

Capítulo 4.

METODOLOGÍA

4.1 Pruebas de adición de aceites y grasas

Para aplicar las distintas dietas ricas en lípidos en un medio acuoso, en el cual habitan los nematodos, fue necesario llevar a cabo distintas pruebas. En ellas se evaluó el mejor método. El proceso general que se siguió para evaluar las formas de adición de grasas se indican en la Figura 17:

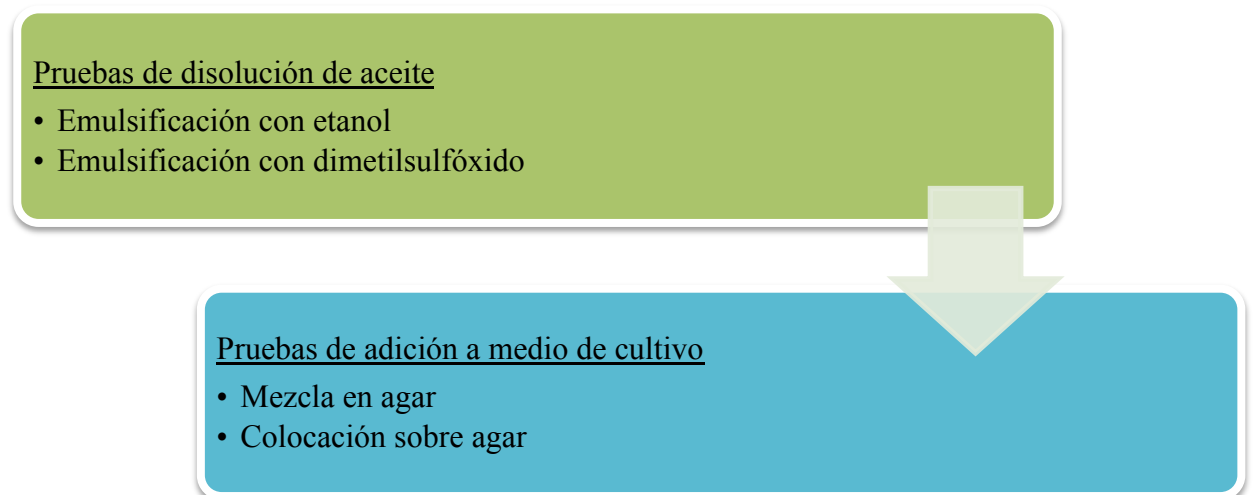


Figura 17. Pruebas de adición de aceites y grasas en dietas de *C. elegans*.

4.1.1 Material

Se empleó etanol absoluto, dimetilsulfóxido, aceite de soya, mezcla de aceites recalentados, microtubos tipo Eppendorf, micropipeta (Biohit Proline, Alemania), puntas estériles, agitador vórtex (Science Med, Finlandia), matraz Erlenmeyer, agar NGM (Anexo 1), cajas Petri, campana de flujo laminar (The Baker Company, Estados Unidos).

4.1.2 Metodología

4.1.2.1 Pruebas de disolución de aceites

Se realizaron dos pruebas diferentes para facilitar la adición de aceites en el medio de cultivo de *C. elegans*. Las pruebas de disolución se realizaron con aceite de soya fresco y con una mezcla de aceite recalentado. Éste último se obtuvo del laboratorio de alimentos de la UDLAP. Se colocaron en microtubos tipo Eppendorf 5 μL de cada aceite, disolviéndolos en 500 μL de etanol absoluto, y otros 5 μL de los aceites disueltos en la misma cantidad de dimetilsulfóxido. Posteriormente, se agitó usando vórtex y se observó que tan eficaz fue cada solvente en disolver a los aceites.

