect of tetrahydrocurcumin and rutin on lipid peroxides and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in rats. **Pharmazie**, v. 64, n. 2, 2009.

ASIF, M. K. *et al.* A Plate Based Assay for Determination of the Median Lethal Dose of 1-Hydroxyphenazine in *Caenorhabditis elegans*. **microPublication Biology**. 2021

BONASSA, G. R. **Seleção de fungos para o desenvolvimento de bioinoculante parabiorremediação de solos agrícolas impactados com atrazina**. 2021. Trabajo de Conclusión de Curso (Grado en Biotecnología) - Universidad Federal de la Integración Latinoamericana - Foz de Iguazú, 2021.

BUCKINGHAM, S. & SATTELLE, D. Fast, automated measurement of nematod swimming (thrashing) without morphometry. **BMC Neuroscience**, v. 10, 2009.

CHERNYAK, S. M. *et al.* Evidence of currently-used pesticides in air, ice, fog, seawater and surface microlayer in the Bering and Chukchi seas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 5, p. 410-419, 1996.

CORDEIRO, L. M. *et al.* Rutin protects Huntington's disease through the insulin/IGF1 (IIS) signaling pathway and autophagy activity: Study in *Caenorhabditis elegans* model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, 2020.

CRAGIN, L. A. *et al.* Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, v. 111, n. 8, 2011.

DE LA MAZA, N. **Efecto del ibuprofeno en la longevidad del modelo Caenorhabditis elegans**. 2016. Trabajo final de grado (Licenciatura en Biotecnología) – Universidad Argentina de la Empresa, 2016.

DE OLIVEIRA, R. B. **Atividade antioxidante e neuroprotetora dos sucos de laranja Citrus sinensis L. Osbeck (Bahia e Cara Cara) no modelo Caenorhabditis elegans**. 2019. Tesis (Doctorado en Biotecnología) - Universidad Federal de Rio Grande do Norte -

Natal, 2019.

ESPIÑEIRA, M. G. *et al.* Toxicity of atrazine and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 216-222, 2018.

FERNANDES, A. A. *et al.* Influence of rutin treatment o biochemical alterations in experimental diabetes. **Biomedicine & Pharmacoteraphy**, v. 64, n. 3, 2010

FLORES-GARCÍA, M. E. *et al.* Residuos plaguicidas en aguas para consumo humano en una comunidad agrícola del estado Mérida, Venezuela. **Investigación Clínica**, v. 52, n. 4, 2011.

GAO, Z. *et al.* Antioxidant status and mineral contents in tissues of rutin and baicalin fed rats. **Life Sciences**, v. 73, n. 12, 2003.

GARDNER, M. *et al.* Measuring the effects of bacteria on *C. elegans* behavior using an egg retention assay. **Journal of Visualized Experiments**, v. 80, 2013.

GRAYMORE, M. *et al.* Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Enviroment International**, v. 26, n. 7, p. 483-495, 2001.

GJORGJIEVA, J. *et al.* Neurobiology of *Caenorhabditis elegans* locomotion: where do we stand?. **BioScience**, v. 64, n. 6, p. 476-486, 2014.

HANSEN, A. M. *et al.* Atrazina: un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 29, p. 65-84, 2013.

HASEGAWA, E. *et al.* *C. elegans* CPB-3 interacts with DAZ-1 and functions in multiple steps of germline development. **Develpmental Biology**, v. 295, n. 2, 2006.

HAYES, T. B. *et al.* Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **PNAS**, v. 107, n. 10, 2009.

HOSSEINZADEH, H. & NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 39, n. 9, p. 783-788, 2014.

HUNT, P. R. *et al.* *C. elegans* development and activity test detects mammalian developmental neurotoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 583-592, 2018.

HUSSAIN, S. *et al.* Pathological and genotoxic effects of atrazina in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1-8, 2011.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, 2020.

JABLONOWSKI, N. D. *et al.* Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 7, p. 2126-2131, 2009.

KALETTA, T. & HENGARTER, M. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, 2006.

KIM, K. H. *et al.* Optimal recovery of high purity rutin crystals from the whole plant of *Fagopyrum esculentum* Moench (buckweath) by extraction, fractionation and recrystallization. **Bioresource Technology**, v. 15, n. 15, 2005.

LAMB, S. D. *et al.* Paternal exposure to a common herbicide alters the behavior and serotonergic system of zebrafish offspring. **PLoS ONE**, n. 15, v. 4, 2020.

LERRO, C. C. *et al.* A longitudinal study of atrazine and 2,4-D exposure and oxidative stress markers among iowa corn farmers. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 1, p. 30-38, 2017.

LI, Y. *et al.* The effect of exposure to atrazine on dopaminergic development in pubertal male SD rats. **Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 104, n. 5, p. 184-185, 2015.

