



DATOS DEL PROYECTO	
• Título del Proyecto:	Estudio de la citotoxicidad y mutagénesis de cursos de agua de localidades del departamento de Rivera
• Número ID del proyecto:	200
• Área de conocimiento:	
• Facultad o Servicio:	Facultad de Ciencias
• Nombre completo de los-as Integrantes del equipo:	Maira De Negri, Isabel Volz, Dra. Paola Hernández, Dra. Maria Laura Lavaggi
• Correo electrónico del/de la estudiante referente:	volzisabel@gmail.com
•	
• Nombre completo del/de la docente orientador-a:	Dra. Maria Laura Lavaggi Destro
• Correo electrónico del/de la docente orientador-a:	marialavaggi@gmail.com
•	

**Objetivo General.**

Determinar la potencial citotoxicidad y mutagénesis, de cursos de agua de Vichadero y Tranqueras como una primera etapa de evaluación ambiental en el departamento de Rivera.

**Objetivos Específicos.**

- 1- Toma de muestras y fraccionamiento bioguiado mediante disolventes orgánicos.
- 2- Estudio de la actividad biológica citotóxica de las muestras y extractos orgánicos de los cursos de agua muestreados.
- 3- Estudio de la actividad mutagénica de las muestras y extractos orgánicos de los cursos de agua muestreados.

El departamento de Rivera se encuentra al noreste de Uruguay y sus principales ciudades son Rivera, Tranqueras y Vichadero. Últimamente, habitantes de estas ciudades han manifestado su preocupación debido a casos de intoxicación por el consumo de animales contaminados, además de ver aumentada la mortalidad de abejas, peces y otros animales; hecho que se cree puede atribuirse a fumigaciones frecuentes con plaguicidas (GEO, 2009). Todo esto ha sido motivo de interés en la realización de este proyecto, que permitió realizar muestreo y ensayos de citotoxicidad y mutagénesis en agua de la región, como un primer acercamiento a la problemática fundando así la base de futuros estudios.

<b>Mes</b>	<b>Descripción de las actividades</b>
1	Toma de muestras y fraccionamiento bioguiado de ciudad de Rivera y Tranqueras.
2	Determinación de la citotoxicidad en la línea celular V79.
3	Evaluación de mutagénesis
4	Toma de muestras y fraccionamiento bioguiado de Vichadero
5	Determinación de la citotoxicidad en la línea celular V79.
6	Evaluación de mutagénesis

El calendario de actividades en forma general se ha podido cumplir en tiempo y forma, la única dificultad que obligo que postergáramos la entrega del informe para esta fecha fue el hecho de que como en la ciudad de Rivera el laboratorio de Química aún no está del todo instalado, no permitió que pudiéramos a punto el ensayo de mutagénesis lo que obligo a que viajáramos a Montevideo para hacer uso del laboratorio de Centro de Investigación Nuclear para llevar a cabo el ensayo.

A parte de los datos obtenidos mediante los ensayos realizados se recopiló información sobre las distintas zonas a través de entrevistas realizadas a actores entendidos como el Director de la División de Medio Ambiente Sr. José Almada, el Sr. Alcalde del Municipio de Vichadero Carlos Ney Romero, la Sra. Directora Silvia Fulco de la Escuela No.41 de Paso Hospital, el Sr. Mayor Juan Vega del Escuadrón de Vichadero y subalternos. Todas estas entrevistas contribuyeron a que se pudiera obtener un mayor conocimiento de las zonas y poder decidir de forma más eficaz los lugares donde se realizaron los muestreos.