4.1.2.2 Pruebas de adición a medios de cultivo

Se decidió llevar a cabo evaluaciones de la mejor opción de adición de tratamientos a los medios de cultivo. Para la primera opción, se elaboraron dos agares NGM (ver Anexo 1), uno añadiendo aceite de soya fresco y otro con la mezcla de aceites reutilizados. En ambos se agregaron 10 mg de aceite, disueltos en 1000 μL de etanol absoluto, a 100 mL de agar. Posteriormente se esterilizaron los agares y se vaciaron en cajas Petri, se dejaron enfriar y se les colocó alimento. Realizado esto, se sembraron los nematodos en las cajas y se colocaron en la incubadora a 20°C durante tres días, registrando los resultados obtenidos.

Para la segunda opción, las soluciones se adicionaron sobre de los agares: se tomaron dos cajas Petri con agar NGM gelificado, se les colocó a cada una 1 mg de cada tipo de aceite disuelto en 100 μL de etanol absoluto y se permitió que la solución se secase. Por último, se les añadió alimento, se sembraron nematodos en las cajas y se colocaron en la incubadora a 20°C durante tres días, registrando los resultados obtenidos.

4.2 Obtención del aceite fresco y de frituras

4.2.1 Material

Se empleó aceite de soya marca Nutrioli, el cual se obtuvo del supermercado, manteca de cerdo, obtenida de la central de abastos, freidora, alimento a freír y termómetro.

4.2.2 Metodología

Al comprar las muestras tanto de aceite de soya como de la manteca, se tomó un alícuota de cada una y se conservaron en un congelador a -20°C hasta realizar las pruebas posteriores con ellos (Fararh et al., 2012; Wang et al., 2013). Consecutivamente, se procedió a freír los alimentos para obtener los aceites oxidados, lo cual se llevó a cabo tal como se indica en la Figura 18.