LIN, Z. *et al.* Gestational and lactational exposure to atrazine via the drinking water causes specific behavioral deficits and selectively alters monoaminergic systems in C57BL/6 mouse dams, juvenile and adult offspring. **Toxicological sciences**, v. 141, n. 1, p. 90-102, 2014.

LU, J. M. *et al.* Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MA, K. *et al.* Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Molecular BioSystems**, 2015.

MACHADO, D. G. *et al.* Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**, n. 587, p. 163-168, 2008.

MACK, H. *et al.* The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 27, p. 3-13, 2018.

MARCHI, G. *et al.* Herbicidas: mecanismos de acción y uso.

MARTINS, E. C. *et al.* Sorption and desorption of atrazine on soils: The effect of different soil fractions. **Geoderma**, v. 322, p. 131-139, 2018.

MBAVENG, A. T. *et al.* Harmful and Protective Effects of Phenolic Compounds from African Medicinal Plants. **Toxical Survey of African Medicinal Plants**, 2014.

MOK, D. *et al.* Morphologically defined sub-stages of *C. elegans vulval* development in the fourth larval stage. **BMC Developmental Biology**, v. 15, n. 1, 2015.

MONTAGNER, C. C. *et al.* Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the state of Sao Paulo (Brasil). **Analytical Methods**, v. 6, 2014.

MOSONI, M. *et al.* Antioxidant supplementation had positive effects in old rat muscle, but through better oxidative status in other organs. **Nutrition**, v. 26, n. 11, 2010.

MOYA, A. *et al.* Reproductive toxicity by exposure to low concentration of pesticides in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v. 475, 2022.

NADARAJAN, et al. MSP and GLP-1/Notch signaling coordinately regulate actomyosin-dependent cytoplasmic streaming and oocyte growth in *C. elegans*. **Development**, v. 136n n. 13, p. 2223-34, 2009.

PANDEY, A. The UNC-53 mediated interactome. 2014.

PEIXOTO, H. S. *et al.* An anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) increases stress resistance and retards aging related markers in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. *et al.* Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **Journal of Visualized Experiments**, 2012.

QIN, X. *et al.* Antioxidant and reducing lipid accumulation effects of rutin in *Caenorhabditis*

elegans. **Biofactors**, v. 47, n. 4, 2021.

RAJKOVIC, V. *et al.* Alterations in jejunal morphology and serotonin-containing enteroendocrine cells in peripubertal male rats associated with subchronic atrazine exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2304-09, 2011.

ROHR, J. & MCCOY, K. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 1, 2010.

RUSSEL, S. *et al.* Regulation of the *C. elegans* molt by *pqn-47*. **Developmental Biology**, v. 360, n. 2, p. 297-309, 2011.

SHIH-HANG, L. *et al.* The antidepressant-like effect of ethanol extract of daylily flowers (金針花 Jīn Zhēn Huā) in rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 3, n.1, p. 53-61, 2013.

SILVEYRA, G. R. **Efectos del herbicida atrazina sobre el crecimiento ovárico y su control endocrino en crustáceos decápodos**. 2019. Tesis (Doctorado en Ciencias Biológicas) – Universidad de Buenos Aires, 2019.

SRINIVASAN, K. *et al.* Partial protective effect of rutin on multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 5, 2005.

STRADTMANN, S. & FREEMAN, J. Mechanisms of Neurotoxicity Associated with Exposure to the Herbicide Atrazine. **Toxics**, v. 9, n. 9, 2021.

SWAN, S. Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, 2006

TYSZCZUK, K. Sensitive voltammetric determination of rutin at an in situ plated lead film electrode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 2, 2009.

VÁZQUEZ-VILLEGAS, P. *et al.* Determinación de CL50 y CE50 de endosulfán lactona y diazinón en lombriz de tierra (*Eisenia foetida*). **Agroproductividad**, v. 11, n. 4, p.105-111, 2018.

VIDAL-GADEA, A. *et al.* Coordination of behavioral hierarchies during environmental transitions in *Caenorhabditis elegans*. **Worm**, v. 1, n. 1, p. 5-11, 2012.

VIDAL-GADEA, A. *et al.* *Caenorhabditis elegans* selects distinct crawling and swimming gaits via dopamine and serotonin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

the United States of America, n. 108, v. 42, p. 17504-09, 2011.

WANG, X. *et al.* Review of oxicology of atrazine and chlorpyrifos on fish. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 18, n. 4, p. 88-92, 2011.

YUANXIANG, J. *et al.* Exposure of mice to atrazine and its metabolite diaminochlorotriazine elicits oxidative stress and endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 782-790, 2014.

YANG, J. *et al.* In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008.

ZHANG, H. *et al.* Automated recognition and analysis of head thrashes behavior in *C. elegans*. **BMC Bioinformatics**, v. 23, n. 87, 2022.

ZHANG, Y. *et al.* Oxidative stress response in atrazine-degrading bacteria exposed to atrazine. **Journal of Hazardous Materials**, 2012.