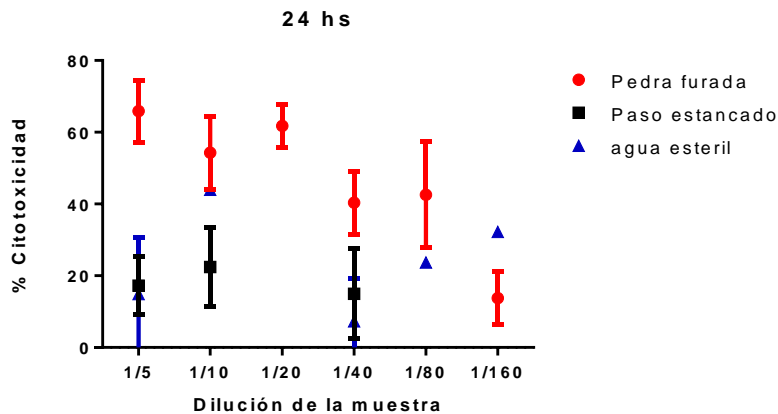
## **Resultados**

### **- Ensayo de citotoxicidad por MTT en línea celular V79**

Se analiza la **citotoxicidad** de **las muestras de agua o efluentes** mediante el ensayo de MTT. Las células se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos e incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, las mismas se expusieron a las muestras de efluentes tratados y esterilizados mediante filtración. Como control de viabilidad 100 % utilizaremos medio de cultivo completo con el mismo porcentaje de agua ultra pura estéril.

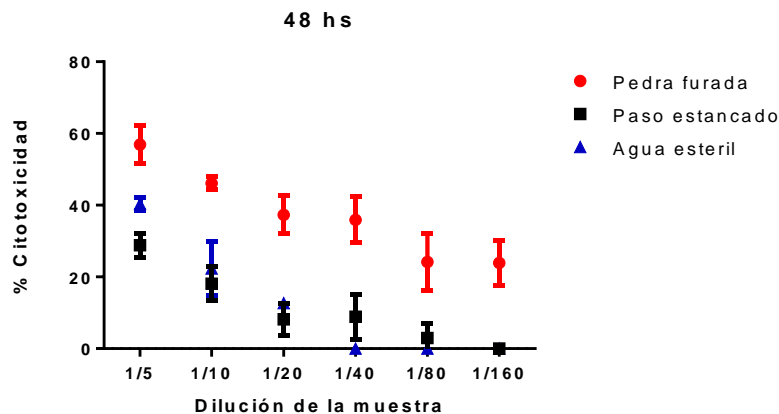
A continuación, la placa se incubó durante **24, 48 y 72 horas** a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se determina la citotoxicidad celular a través de la capacidad celular de reducir el MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazol, Sigma) a formazán por acción de reductasas celulares. Para esto, el medio de cultivo se retira y se adicionan una solución de MTT (5 mg/mL) en PBS estéril y se incubó durante 4 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. La solución de medio de cultivo-MTT se removió y se adicionó a una mezcla DMSO:isopropanol 1:1 para disolver los cristales de formazán. Posteriormente se midió la absorbancia a 560. Las células tratadas se compararon con el control tratado con agua ultra pura estéril y se calculó el porcentaje citotoxicidad. **Mayores**

concentraciones de formazán indica la presencia de mayor cantidad de células viables, si la muestra es citotóxica entonces la concentración de formazán generado será menor. El ensayo se realizó con diferentes diluciones de agua de dos puntos distintos de cursos de agua de la ciudad de Rivera, Pedra Furada y Paso Estancado que está dentro de Paso Billico; a las 24, 48 y 72 horas. En el **figura 1** muestra el porcentaje de citotoxicidad celular a las 24 hs. **Se observa que agua proveniente de la zona de Pedra Furada, muestra mayor porcentaje de citotoxicidad a medida que aumenta la concentración de la misma, mientras que el agua proveniente de Paso Estancado muestra un comportamiento similar al del agua estéril, utilizada como control.**