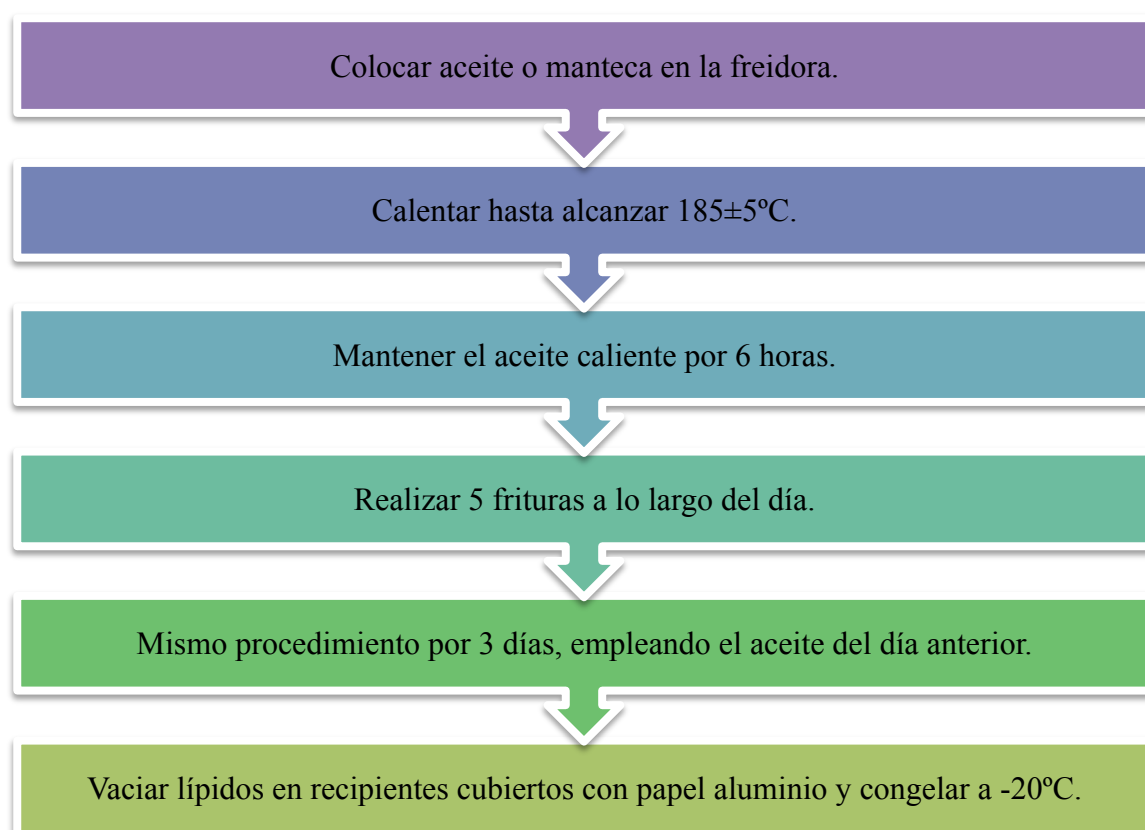


Figura 18. Proceso de fritura.

4.3 Evaluación de rancidez oxidativa de aceites y grasas

Para evaluar el estado de los aceites y grasas tanto en su estado fresco como después del proceso de fritura, se propuso llevar a cabo el ensayo de Índice de Peróxidos.

4.3.1 Material

Matraz Erlenmeyer, balanza analítica (Ohaus, Estados Unidos), probetas, agitador magnético, barra magnética, pipetas y bureta.

4.3.2 Metodología

Para llevar a cabo la evaluación, se llevó a cabo el método de la Norma Mexicana (1987), con algunas modificaciones. Se comenzó por pesar 5 g de las muestras en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, al cual se le agregaron 30 mL de mezcla de ácido acético-cloroformo 3:2 y se agitó hasta disolver la grasa o el aceite. Se agregaron 0.5 mL de solución de yoduro de potasio saturada, se agitó fuertemente y se almacenó por exactamente un minuto en la oscuridad. Posteriormente se añadieron a la mezcla 30 mL de agua destilada caliente, dejando agitar por un minuto. Después, se agregaron 5 mL de solución de almidón 1% y se homogenizó nuevamente. Se procedió a titular la mezcla con tiosulfato de sodio 0.005 N y se realizaron los cálculos del IP con la fórmula correspondiente. La preparación de los reactivos empleados se señala en el Anexo 2.

$$\text{Peróxidos (meq O}_2\text{/kg aceite)} = [(M-B) \times N \times 1000] / P$$

Donde:

M: Tiosulfato de sodio necesario para titular la muestra (mL)

B: Tiosulfato de sodio necesario para titular el blanco de reactivos (mL)

N: Normalidad del tiosulfato de sodio

P: Peso de la muestra (g)

Los resultados se expresaron en meq O₂/kg aceite. El experimento se realizó por triplicado y los resultados se graficaron, indicando media y desviación estándar.

4.4 Estudio biológico

El proceso general que se siguió para llevar a cabo los estudios biológicos en el nematodo se indica en la Figura 19.