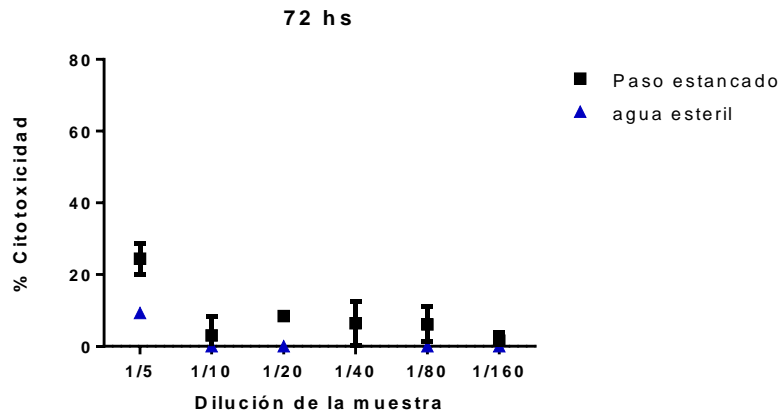
**Figura 1.** Gráfica de porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de agua a 24 horas de ambas zonas y agua estéril.

En la **figura 2** se muestra el porcentaje de citotoxicidad a las 48 hs.



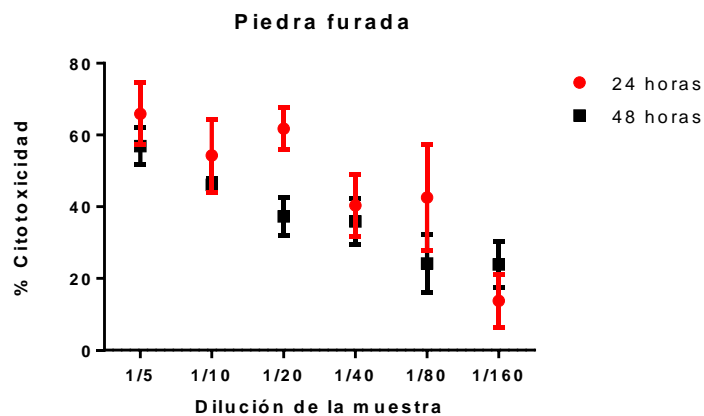
**Figura 2.** Gráfica de porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de agua a 48 horas de ambas zonas y agua estéril.

En esta se observa un efecto similar que en el gráfico anterior a 24 horas, el agua proveniente de la zona de Pedra Furada muestra menor porcentaje de citotoxicidad a medida que aumenta la concentración de la misma, mientras que el agua proveniente de Paso Estancado muestra un comportamiento similar al del agua estéril, este comportamiento se mantiene a 72 hs, lo cual se observa en la figura 3.

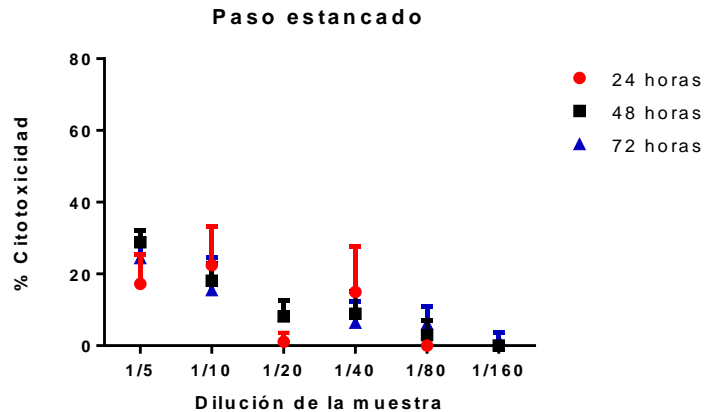


**Figura 3.** Gráfica de porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de agua a 72 horas de la zona de Paso Estancado comparado con el agua estéril.

La **figura 4** muestra el % de citotoxicidad de las células expuestas a efluentes/agua de la zona Piedra furada a las 24 y 48 horas y la **figura 5** el % de citotoxicidad en presencia de efluentes/agua de la zona Paso estancado a las 24, 48 y 72 horas.



**Figura 4.** Gráfica de porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de agua a 24 y 48 horas de la zona Piedra Furada.



**Figura 5.** Gráfica de porcentaje de citotoxicidad en función de la concentración de agua a 24, 48 y 72 horas de la zona Paso Estancado.