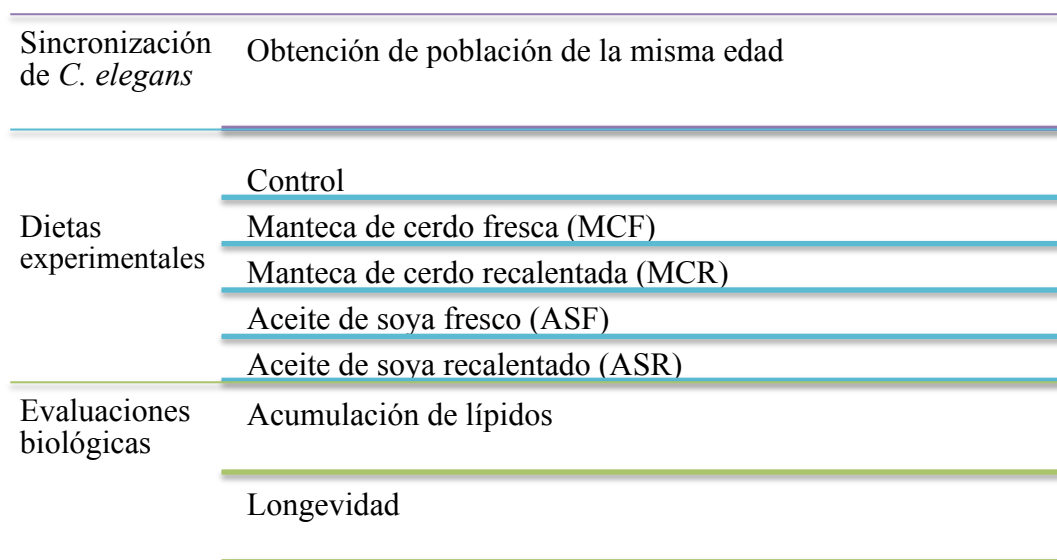


Figura 19. Estudio biológico.

4.4.1 Material

Microtubos tipo Eppendorf, micropipeta (Biohit Proline, Alemania), puntas estériles, agitador vórtex (Science Med, Finandia), centrífuga (Thermo Scientific, Estados Unidos), agitador orbital (Labline, India), tubos tipo Falcon, alícuotas de aceites y grasas a emplear, etanol absoluto, probeta, balanza analítica (Ohaus, Estados Unidos), aluminio, cajas Petri con agar NGM, ultracongelador (Thermo Scientific, Estados Unidos), microscopio óptico (Nikon Optiphot, Japón), portaobjetos, cubreobjetos, asa de platino, microscopio estereoscópico (Olympus, Japón), campana de flujo laminar (The Baker Company, Estados Unidos).

4.4.2 Metodología

A lo largo del estudio se trabajó con nematodos *C. elegans* N2, los cuales se mantuvieron en cajas Petri de 60 x 15 mm con agar NGM a 23°C en el Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica y Biotecnología de la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP). Los experimentos se realizaron por triplicado, por lo que se trabajó con tres cajas Petri de cada condición.

Se tuvo un grupo control y cuatro grupos experimentales, tal como se indica en la Tabla 4. Las dietas se proporcionaron desde el estadio larvario L1 y a lo largo de la vida del animal, pues se postuló simular un consumo prolongado de dichas dietas. Se evaluó la primera generación (P0) y la segunda generación (F1), proveyendo a ambas el mismo tipo de dieta.

Tabla 4. Dietas asignadas a los distintos grupos experimentales.

Grupo	Dieta
1	Control
2	Manteca de cerdo fresca
3	Manteca de cerdo recalentada
4	Aceite de soya fresco
5	Aceite de soya recalentado

4.4.2.1 Sincronización de *C. elegans*

Es importante tener una población de la misma edad para evitar errores en las mediciones, fue necesario llevar a cabo un método denominado *sincronización* (Anexo 3) en el cual se obtienen simplemente los huevecillos del nematodo, para así poder sembrarlos y trabajar con una población “sincronizada” en cuanto a la edad.

4.4.2.2 Dietas experimentales

Puesto que se decidió trabajar con una concentración de 1 mg de aceite por cada caja Petri con agar, según lo reportado por Sugawara et al. (2013) y con una disolución de 1:100, se elaboró un *stock* de los distintos aceites. Éste se realizó conteniendo 150 mg de aceite o manteca en 15 mL de etanol absoluto, en tubos tipo Falcon estériles y cubiertos con papel aluminio. Esta solución *stock* se almacenó a 4°C para evitar una posterior oxidación. De esta manera, a cada caja Petri empleada para experimentación se le debían añadir 100 µL de la preparación. En cuanto a las cajas Petri control, se les agregó 100 µL de etanol absoluto.

Para asegurar el consumo de las distintas dietas por parte del nematodo, fue indispensable colocar las soluciones de cada dieta sobre el agar NGM en las cajas Petri donde se contendrían a los animales. Una vez colocadas las distintas dietas, se prosiguió a sembrar el alimento usual de los animales (*E. coli* OP50) sobre la solución ya seca. Este procedimiento se realizó un día previo a la utilización de las cajas, para permitir que la bacteria consumiera los lípidos presentes en el medio y de esta manera los nematodos también lo hicieran, como se ha reportado en el estudio de Watts & Browse (2006). Por último, se sembraron los gusanos en los medios. Las cajas Petri se mantuvieron en oscuridad para evitar mayor oxidación de los lípidos empleados.

4.4.2.3 Evaluaciones

Acumulación de lípidos

En cuanto los nematodos llegaron al estadio larvario L4, se congelaron con hielo seco y etanol, y se almacenaron microtubos tipo Eppendorf en el ultracongelador a -80°C. Para

poder llevar a cabo la observación de acumulación de lípidos en *C. elegans*, se utilizó el protocolo de tinción de Rojo Oleoso. La preparación de los reactivos en este protocolo se pueden observar en el Anexo 1 del presente trabajo.

Los nematodos se descongelaron en el refrigerador a 4°C. Una vez descongelados, los microtubos se lavaron tres veces con buffer M9 para eliminar la bacteria restante y después se permitió que los gusanos se asentaran por gravedad en el fondo del microtubo Eppendorf, eliminando finalmente el sobrenadante. Posteriormente, se procedió a re-suspender los gusanos en 120 µL de PBS 1X y 120 µL de buffer MRWB 2X con paraformaldehído al 2%.

Se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación con hielo seco y etanol, permitiendo la descongelación a 30°C en las tres ocasiones en la incubadora de baño seco de microtubos. Tras el último deshielo, se centrifugó a 12000 RPM durante dos minutos a 20°C y se desechó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de PBS 1x y se dejó en dicha solución durante cinco minutos. Terminado este lavado, se centrifugó durante 30 segs a 4000 RPM y se retiró el sobrenadante. Para permitir la deshidratación de la muestra, se agregaron 150 µL de isopropanol 60% frío y se agitó, para después permitir la sedimentación de los gusanos a temperatura ambiente durante 15 min. Al terminar, se centrifugó durante 30 segs a 4000 RPM y después de un minuto y medio se retiró el sobrenadante.

Se procedió a teñir las muestras, agregando 250 µL del colorante Rojo Oleoso al 60% con isopropanol y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Al terminar, nuevamente se centrifugó a 4000 RPM durante 30 segs y se retiró el sobrenadante. El precipitado se lavó en tres ocasiones con 200 µL PBS1x Tx para eliminar el paraformaldehído, dejándolo reposar cinco minutos en cada ocasión y centrifugando siempre a 4000 RPM durante 30 segs a 4°C. Tras el último lavado y con ayuda de la micropipeta y puntas estériles, se colocó glicerol en un portaobjetos y sobre éste, una

muestra diluida con los nematodos. Se observó el resultado, analizando en un microscopio óptico la intensidad de la tinción, que se relaciona a un mayor nivel de acumulación de lípidos, y se documentaron tres imágenes parra cada tratamiento y el control.

Longevidad

Se permitió que los gusanos la etapa de adulto joven, considerando dicho día como el primero de su longevidad. En cuanto esto sucedió, se colocaron 100 gusanos en nuevas cajas Petri con las mismas condiciones empleadas y con comida. Los nematodos se observaron cada día a través del microscopio estereoscópico, contando los decesos diarios, y retirándolos con una punta de platino hasta llegar a un total de 100 fallecimientos (Lionaki & Tavernarakis, 2013).

Durante la primera semana de la experimentación las cajas con los nematodos se lavaron diariamente debido a la producción de embriones y, posteriormente, cada segundo día para evitar la contaminación de la caja. Las muertes se consideraban una vez que el gusano no respondiera a un estímulo físico realizado con el asa de platino (Lionaki & Tavernarakis, 2013; Sugawara et al., 2013).

Para el análisis de supervivencia se empleó el estimador de Kaplan-Meier y también se calculó el valor p , utilizando el test log-rank para la comparación de curvas ($p < 0,05$). El software GraphPad Prism se empleó para realizar las gráficas de supervivencia (Guha et al., 2013; Lionaki & Tavernarakis, 2013).