**En los dos casos anteriores, puede observarse que si bien existe citotoxicidad cuando el cultivo celular está en presencia de las muestras de agua más concentradas, este efecto se mantiene constante en los diferentes tiempos de incubación.**

### **Ensayo de mutagénesis.**

Se realizó el test de Ames de mutagénesis utilizando una cepa de *Salmonella typhimurium*, TA98. El mismo consiste en hacer crecer la cepa elegida en presencia de las muestras de agua/efluente a estudiar a diferentes diluciones, en un medio con trazas de histidina. Si la muestra produce nuevas mutaciones sobre las preexistentes, o cercano a estas en el gen, las bacterias reactivarán la función del gen revirtiendo el fenotipo y crecerán formando colonias<sup>1</sup>.

En el ensayo se realizara controles positivos (compuestos altamente mutagénicos para dicha cepa) y negativos (bacteria sin contacto con el compuesto), que garantizan por un lado contar con una gran reversión de la mutación, es decir la formación de muchas colonias, y por otro evidenciar las revertientes espontáneas. Esto último es fundamental, ya que la propia tasa de mutación del ADN genera mutaciones espontáneas todo el tiempo. El control realizado sirve para separar el efecto natural del efecto producido por la exposición a un compuesto en particular. A partir del control negativo se determina cuando un compuesto es mutagénico en dicha cepa, ya que según Chu y colaboradores un compuesto es mutagénico cuando es capaz de al menos duplicar en número de colonias a las colonias revertientes espontáneas.

Las muestras que se estudian son 5: Paso Estancado que pertenece a Paso Billico de la ciudad de Rivera, Balneario Municipal de Tranqueras, Represa de OSE de Vichadero, Paso Hospital y

agua de canilla de la Escuela Pública de Paso Hospital pertenecientes estos al municipio de Vichadero. Las concentraciones que se utiliza para cada muestra son 200; 66; 22; 7,4 y 2,4 microlitros. Los resultados obtenidos en el ensayo de mutagénesis a cualquiera de las concentraciones han sido negativos. El número de colonias obtenidas a estas concentraciones no ha duplicado en ninguno de los casos el número de colonias revertientes espontaneas del control como se puede ver en la **tabla 1**.

En todo el proceso de desarrollo del proyecto ha sido fundamental la colaboración continúa por parte de los sujetos involucrados. Estos han trabajado de forma coordinada para la realización de cada etapa y así se ha podido obtener una primera aproximación a la problemática planteada que permitirá de ahora en adelante continuar estudios relacionados y nuevos proyectos en la zona.

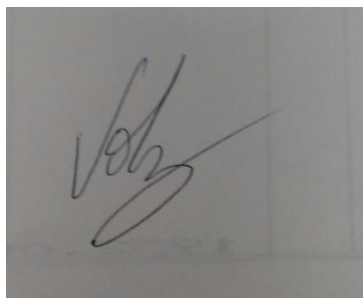
**Tabla 1.** Número de colonias obtenidas en el Ensayo de Mutagénesis en fracción S9.

microlitros por placa	Paso Hospital	Grifo de escuela en Paso Hospital	Represa de OSE en Vichadero	Paso Estancado de zona Billico	Balneario Municipal Tranqueras
200	3	7	6	3	8
66	13	4	2	5	8
22	2	11	4	5	7
7,4	7	12	4	10	6
2,4	1	10	3	13	6

**Tabla 2.** Control positivo y negativo de Ensayo de Mutagénesis en fracción S9.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año
1	A adquirir libro de Química Ambiental 3ra. Edición Colin Baird.



.....  
 FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)



**Comentarios del docente orientador:**

Los estudiantes involucrados cumplieron con las etapas de trabajo propuestas, siendo beneficioso para su formación en el área de la citotoxicidad, mutagénesis aplicado a estudios de contaminación ambiental. En este caso se realizaron estudios de cursos de agua del departamento de Rivera, como primera aproximación a un estudio que abarque una mayor área del departamento.

A rectangular box containing a handwritten signature in black ink on a grey background. The signature is cursive and appears to read 'Hafanezang'.

.....  
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR