



*Efecto de la cúrcuma sobre características fenotípicas de la cepa mutante de
Caenorhabditis elegans NL5901 para la enfermedad de Parkinson*

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTA, 2018



*Efecto de la cúrcuma sobre características fenotípicas de la cepa mutante de
Caenorhabditis elegans NL5901 para la enfermedad de Parkinson*

Presentado por:
ANGIE FERNANDA FAJARDO RUSINQUE

Asesor:
RUTH MELIDA SANCHEZ MORA

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, 2018

DEDICATORIA

A Dios por apoyar mis planes y darme el amor necesario para llevar este proyecto a cabo, por dirigir mi camino de la mejor forma y poner en el las personas adecuadas.

A mi familia, madre padre y hermano en los cuales encontré el apoyo y soporte para continuar en las dificultades presentadas, por ser mi paz y roca en el camino.

A mi tía Diana y su familia, quienes me acogieron de la más calurosa y amorosa forma durante todo este proceso y de quienes tengo una profunda gratitud.

A mi abuela Sara quien me enseñó el valor de hacer las cosas de la mejor forma, con lo que fue posible el resultado a detalle de este proyecto.

A Juan David por su amoroso trato y por su fiel compañía en cada proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de llenar mi vida de conocimiento y de llevar a cabo con satisfacción este proyecto.

A la Doctora Ruth Mélida Sánchez Mora por su confianza, enseñanzas y tiempo dedicado a este proyecto.

A Lizeth González por su disponibilidad y apoyo científico a lo largo del camino.

A la UCMC por brindar el personal idóneo de apoyo y los requerimientos para llevar a cabo los resultados.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
1. OBJETIVOS.....	15
1.1 Objetivo general.....	15
1.2 Objetivos específicos.....	15
2. ANTECEDENTES.....	16
3. MARCO TEORICO.....	21
3.1 Enfermedad de Parkinson EP.....	21
3.1.2 Generalidades y Epidemiología.....	21
3.1.3 Etiología y componente genético.....	22
3.1.4 Alfa Sinucleína.....	23
3.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
3.1.2 Sistema digestivo de <i>C. elegans</i>	28
3.1.3 Sistema nervioso.....	29
3.1.4 Sistema muscular.....	31
3.1.5 Sistema reproductor.....	32
3.1.6 Ciclo de vida.....	33
3.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> y la enfermedad de Parkinson.....	35
3.3 Estrés Oxidativo.....	38
3.4 Cúrcuma.....	38
4 DISEÑO METODOLÓGICO.....	42
4.1 Tipo de estudio y población.....	42
4.2 Hipótesis.....	42
4.3 Procedimientos y técnicas.....	42
4.3.2 Preparación del NGM y condiciones de cultivo.....	42
4.3.3 Preparación de solución de la cúrcuma.....	43
4.3.4 Sincronización por medio del tratamiento con hipoclorito.....	43
4.3.5 Concentración Mínima Inhibitoria.....	44
4.3.6 Fenotipificación de las cepas de <i>C. elegans</i> NL5901 y N2.....	44
4.3.7 Evaluación estadística de los datos obtenidos.....	46

5	RESULTADOS	49
5.1	Estadios Larvarios y diferencias fenotípicas de las cepas N2 y NL5901	49
5.2	Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la longevidad de la cepa NL5901 de <i>C elegans</i>	55
5.3	Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la movilidad de la cepa NL5901 de <i>C elegans</i>	56
5.4	Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la reproducción de la cepa NL5901 de <i>C elegans</i>	57
5.5	Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la agregación proteica de la cepa NL5901 de <i>C elegans</i>	59
6	DISCUSIÓN	61
7	CONCLUSIONES	64
8	REFERENCIAS	65
9	ANEXOS	69

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1 Configuración estructural de Alfa-sinucleina	23
Ilustración 2 Nematodo N2 Adulto.....	27
Ilustración 3 Anatomía de la faringe de C elegans.....	29
Ilustración 4 Sistema nervioso de C elegans marcado con (GPF) Proteína verde fluorescente.	30
Ilustración 5 Región de la cabeza de C elegans con diferentes marcadas en diferentes colores.	31
Ilustración 6 Observación de estructura muscular de C elegans con su estructura interna.....	31
Ilustración 7 Observación de las diferencias de género del nematodo C elegans.....	32
Ilustración 8 Esquema de embriogenias de C elegans.....	33
Ilustración 9 Ciclo de Vida C elegans.....	35
Ilustración 10 Diseño de plásmido insertado en la cepa NL5901 para la expresión de alfa sinucleina, unida con YPF para su visualización.....	37
Ilustración 11 Observación por fluorescencia de larva L2 de la cepa NL5901 de C elegans NL5901	37
Ilustración 12 Estructura química de la curcumina.....	40
Ilustración 13 Vías de señalización reguladas por la curcumina.....	40
Ilustración 14 Observación de cajas NGM en estereoscopio, se observan las diferencias fenotípicas de los nematodos en diferentes estadios a lo largo del ciclo de vida del nematodo.	50
Ilustración 15 Comparación fenotípica de nematodos de la cepa mutante NL5901 y cepa salvaje N2 de Caenorhabditis elegans. Observación en estereoscopio de los nematodos a través del ciclo de vida del nematodo. ..	51
Ilustración 16 Caracterización fenotípica de longevidad en cepas de C elegans NL5901 junto con N2 o cepa salvaje.	52
Ilustración 17 Caracterización fenotípica de reproducción en cepas de C elegans NL5901 junto con N2 o cepa salvaje	53
Ilustración 18 Observación del fenómeno de Eclosión Matricida en la cepa NL5901.	54
Ilustración 19 Caracterización fenotípica de movilidad en cepas de C elegans NL5901 junto con N2 o cepa salvaje	55
Ilustración 20 Observación de agregados proteicos de α-sinucleina en cepas N2 y NL5901 C elegans. Observación en microscopio de fluorescencia. Foto tomada por autora.....	55

Ilustración 21 Ensayo de Longevidad en cepa de C elegans NL5901 en tratamiento a 8 diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL) dato expresado en porcentaje	56
Ilustración 22 Ensayo de movilidad en cepa de C elegans NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL), movilidad expresada en número de ondas realizadas en 30 segundos.	57
Ilustración 23 Ensayo de reproducción en cepa de C elegans NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL)	58
Ilustración 24 Observación de fluorescencia de nematodos sometidos al tratamiento junto con la cepa control.....	59
Ilustración 25 Cuantificación de fluorescencia en cepa de C elegans NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de Caenorhabditis elegans.....	27
Tabla 2 Explicación de valores obtenidos de una prueba One Way ANOVA.....	47
Tabla 3 Tabla de conversión a porcentaje, de los datos obtenidos en ensayo de Longevidad	70
Tabla 4 Tabla de resultados del Ensayo de Movilidad, valores expresados en ondas en 30 segundos.	72
Tabla 5 Tabla de resultados en el ensayo de Reproducción	72
Tabla 6 Tabla de resultados de cuantificación proteica, valor expresado del programa Imaje J y su conversión en porcentaje.	73

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, es primordialmente una enfermedad relacionada con la edad, afectando típicamente a personas sobre los sesenta años. Aunque, no tiene una etiología definida existen procesos biológicos similares en los pacientes. Entre estos, el aumento del estrés oxidativo, la pérdida selectiva y temprana de neuronas dopaminérgicas en la Substancia Nigra y la formación de los cuerpos de Lewy. Los cuerpos de Lewy están compuestos por la acumulación de la alfa-sinucleína, una proteína fisiológica que se pliega de forma patológica en la EP.

Un modelo para el estudio de la EP es el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Para la evaluación de la agregación proteica de alfa sinucleína existe la cepa NL5901, la cual expresa un gen que promueve la acumulación de alfa-sinucleína acompañada por YPF una proteína amarilla fluorescente que permite su observación.

Múltiples estudios afirman que las moléculas antioxidantes tienen la capacidad de reducir agregados proteicos. Es por esto que este estudio usó la cúrcuma, un poderoso antioxidante, para demostrar el efecto que tiene sobre los agregados proteicos y el cambio en características fenotípicas del nematodo, como longevidad, reproducción y movilidad.

La cepa NL5901 fue sometida a varias concentraciones de solución de cúrcuma. Donde se demostró que, el tratamiento de la cúrcuma disminuye significativamente la agregación proteica, efecto que es directamente proporcional a la concentración a la cual el nematodo es sometido, y que mejora las características fenotípicas como longevidad, reproducción y movilidad del nematodo.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, cúrcuma, enfermedad de Parkinson, alfa sinucleína.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación estudió el efecto de la cúrcuma sobre uno de los marcadores patológicos de la Enfermedad del Parkinson. Aunque la etiología de esta enfermedad no está definida, Los pacientes que la sufren presentan marcadores patológicos, como, la pérdida temprana de las neuronas dopaminérgicas, disminución de niveles de dopamina, presencia de cuerpos de Lewy en la Substancia Nigra, entre otros. Los cuerpos de Lewy están formados por una proteína fisiológica llamada alfa sinucleína, la cual sufre un mal plegamiento, lo que forma inclusiones proteicas.

El estudio de las enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad del Parkinson, cobra importancia debido al crecimiento de la población afectada, los adultos mayores. Adicionalmente, se presentan muchas dificultades en el diagnóstico, limitantes de tratamiento, lo que lleva a aumentar el declive en la calidad de vida del paciente que la padece, convirtiendo así las enfermedades neurodegenerativas en un problema de salud pública.

La EP es una enfermedad muy estudiada, los avances en la determinación de la etiología han llevado al desarrollo de tratamientos y manejo de la enfermedad. Las investigaciones realizadas buscan entender su proceso biológico, es por esto que el nematodo *C. elegans* es usado en su investigación. La cepa NL5901 del nematodo, permite la evaluación de la agregación proteica de α - sinucleína, la cual está marcada con proteína amarilla fluorescente (YFP) lo que permite su observación con un microscopio de fluorescencia. *C. elegans* es un modelo biológico de fácil mantenimiento, solo requiere un medio con las condiciones óptimas para su crecimiento, *E. coli* OP50, su fuente alimento y condiciones ambientales óptimas, cuenta con un ciclo de vida corto, lo que ha convertido a este nematodo en un modelo para el estudio de diferentes procesos biológicos.

Así como la observación del agregado proteico, las características fenotípicas del nematodo, permiten sacar conclusiones de su comportamiento y describir los efectos ante la exposición a sustancias potenciales para la reducción de la agregación proteica. Mediante la longevidad se puede medir la esperanza de vida del nematodo. La cepa NL5901 bajo el tratamiento de cúrcuma, en concentración de 1.0 mg/ml, aumenta su esperanza de vida igualando el valor de la cepa salvaje.

Debido a que se trata de una a agregación proteica a nivel muscular, la movilidad del nematodo se ve afectada, por lo cual el monitoreo de la misma, sirve como soporte del efecto de la agregación proteica y su comportamiento bajo diferentes

concentraciones de tratamiento, característica que mejora ante el tratamiento con cúrcuma. Este efecto es directamente proporcional a la dosis aplicada.

La reproducción de los nematodos, requiere una contracción muscular, que provoca fenómenos en la cepa NL5901, como el efecto matricida. El valor de la reproducción aumenta en relación a la dosis aplicada y a la disminución del agregado proteico.

Múltiples antioxidantes muestran la capacidad de reducir la agregación proteica, es por esto que la cúrcuma, un poderoso antioxidante usado en la medicina ayurveda en múltiples tratamientos, sugiere su poder en la reducción de agregados proteicos, en enfermedades como la EP. Lo cual se ha mostrado previamente en otros modelos biológicos, donde los efectos son evaluados por comportamiento o características fenotípicas macroscópicas de los modelos. En *C elegans*, la observación del agregado proteico, y la cuantificación del mismo, permite hacer apreciaciones de los efectos producidos por la agregación proteica de forma directa.

Adicionalmente los ensayos realizados para definir las características de la cepa, como el de longevidad, reproducción y movilidad soportan los efectos que tiene una reducción del agregado en el nematodo. Dentro de las propiedades de la cúrcuma se encuentra su potente acción bactericida, este estudio consideró el efecto que la cúrcuma puede ejercer sobre *E coli* OP50, asegurando así la fuente de alimento del nematodo durante los ensayos realizados. La evaluación arrojó que *E coli* OP50 no es sensible a la cúrcuma.

En este estudio describió las diferencias entre las cepas NL5901 y N2 o cepa salvaje, a través de características fenotípicas como la longevidad, reproducción y movilidad. El resultado obtenido es que las cepas presentan diferencias las cuales son atribuidas a la agregación proteica que presenta la cepa NL5901. Durante el tratamiento de los nematodos con la cúrcuma, se pudo observar la disminución de los agregados proteicos, donde la concentración más alta a la que fue sometido el nematodo presenta 46% de fluorescencia con relación a los que no fueron sometidos a tratamiento. Los cambios de las características fenotípicas de la cepa NL5901 cambiaron en relación a la dosis aplicada, mostrando un aumento en la longevidad del nematodo, aumento en el valor de movilidad y reproducción.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Describir el efecto de la cúrcuma sobre las características fenotípicas de longevidad, esperanza de vida, reproducción y agregación proteica de alfa sinucleina en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*.

1.2 Objetivos específicos

1. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de la solución de cúrcuma a diferentes concentraciones para *E. coli* OP50.
2. Describir las características fenotípicas de la cepa salvaje N2 y la cepa mutante NL5901.
3. Evaluar el efecto de la cúrcuma sobre las características fenotípicas de la cepa NL5901 posterior al tratamiento en diferentes concentraciones.

2. ANTECEDENTES

La enfermedad del Parkinson EP, fue escrita como un desorden neurológico en 1817 por James Parkinson, cincuenta años después Jean-Martin Charcot definió la EP de forma más detallada debido a la observación de un grupo de pacientes los cuales presentaban bradicinesia y rigidez en la expresión facial. Esto condujo a un cambio del nombre que tenía anteriormente a la descripción de la sintomatología, esta enfermedad era llamada “Paralysis agitans” o “shaking palsy” pero ante la caracterización de los síntomas ya mencionados dio lugar a definir lo que hoy se conoce como la Enfermedad del Parkinson. (1)

En 1880, William Gowers, estudio un grupo de 80 pacientes donde describió una presencia un poco más alta de casos en hombres y estudio las deformidades en las articulaciones típicas de la enfermedad. Estudios posteriores, en 1925, determinaron el daño en la Substancia Nigra y la parte media del cerebro en pacientes con la EP. Para 1967 Hoeh y Yahr, hacen un avance remarcable en la enfermedad al clasificarla por estadios, encontrando que en el estadio I de la enfermedad era definido por síntomas unilaterales, cuando la progresión alcanza límites bilaterales se habla de los estadios II-V y cuando se ven afectados los reflejos del paciente es denominado el estadio III. Para este momento, el estudio de los circuitos neuronales y la determinación del cuadro de sintomatología, dieron lugar a la observación de anomalías en sitios como la Substancia Nigra, el globus pallidus y el striatum. (1)

Aunque la etiología y el orden de los procesos ocurridos en la EP no han sido definidos, desde el siglo pasado se han venido realizando avances para el entendimiento del proceso patológico de la enfermedad. Hace un siglo la escuela alemana de Neuropatólogos describieron las diferencias del tejido que existían en las enfermedades neurodegenerativas. En 1912 Friederich Lewy describió las inclusiones características de la EP o cuerpos de Lewy. En 1960 la microscopía electrónica dio paso al conocimiento de que estas inclusiones estaban formadas por filamentos anormales. En 1997, una mutación anti sentida en el gen de la α sinucleína, fue relacionado con la aparición de casos de familias que padecían la

EP. Adicionalmente, se descubrió que los cuerpos de Lewy presentes en los casos esporádicos de la EP eran altamente inmuoreactivos para la α sinucleína.(2)

La relación que existe entre la EP y la agregación de α -sinucleína fue demostrada desde 1998 en un estudio en el que se tomaron cerebros obtenidos de autopsias de pacientes con la EP, de los que se extrajeron y se purificaron los Cuerpos de Lewy, mediante el método de centrifugación por gradiente de sacarosa. El resultado fue marcado con anticuerpos específicos y observado con microscopía electrónica. La cuantificación de la presencia de agregados proteicos fue realizada por la técnica de Western Blot. Los resultados arrojaron que α sinucleína se aloja en su forma fisiológica y mutante en los cuerpos de Lewy, provocando así el daño selectivo de neuronas dopaminérgicas en pacientes con EP de tipo esporádico. (3)

Desde el descubrimiento de *C. elegans* el entendimiento de las enfermedades neurodegenerativas ha avanzado. Este nematodo tiene características particulares que lo hacen un modelo adecuado, destacado por su sistema nervioso accesible, corto tiempo de generación (tres días) y esperanza de vida (3 semanas), fácil manipulación genética y distinguibles defectos neurológicos y de comportamiento, acompañado de un alto nivel de conservación en rutas bioquímica comparado con humanos. Existe una alta similitud a nivel molecular y celular entre las neuronas del nematodo y las de los vertebrados.(4)

Desde que *C. elegans* fue descubierto ha sido usado como modelo para el entendimiento de procesos biológicos, en el 2010 Tjakko desarrolló un modelo de *C. elegans* con el cual fue posible monitorear, en animales vivos la formación de las inclusiones de α - sinucleína, a través de la utilización de RNA de interferencia. Para ello el gen de la α - sinucleína fue fusionado con la proteína amarilla fluorescente (YFP) que permitió evidenciar la expresión, todo el constructo bajo el control del promotor *unc-54* el cual dirige la expresión a la pared muscular del nematodo. Se prefirió hacer la expresión de la proteína en la pared muscular y no en las neuronas debido a que la expresión dirigida por *unc-54* es más fuerte en la pared muscular, los músculos al ser largos permiten una mejor visualización. Adicionalmente, el ingreso de RNAi por vía alimenticia, funciona con más eficiencia en las paredes musculares.(5)

Un estudio en el cual *C. elegans* fue tomado para evaluar el estrés y la agregación proteica PolyQ, en la enfermedad de Huntington, muestra que cuando es aplicado a la cepa mutante de *C. elegans* un potente antioxidante como el salidrósido, un glucósido de tirosol que se encuentra en la planta *Rhodiola rosea*, este puede disminuir la muerte neuronal por la disminución del estrés oxidativo. Aunque, fue demostrado que la agregación de PolyQ sigue presente en el curso

de la enfermedad, la muerte neuronal y la disfunción del comportamiento disminuye significativamente. (6)

Por otro lado, Jinghua Liu et al en 2010 uso la cepa transgénica de *C elegans*, NL5901 la cual expresa la YPF proteína amarilla fluorescente fusionada con α -sinucleína en la pared del cuerpo del nematodo, esta fue tratada con el extracto etanolico de *Chondrus crispus*, un antioxidante el cual reduce los agregados proteicos. Para revelar los resultados uso la técnica de cuantificación Western Blot y la observación de la fluorescencia producida por la cepa transgénica. Con este procedimiento se pudo demostrar que durante el ciclo de vida del nematodo en el quinto día de vida fue posible observar la reducción en la agregación proteica y que para el noveno día la reducción fue del 61% en la cepa tratada comparada con el control. (7)

Los componentes antioxidantes demuestran su capacidad de reducción de agregación proteica y la desestabilización de los agregados inducidos *In vitro*. En 2006, este efecto fue evaluado en cinco antioxidantes sobre la agregación proteica. Fluido cerebrospinal fue tomado de pacientes con la EP, para posteriormente purificar la proteína la cual fue cuantificada y observada por microscopia electrónica. Los antioxidantes evaluados fueron el ácido nordihidroguaiarético (Compuesto antioxidante, extraído del arbusto de lacreosota), cúrcuma, ácido rosmarinico (Compuesto antioxidante encontrado en varias plantas), ácido ferúlico (Compuesto encontrado en la pared vegetal de algunas plantas), fenoles presentes en el vino, entre otros. Los resultados arrojan que, el efecto producido por todos los antioxidantes es dosis dependiente, además entre los antioxidantes estudiados, la capacidad de reducción de agregación proteica, así como la prevención de la formación de los mismos está dada por la vía de reducción del estrés oxidativo y que de esta manera es que la molécula no permite la formación de fibrillas de la proteína. De los compuestos antioxidantes estudiados se encontró que el compuesto más efectivo es el Ácido tánico (Encontrado entre los polifenoles del vino) y que la cúrcuma tiene la tercera posición. (8)

El envejecimiento es un proceso biológico del cual no se tiene un total entendimiento. Sin embargo, han dado lugar a varias hipótesis. La hipótesis con más soporte científico es la del mecanismo de los radicales libres, donde las especies reactivas de oxígeno ROS, llevan a una disfunción mitocondrial lo que termina en muerte celular. (9) Los antioxidantes tienen la capacidad de anular el efecto de los radicales libres.

Sheng en su estudio del 2012 evaluó el efecto de la cúrcuma en tres modelos diferentes, sobre la longevidad. Se usaron los modelos de roedores, *Drosophila* y

C. elegans. En todos los modelos la cúrcuma retarda el envejecimiento celular, el aumento para *C. elegans* fue del 39.3%, con un tratamiento de 20mM, la concentración de mejor respuesta en *Drosophila melanogaster* fue de 1mg/g donde aumento la longevidad en 20.3% y finalmente el roedor el cual aumenta su esperanza de vida en 10%. Cabe resaltar que cada modelo mejora su longevidad por diferentes vías, En el caso de *C. elegans* el efecto que presenta se debe a su capacidad de reducción del estrés oxidativo, *Drosophila* aumenta su esperanza de vida a través del aumento de Superoxido Dismutasa (SOD) y el modelo del roedor a través de expresión de genes de control de ciclo celular. (9)

La acción de la cúrcuma ha sido evaluada en varias ocasiones y en diferentes modelos, por ejemplo en el 2010, Harish creo un modelo para la enfermedad de Parkinson donde lesionó roedores a través del suministro de 6 Hidroxidopamina (6-OHDA) (10 µg/2 µl en 0.1% ácido ascórbico-salino), una neurotoxina que tiene un efecto directo en las neuronas dopaminérgicas, la cual a través de la formación de agentes oxidantes y radicales libres genera una peroxidación lipídica de las neuronas causando su muerte y también causa una depleción en la producción del antioxidante natural de la enzima glutatión reductasa (GSH).(11)

Los roedores fueron tratados con cúrcumina, un componente de la cúrcuma, para observar el comportamiento de los animales lesionados con 6-OHDA. Para la evaluación del efecto de la cúrcumina, se tomó un grupo control de ratones al cual se le realizo la lesión sin la solución de tratamiento y el otro grupo con tratamiento de cúrcumina a diferentes concentraciones. Para la demostración del efecto de los tratamientos se realizó el suministro de la apomorfina (0.5 mg/kg) administrado por vía subcutánea, al grupo de ratas lesionadas y a las tratadas con curcumina, como estímulo al movimiento del roedor. El movimiento se vio afectado en los dos grupos. El suministro de apomorfina ratifica el daño de las células dopaminérgicas. (11,10)

Para medir el efecto de la lesión causada se realizó un estudio de coordinación muscular, que se hizo basado en el entrenamiento de las ratas en un Rotarod (Dispositivo para evaluar los movimientos del roedor) el cual generaba 10 ciclos de rotación por minuto. Los animales lesionados mostraron una depleción en la coordinación muscular comparada con el grupo previamente tratado con cúrcuma, se encontró que cúrcuma tiene un efecto de recuperación de la coordinación muscular. Lo que permite concluir que la cúrcuma ejerce un efecto protector ante las múltiples sustancias que puedan estar atacando a las neuronas dopaminérgicas por vías de estrés oxidativo, depleción de GSH o peroxidación lipídica entre otras. (10, 11)

El rol de la curcumina, en la reducción de la agregación proteica de la α -sinucleína fue mostrado en la línea celular catecolaminérgica SH-SY5Y. El modelo se produjo con la unión de la proteína roja fluorescente (DsRed2) y la mutación A53T. La curcumina demostró un efecto directo en la agregación de α -sinucleína, mediante la inhibición dosis-dependiente de la agregación proteica. Adicionalmente el tratamiento mostró un aumento en la solubilidad de los agregados ya existentes. (12)

Zhaohui Liu en el 2011, demostró la capacidad de protección de la cúrcuma contra los efectos producidos por la mutación A53T, a través de las células PC12 en las que fue inducida la mutación. Estas células fueron tratadas con soluciones de cúrcuma. Se encontró que, en comparación con el grupo control, el nivel de protección celular estaba directamente relacionado con la concentración administrada de cúrcuma. También se demostró que esta capacidad se debe a la acción que ejerce como antioxidante, reduciendo la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), en el proceso de despolarización mitocondrial, reducción en liberación de citocromos y de Caspasa 3 junto con Caspasa 9. Con lo que se pudo concluir, que la cúrcuma tiene la capacidad de proteger células PC12 de la mutación A53T, la cual induce muerte celular por la vía del estrés oxidativo. Sugiriendo a la cúrcuma como un principio de tratamiento contra las enfermedades Neurodegenerativas. (13)

3. MARCO TEORICO

3.1 Enfermedad de Parkinson EP

3.1.2 Generalidades y Epidemiologia

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo el cual incluye circuitos neuronales motores y no motores. Es caracterizado por la presencia de tremores, rigidez muscular, bradicinesia o lentitud en los movimientos e inestabilidad en la postura.(14) Pacientes de la EP pueden presentar cuadros no motores, como la depresión, demencia, dificultad para dormir y dolor, del cual el mecanismo no es entendido aún. Aunque la etiología no está bien definida se habla de dos procesos característicos en los pacientes que la padecen:

- (a) Perdida prematura selectiva de neuronas dopaminérgicas.
- (b) Acumulación de cuerpos de Lewy, compuestos por la acumulación de la α -sinucleína, la cual se convierte en una proteína mal plagada y acumulada.

Sin embargo, no se conoce el orden de los procesos. Los síntomas motores son evidentes, cuando se han perdido del 30% al 70% de neuronas dopaminérgicas (ND), lo cual es observado en la Substancia Nigra estas producen dopamina, un mensajero químico que permite la comunicación entre nervios, células y músculos. Debido a que los síntomas son evidentes en etapas avanzadas de la enfermedad, su diagnóstico de dificulta.

Los signos nombrados previamente en la EP son causados por el daño neuronal, pero además existen procesos moleculares como el estrés oxidativo, la

agregación de la α -sinucleína, disfunción mitocondrial, neuro inflamación, y toxicidad como eventos cruciales en la patogénesis de la EP.(15, 16).

A nivel de estudios producidos en Colombia no se ha determinado una prevalencia en la población. Sin embargo, se conoce que este desorden neurodegenerativo progresivo afecta 110 en 100.000 personas en los Estados Unidos y 1 de cada 100 personas mayores de 60 años. A medida que la población de adultos mayores va creciendo se ve la necesidad de un diagnóstico rápido, oportuno y un tratamiento apropiado para la EP.(17)

Además, otro estudio realizado en Canadá muestra que la enfermedad de Parkinson típicamente se desarrolla entre las edades de 55 y 65 años, ocurren entre 1%-2% en personas sobre los 60 años, aumentándose a 3.5% a la edad de 85-95 años. Cerca de 0.3% de la población padece la enfermedad y la prevalencia es más alta en hombres que en mujeres con una relación de 1.5 a 1.0. Para el 2010 el estimado de la población que padece Parkinson en Canadá alcanzo el valor de 85.200 y para el 2030 se espera el doble (16)

3.1.3 Etiología y componente genético

La mayoría de los casos de la EP son de tipo esporádico (90%) aunque existe un porcentaje de la enfermedad el cual es atribuido a genes a lo cual se le denomina como EP familiar. La evaluación de estos casos da lugar al estudio de la etiología de la patología. (14)

A la fecha se han reportado 11 loci PARK1-11, DJ-1, Parkin, Leucin-rich repeate Kinasa 2 (LRRK2), hidrolasa Ubiquitina carboxiterminal L1 (Uch- L1), α -sinucleína y PINK 1. Las mutaciones en estos genes generan, disfunción mitocondrial (PINK1, DJ-1, Parkin y LRRK2) y malfuncionamiento del sistema ubiquitina proteosoma (Uch-L1, Parkin y α -sinucleína) estos como claves en la patogénesis de la EP. (15)

Los casos de EP familiar son atribuidos al gen ubicado en el cromosoma 4 q21.3-q22 (11Kb) el cual es denominado gen SNAC, responsable de la síntesis de la proteína alfa-sinucleína, este gen comprende siete exones de los cuales cinco corresponden a regiones codificantes (18, 19) La identificación de la mutación A53T en el gen SNAC fue la primera identificada en pacientes con Cuerpos de Lewy. (18)

En 1997 dos loci fueron mapeados, PARK 3 en el cromosoma 2p13 y *PARK 4* ubicado en el cromosoma 4p15. Una mutación en el gen α -syn, también se encontró asociada a la enfermedad, en esta mutación se caracteriza porque las

bases del ADN que forma el triplete para la codificación de un aminoácido esta cambiada, lo que conduce a una formación errónea del aminoácido y así mismo de la proteína que este compone. (19)

La mutación (193M) en la Ubiquitina hidrolasa carboxiterminal L1 (*UCHL1*). *UCHL1* es una enzima específica del sistema nervioso, esta mutación resulta en una pérdida parcial en la capacidad catalítica de la proteasa del tiol lo cual genera agregación proteica. Para 1998 mutaciones del gen PARK 2 fueron identificadas como causas genéticas de la forma autosómica recesiva del Parkinson juvenil.(2)

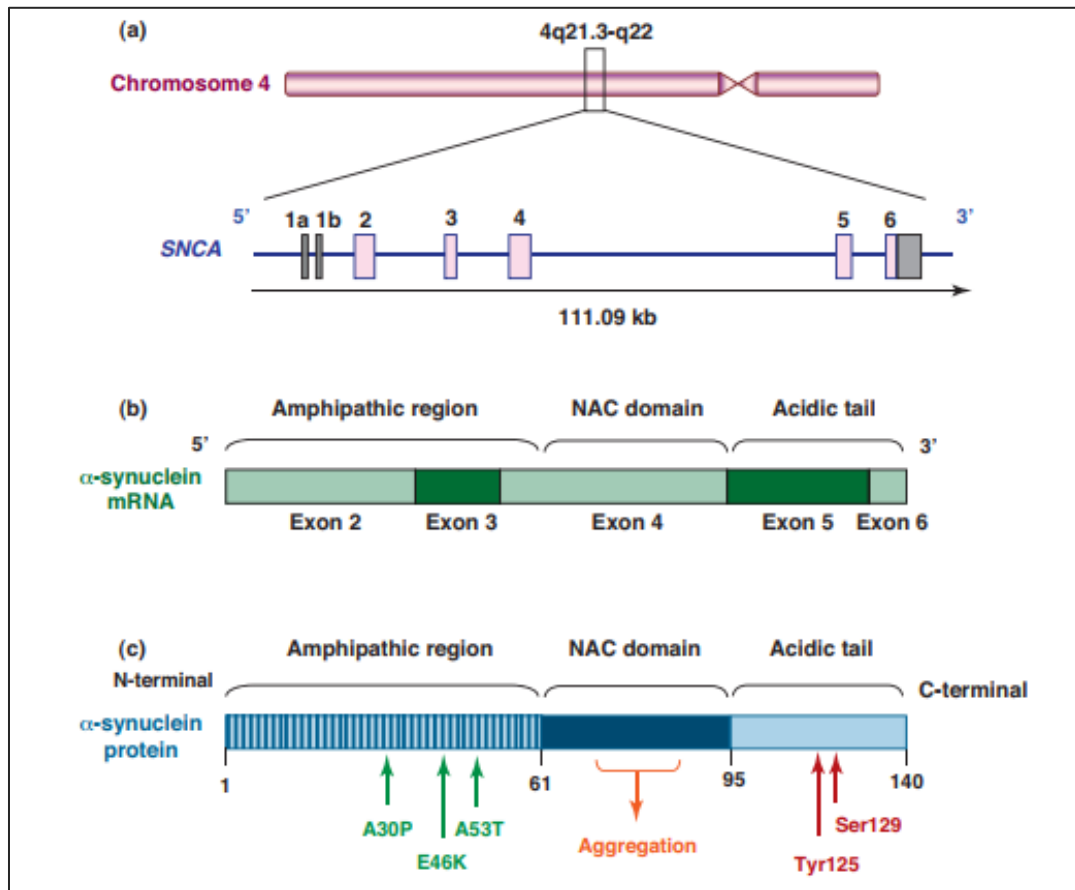


Ilustración 1 Configuración estructural de Alfa-sinucleína.

A) Configuración del cromosoma 4 con la estructura del gen SNCA. B) RNAm del gen SNCA. C) Dominios de la proteína alfa-sinucleína Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223610001359>

3.1.4 Alfa Sinucleína

La α -sinucleína es una proteína de unión a membrana periférica, la cual tiene una tendencia a agregarse formando los cuerpos de Lewy, característica que tienen

los pacientes con la EP. Su expresión ha sido demostrada en cerebros de ratones en donde se encuentra en todo el neocórtex, hipocampo, bulbo olfatorio, tálamo y el cerebelo. Adicionalmente en la periferia puede ser encontrada en el plasma, en el tejido cerebroespinal entre otros. (20, 21)

La α -sinucleína pertenece a un grupo de proteínas: α -sinucleína, beta-sinucleína y gama-sinucleína. α -sinucleína es una pequeña proteína de 140 aminoácidos con tres dominios. Uno N-terminal (aa 1-65), un dominio no amiloide-beta compuesto de placas (NAC) (aa 66-95) y un dominio C-terminal (aa-140). Las mutaciones autosómicas dominantes de la familia del Parkinson y de los síndromes de la EP están ubicadas en el dominio N-terminal de la α -sinucleína, tales como Ala53Thr, Ala30Pro, Glu46Lys y las más recientes identificadas Ala53Thr, Ala30Pro, Glu46Lys.(21, 22)

La configuración nativa de la α -sinucleína *in vitro* carece de una estructura rígida y bien definida en 3D, ya que pertenece a las proteínas naturalmente no plegadas.(22) Acerca de la estructura de esta proteína, se ha demostrado que existe una conformación monomérica o en tetrámero alfa helicoidal.

Sin embargo se piensa que, la conformación monomérica y la otra es el tetrámero α helicoidal plegado de 58 kDa, estudios señalan que la variación de estas formas está basada en el tratamiento previo a la identificación de las proteínas, lo cual genera distintos plegamientos. En contraste, un estudio con estandarización a los procedimientos de tratamiento de las proteínas indica que la forma nativa de la α -sinucleína es un monómero con una estructura helicoidal, donde su agregación es dependiente del tiempo (edad), mientras que la estructura α helicoidal es encontrada solo en la unión de membrana. (21)

En cuanto a su función fisiológica se ve involucrada en el comportamiento, almacenamiento y reciclaje de neurotransmisores. Así como reguladora de ciertas enzimas y aparentemente aumenta número de moléculas transportadoras de dopamina, es liberadora de transmisores y responsable de la comunicación con el complejo SNARE (Factor de acoplamiento de receptores proteicos) actuando como chaperona. La función chaperona de α -sinucleína es demostrada a través de la CSP α (Cysteine string protein α) una chaperona determinante en la salud de la sinapsis donde su daño puede generar degeneración de nervios, discapacidad motora y muerte celular. Un estudio demuestra que al bloquear CSP α dejando α -sinucleína esta es capaz de recuperar el daño y regular los niveles del complejo SNARE en el nervio terminal. (21)

La agregación de α -sinucleína está relacionada con la presencia de las mutaciones nombradas anteriormente, las cuales son encontradas la región N-

terminal. Sin embargo, mutaciones específicas como Glu46Lys HIS50 y Ala53Glu, promueven la formación de agregados insolubles y la producción de oligómeros. En cuanto al dominio NAC, este juega un papel importante en la propagación de α -sinucleína. Por último, el dominio C terminal, es necesario en el mantenimiento de la solubilidad y que es este dominio el cual tiene más tendencia de agregación incluso que la proteína completa. Es así como se puede concluir que cada dominio está involucrado en el procedimiento de agregación de la proteína ya sea promoviendo o inhibiendo su fibrilación oligomerización. (21)

Diversos procesos químicos afectan el proceso de la agregación proteica, por ejemplo la fosforilación es un proceso esencial en la degradación de los agregados presentes en las enfermedades neurodegenerativas. Así como la nitratación de la α -sinucleína que resulta en la formación de monómeros nitrados y dímeros nitrados, los cuales ayudan a la degradación de los mismos. Mientras que el monómero nitrado no es capaz de formar fibras por sí solo, el dímero acelera la agregación proteica. Modificaciones post traducción en α -sinucleína como fosforilación, nitratación, oxidación de la metionina, ubiquitinación y acetilación, entre otros, tienen un efecto en la función y agregación de la proteína. (21)

Estudios demuestran que la fosforilación en Ser-129 afecta directamente a la agregación de α -sinucleína. Lo cual es demostrado en un ensayo in vivo donde la reducción este proceso en la Ser-129 por la acción de una fosfatasa, demuestra la reducción de la agregación proteica lo que indica una relación directa entre la agregación y la fosforilación. Sin embargo, cabe resaltar que no todos los procesos de fosforilación inducen agregación de α -sinucleína, como es el ejemplo de un sitio de fosforilación en la α -sinucleína en Ser-87 la cual juega un papel importante en la mejora de la flexibilidad y que además inhibe la agregación proteica. (15, 21)

Alfa sinucleína es una proteína de propagación propia, normalmente pocos agregados son eliminados por las vías de degradación, sin embargo, si, a través del tiempo la proteína se agrega más allá del límite, esto define la progresión de la EP. Experimentos in vivo e in vitro sugieren que α -sinucleína puede ser difundida de una célula a otra y así mismo de una región a otra, lo cual afecta a la progresión de la enfermedad.

Evidencia científica demuestra que, el daño por estrés oxidativo contribuye significativamente a la pérdida neuronal en la EP.

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de oxidación tóxica y la actividad de antioxidantes lo que conlleva a un daño celular terminando en apoptosis. Uno de los principales reactivos oxidantes son las especies

reactivas de oxígeno (ROS) por sus siglas en inglés, estas especies incluyen el peróxido de hidrógeno y el perinitrato además de radicales libres como el superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH) y el óxido nítrico. Estos son producto normal del consumo de oxígeno por la respiración celular, especialmente en la mitocondria. La producción es controlada por enzimas antioxidantes tales como glutatión, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, pero debido a su inestabilidad en el estado redox en los tejidos pueden dañar componentes como proteínas, membranas lipídicas y ADN a través de la oxidación. Cabe resaltar que ROS tienen una función biológica como macrófagos donde, gracias a su presencia, no permite la colonización por microbios. En procesos de señalización celular, ROS hacen parte del proceso biológico modulando la actividad de las quinasas, fosfatasas y factores de transcripción. Es cuando hay un desbalance en la presencia de ROS lo que lo hace patológico, generando daño en lípidos celulares, proteínas y ácidos nucleídos, llevando a la muerte celular(23, 24)

En la EP la medición ROS se realiza de forma indirecta con la medición de macromoléculas oxidadas, como malondialdehído, hidroperóxidos lipídicos y 4-hidroxinonenal, los cuales son producto de la peroxidación lipídica y están aumentados en la EP. Los cerebros con la EP tienen además niveles elevados de hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) y carbonilos de proteína los cuales son productos de la oxidación del ADN y de las proteínas. Otro marcador para evaluación de estrés oxidativo es el aumento en la actividad de SOD en la *Substancia Nigra*. SOD cataliza la dismutación del superóxido (O_2^-) en oxígeno y peróxido de hidrógeno y esto incrementa como medida de reducción en la producción de ROS. (23)

El aumento de ROS no solo genera daño celular sino la producción de otros productos neurotóxicos, como es el caso de 4-hydroxynonenal que modifica la agregación de α -sinucleína *in vitro* ya que lleva a la formación de fibras, las cuales son neurotóxicas en las neuronas dopaminérgicas. Adicionalmente, la agregación de α -sinucleína puede ser inducida en presencia de peróxido de hidrógeno, sugiriendo que el nivel de ROS no solamente causa daño neuronal, sino que también indirectamente contribuye a la depleción de ND por muerte celular directa o por la agregación de α -sinucleína, lo cual exacerba la progresión en la EP.(23)

3.1 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans es un nematodo de vida libre el cual es encontrado alrededor del mundo y usado en gran variedad de estudios de procesos biológicos como el de apoptosis, señalización celular, ciclo celular, polaridad celular, metabolismo, edad y determinación del género.



Ilustración 2 Nematodo N2 Adulto.

Observación en microscopio, con objetivo de 40X. Tomada por Autora.

Ha sido clasificado de la siguiente forma:

Super reino	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Nematoa
Clase	Chromadorea
Orden	Rhabditidae
Super familia	Rhabditoidea
Familia	Rhabditidae
Subfamilia	Peloderinae
Genero	<i>Caenorhabditis</i>

Tabla 1 Taxonomía de *Caenorhabditis elegans*.

Tomada de NCBI taxonomy browser Disponible en https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6239&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle

Desde el descubrimiento de *C. elegans* este ha sido usado para el entendimiento de diferentes mecanismos moleculares en diferentes animales, fue clave para el entendimiento de genes de regulación de la apoptosis, de rutas de señalización Ras y Notch, función sináptica, la ruta de encuentro de axones, la longevidad y el desarrollo en genes heterogéneos en función del tiempo. El estudio de la heterogeneidad de genes reguladores del RNA y microRNA del producto del gen *lin-4*. (25)

Siendo un pequeño organismo de 1mm de longitud, este tiene un sistema completo para el estudio de procesos biológicos en organismos eucariotas por tamaño, alta cantidad en producción de camada, fácil cultivo, bajos costos de mantenimiento, transparencia, número celular invariante y desarrollo de los mismos y la habilidad de reducir la actividad génica por el uso de RNAi como alimento. (25)

Este nematodo tiene una figura cilíndrica sin segmentos, puntiaguda en cada extremo. Anatómicamente, este cuenta con dos tubos uno interno y uno externo separados por un espacio pseudocélico. El tubo externo consta de la cutícula, hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos mientras que el tubo interno está compuesto por la faringe, el intestino y para los nematodos adultos su sistema gonadal desarrollado. Todos estos tejidos se mantienen en una presión hidrostática interna regulada por un sistema de osmolaridad. (26)

3.1.2 Sistema digestivo de *C. elegans*

El tracto digestivo de *C. elegans* está conformado por tres tubos epiteliales conectados, la faringe, una válvula y el intestino. Por la naturaleza del nematodo estos están compuestos por pocas células, la faringe está compuesta por 80 células, la válvula por 60 y el intestino por 20.(27).

El proceso para la ingestión de alimento en *C. elegans* depende de la acción de la faringe, un conector neuromuscular que junta la boca con el intestino. El musculo de la faringe captura el alimento del ambiente y lo transporta. Este proceso consta de dos partes, la de succión y la de la perístasis del itsmo, porción del sistema digestivo, con la succión se toma el líquido del ambiente del rededor, para después soltar el líquido y atrapar las partículas. Estos impulsos son controlados por dos neuronas conectadas a la faringe.(28)

Dentro del proceso de alimentación, *C. elegans* debe tener la capacidad de detectar bacterias, su fuente de alimento, ya sea en el área donde está o justo a su alrededor. Hay varias formas en las cuales puede detectar alimento, por medio de estimulación mecánica, olfato, gusto, medición de oxígeno y temperatura, esto a través de neuronas sensoriales las cuales envían mensajes ante los estímulos mencionados anteriormente. El sistema nervioso contiene 20 neuronas de diferentes tipos (8 pares simétricos bilateralmente y 6 impares). Tres de estas 14 son particularmente importantes para la alimentación. Las neuronas faríngeas contienen tanto neurolépticos como neurotransmisores. Entre los más importantes están la acetilcolina, glutamato y la serotonina.

Cuando el nematodo enfrenta un decrecimiento en la disponibilidad de comida la nictación o proceso en el cual el nematodo procede a ponerse en posición vertical apoyándose en su cola, como método de supervivencia practica esto con el fin de engancharse y usar insectos como medio de transporte, para así encontrar un lugar con la disposición de alimento. (29)

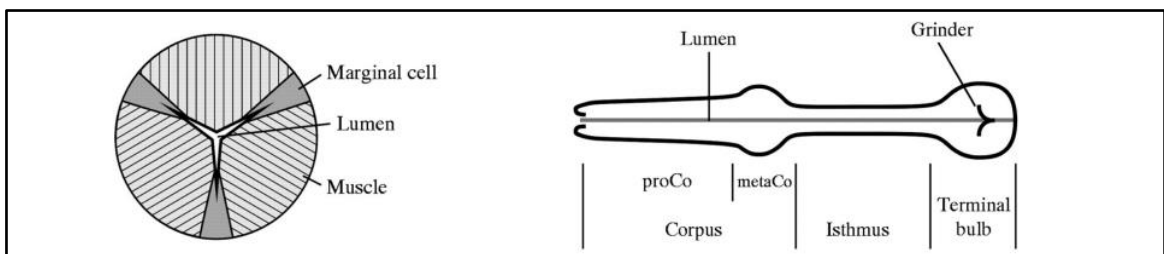


Ilustración 3 Anatomía de la faringe de *C. elegans*. A. Corte transversal B. Corte sagital del cuerpo del nematodo. Disponible en: *WORM BOOK*.

El lumen de la faringe está conectado con el del intestino, el alimento pasa por medio de la válvula intestinal faríngea para continuar su camino hacia el intestino. El intestino es un tejido somático conformado por 20 células que forma un tubo el cual tiene un lumen central. La superficie apical del tubo está llena de numerosas microvellosidades que apoyan la absorción de nutrientes, como fin del proceso el contenido del intestino es expulsado por una válvula rectal que conecta el intestino al recto y ano.(26)

3.1.3 Sistema nervioso

El sistema nervioso de *C. elegans* es el órgano más complejo de todo el organismo, casi la tercera parte de las células en el cuerpo (302 de 959 en adultos hermafroditas) son neuronas. Veinte de las neuronas están localizadas en la

faringe, el cual tiene su propio sistema nervioso. Las 282 neuronas restantes están localizadas a lo largo del cordón ventral en la cola, en varios ganglios de la cabeza y en el tracto longitudinal del axón principal, la mayoría de las neuronas se desarrollan en la embriogénesis, pero 80 neuronas, generalmente las motoras, se desarrollan postembrionalmente.

La mayoría de las neuronas están localizadas en la cabeza donde se organizan en varios ganglios los cuales rodean la faringe formando así el cerebro del nematodo. 68 Neuronas son sensoriales las cuales detectan varios químicos en el ambiente, reaccionan ante estimulación mecánica y ante la temperatura, estas tienen dendritas en la punta de la nariz la cual está altamente inervada. Los axones sensoriales se unen a un anillo de nervios donde hacen conexiones sinápticas con las interneuronas. En respuesta al estímulo algunas de estas neuronas envían axones en el cordón ventral el cual recorre todo el nematodo. El impulso enviado por las interneuronas del circuito motor se conecta con las neuronas motoras las cuales en respuesta reaccionan con las células musculares permitiendo que este responda cambiando su patrón de movimiento. (30)

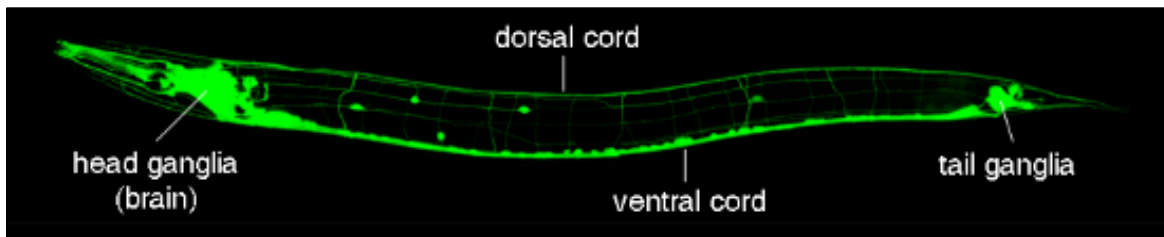


Ilustración 4 Sistema nervioso de *C. elegans* marcado con (GFP) Proteína verde fluorescente. Disponible en http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Ce_nervous_system.htm

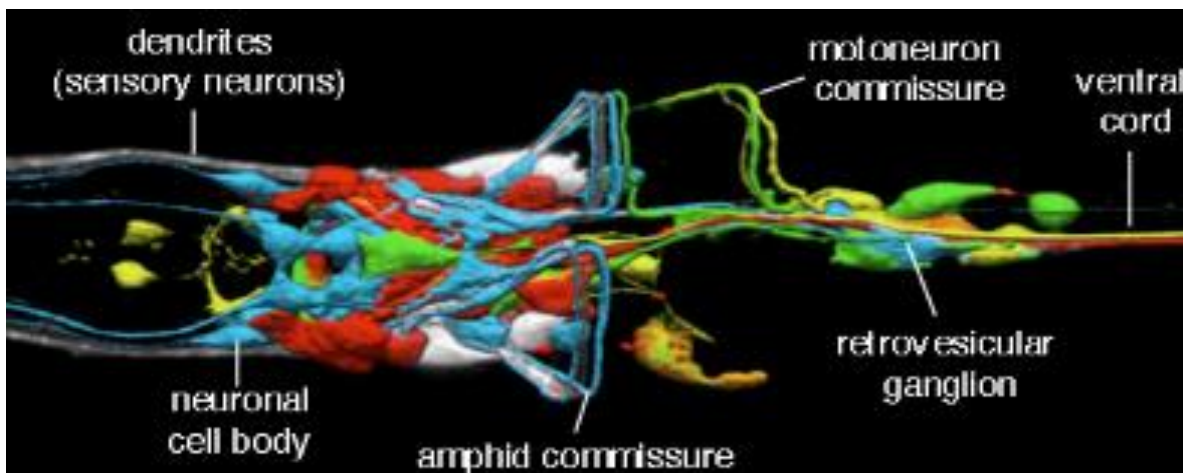


Ilustración 5 Región de la cabeza de *C elegans* con diferentes marcadas en diferentes colores. Disponible en http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Ce_nervous_system.htm

3.1.4 Sistema muscular

El sistema muscular de *C elegans* tiene musculo estriado y no estriado, los músculos no estrados incluyen 20 músculos faríngeos, 2 del tracto gastrointestinal, un musculo depresor anal, un esfínter anal, 8 válvulas musculares, 8 músculos uterinos y 10 células gonadales. Estos músculos hacen el equivalente al esqueleto de un vertebrado.

El sarcomero es la unidad funcional del musculo, la cual le da su composición, función y estructura. La pared muscular es la que confiere la capacidad de movimiento senoidal para superficies semisólidas o el movimiento en *C* para superficies liquidas. Igual que en los invertebrados cada sarcomero está compuesto por miosina que contiene filamentos asociados con la línea M Y actina que contiene filamentos asociados con la línea Z al contraer los filamentos de actina por la miosina esto genera una fuerza que debe ser traducida por el musculo en movimiento. (31)

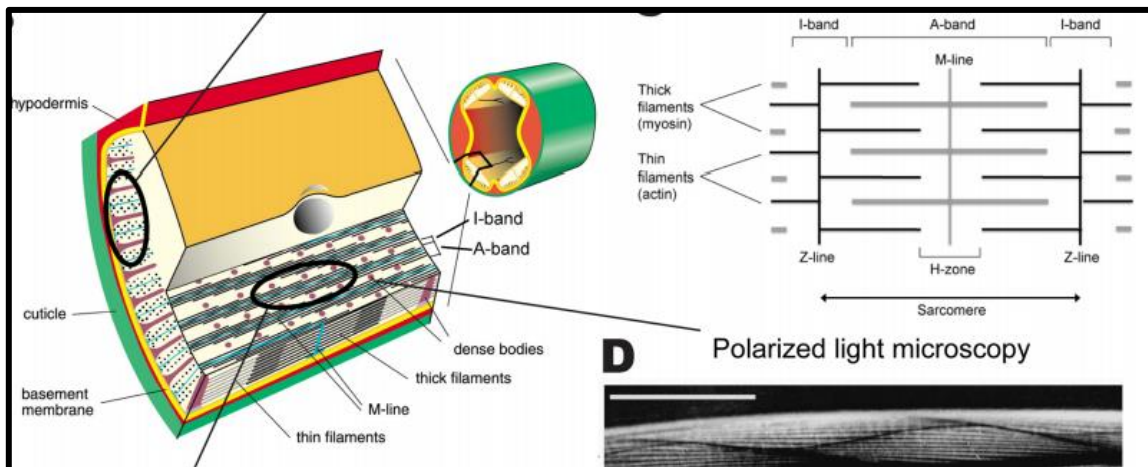


Ilustración 6 Observación de estructura muscular de *C elegans* con su estructura interna. Disponible en http://www.wormbook.org/chapters/www_bodywallmuscle/bodywallmuscle.pdf

3.1.5 Sistema reproductor

La cepa salvaje de *C elegans* tiene dos formas sexuales, los hermafroditas y la forma masculina. Las gónadas de los hermafroditas forman una ovostesis que primero produce espermatozoides haploides y es guardado en la espermatoteca y en el estadio L4 y luego cerca de la adultez la línea germinal cambia y produce una gran cantidad de oocitos. Los hermafroditas están en capacidad de producir 300 progenies que son fertilizadas con el espermatozoides guardado. Cuando son fertilizadas por un macho son capaces de producir ~1000 de descendencia, lo que indica que la auto fertilización es un factor limitante de reproducción por ello al momento del pape se recomienda hacer pases de las dos poblaciones.

Generalmente ambos sexos son diploides con cinco cromosomas y el cromosoma sexual X. Para la determinación de sexo se define que los hermafroditas tienen un doble cromosoma X y los machos uno solo. La mayoría de la descendencia producida por una auto fertilización son hermafroditas, tan solo el 0.1-0.2% de la descendencia son machos debido a la rara disyunción meiotica del cromosoma X.(32)

La diferencia puede ser observada por la anatomía de en el estadio larvario L4.

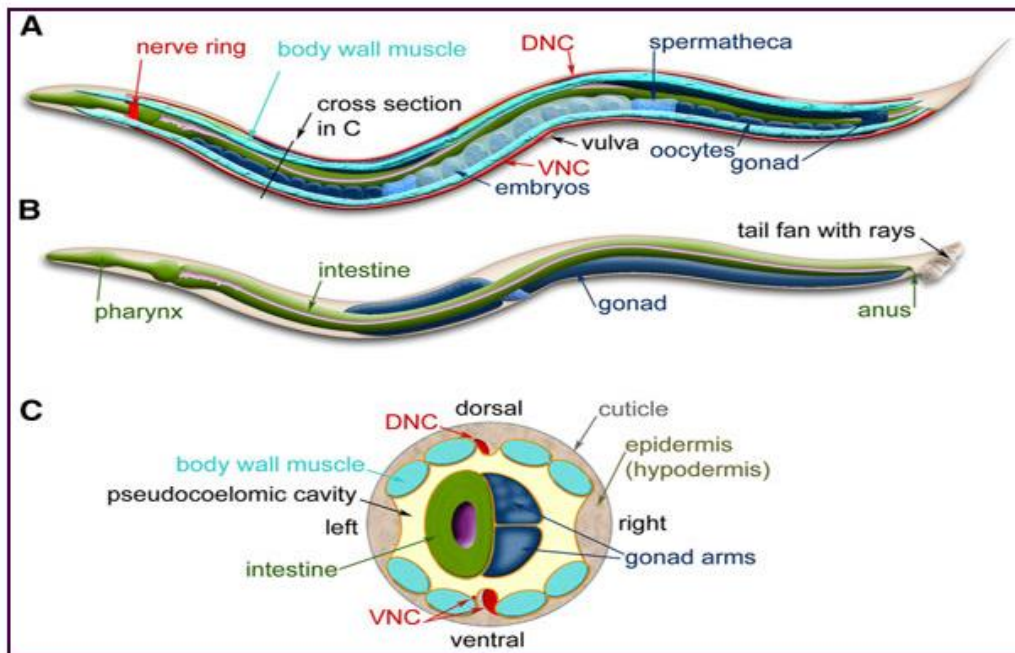


Ilustración 7 Observación de las diferencias de género del nematodo *C elegans*. A. Un hermafrodita en estadio L4. B. Un macho en vista lateral. C. Corte transversal de la región anterior del *C elegans* hermafrodita. Tomado de *Worm book*. Disponible en http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html#sec2.3

3.1.6 Ciclo de vida

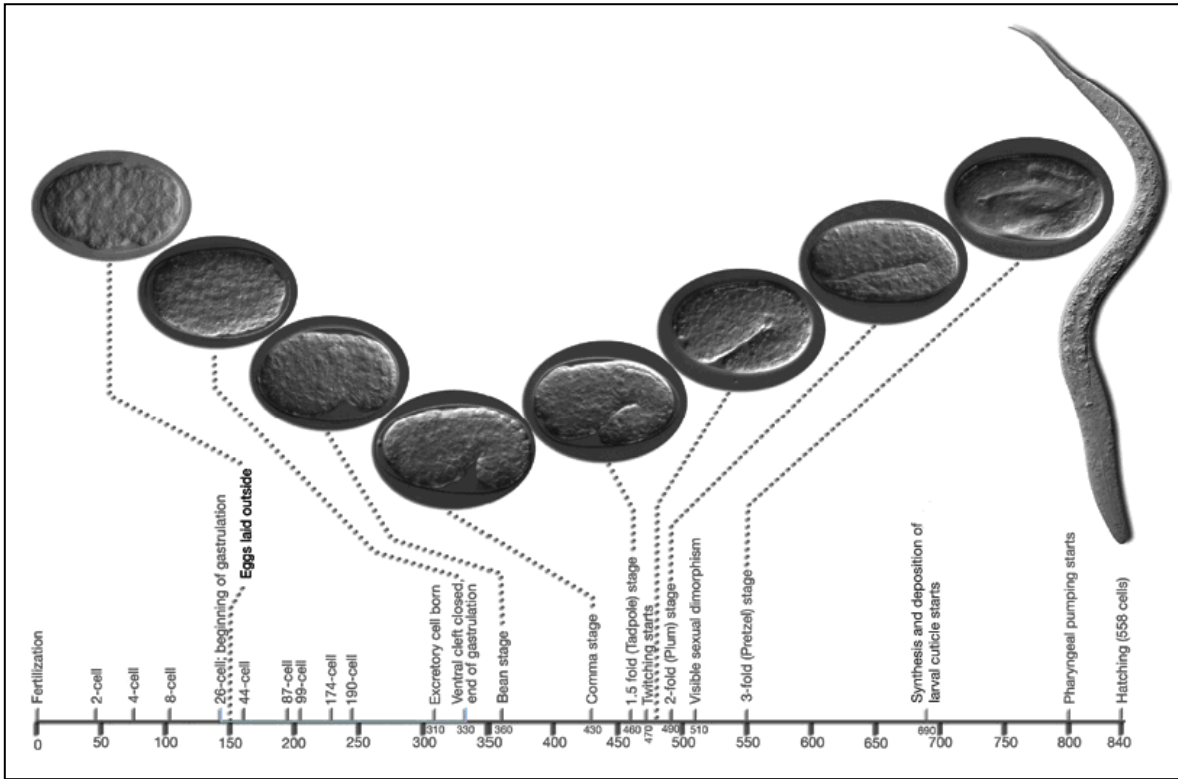


Ilustración 8 Esquema de embriogenias de *C. elegans*

Tomado de Transgenic nematodes as a model for Parkinson's disease. (Doctor of Philosophy Ph.D. thesis), University of Nottingham, Nottingham, UK

Disponble en http://eprints.nottingham.ac.uk/12108/1/PhD_Thesis.pdf

La embriogénesis tiene dos fases importantes la proliferación y la organogénesis. En la proliferación un cigoto da lugar a 558 células indiferenciadas. Este proceso se divide en dos fases, la primera fase tiene un rango de tiempo de 0 a 150 minutos desde el momento en que el cigoto se forma hasta la producción de células madre, este proceso tiene lugar en el útero de la madre, La segunda fase es de 150 minutos a 350 donde la división celular y gastrulación o formación de las capas del embrión, se completa, cuando se completa el proceso de formación de 30 células el embrión es expulsado por la vulva. El desarrollo empieza aproximadamente 5.5 horas después de la fertilización y se completa aproximadamente en 14 horas post fertilización. Durante todo el proceso de organogénesis el nematodo se enrolla longitudinalmente y a medida del crecimiento se enrolla en sí mismo, mientras que el embrión va diferenciando tejidos y órganos. (24)

A nivel celular, una vez la fertilización está completa, uno de los eventos más importantes es la división celular la cual da lugar al axis anterior y posterior. Posterior a cinco divisiones celulares se forman seis células creadoras de tejidos específicos denominadas AB, MS, E, C, D y P4. Las células producto de la división de AB darán lugar a la faringe y las neuronas, MS generaran el tejido muscular, neuronas y la faringe, las células derivadas de E crearan e tejido intestinal, las células procedentes de C formaran músculos, neuronas y tejido de la piel, D dará lugar a musculo de la pared y finalmente las células P4 generaran el tejido germinal. (33)

Todo el proceso embriogénesis toma aproximadamente 16 horas a 20°C para la cepa salvaje, sin embargo, cabe resaltar que se presentan diferencias en las cepas mutantes. Una cascara impermeable se va formando antes de la fertilización, permitiendo así el desarrollo del embrión aparte de la madre. Sin embargo, los embriones son usualmente retenidos por la madre hasta el estado 24 donde son puestos. El embrión hermafrodita eclosiona con 558 núcleos y esto es el llamado estadio L1.

Aproximadamente 12 horas después la larva muda a L4, posteriormente en la etapa de la adultez empieza la producción de descendencia en un periodo de 2-3 días hasta que sea usado todo el esperma del proceso de auto fecundación. Adicionalmente de las hembras que son apareadas con los machos. Posterior a la época reproductiva, los hermafroditas pueden vivir varias semanas antes de la muerte.(32)

Un estado en el que las larvas pueden entrar debido a la falta de comida o la sobrepoblación en las placas se llama el estado Dauer como un estado alternativo del estadio L3. En este periodo de tiempo la larva crea una cutícula sobre el cuerpo y boca que lo cubre previniéndolo de químicos y restos usados como alimento. Por lo tanto, este detiene su desarrollo. *C elegans* tiene la capacidad de quedarse en este estadio por meses hasta el momento en el que el ambiente sea optimo continuando su desarrollo en una larva con pequeñas diferencias que la larva L4. (32)

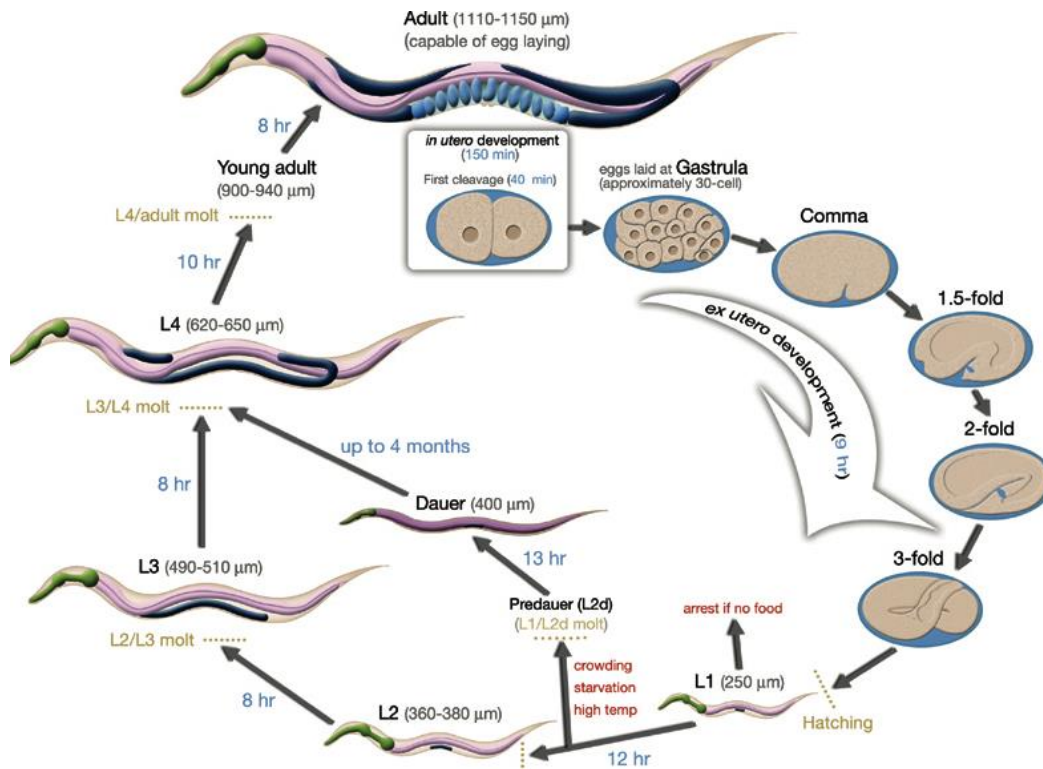


Ilustración 9 Ciclo de Vida *C. elegans*

Tomado de Worm book. Disponible en <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>

3.2 *Caenorhabditis elegans* y la enfermedad de Parkinson

A través del tiempo, la evaluación de la etiología de la EP como los tratamientos terapéuticos han sido evaluados en diferentes modelos biológicos y aunque modelos mamíferos han ayudado al entendimiento de la patología y han permitido avances terapéuticos para la misma, estos no mimetizan puntos biológicos en la EP, como la degeneración gradual en las neuronas, anomalías morfológicas y alteraciones motoras. Además, las técnicas de manejo genético requieren de un complejo diseño experimental de alto costo.

C. elegans tiene 302 neuronas de las cuales 8 son dopaminérgicas (ADEL, ADER, CEPDL, DEPDR, CEPVL, CEPVR, PDEL Y PDER) y están implicados con la enfermedad de Parkinson en humanos. Además, de cuatro receptores dopaminérgicos en *C. elegans* (DOP-1, DOP2, DOP3 Y DOP4) encontrando que dos de ellos tienen homología con los mamíferos (D1- D2). (34)

C. elegans es organismo de entendimiento biológico de la patología al conservar vías celulares y mecanismos tanto con mamíferos como con humanos. Estas vías

celulares son manipuladas usando ARNi (RNA de interferencia) a través de la alimentación con una bacteria que contiene un gen específico. El insertar RNA en células puede ser usado en sistemas biológicos para interferir con la función de genes endógenos. La transcripción de la hebra insertada en el sistema se hace a través de un mecanismo antisentido que depende de la hibridación entre el RNA insertado y el RNA endógeno. Estudios afirman que la hebra doble de RNA es más efectiva al ser insertada, al generar interferencia potente y específica. (35)

Previos estudios han determinado un grupo de mutaciones genéticas como causa de la enfermedad de Parkinson, las cuales alteran funciones como el adecuado nivel de expresión y el patrón de las proteínas PARK. Estas apuntan a las dos marcas distintivas patológicas de la EP: La formación cuerpos de Lewy por la acumulación de proteínas en el cerebro de los pacientes y la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (ND) en la Substantia Nigra pars compacta. Aunque solo del 5 al 10% de los casos de Parkinson están asociados con el factor genético, están los factores ambientales de susceptibilidad, solos o acumulativos que pueden contribuir a esta enfermedad idiopática (36)

En la creación de la cepa mutante se realizó un rastreo de 80 genes involucrados en la enfermedad de Parkinson, donde se encontraron dos genes ortólogos del gen *Gprk2* presentes en *C. elegans* el gen *grk1* y el *grk2* los cuales al ser silenciados provocan una reducción en los agregados proteicos lo que demuestra su importancia en el proceso patológico de la agregación proteica. Además, se realizó la identificación de dos reguladores moleculares de esperanza de vida homólogos del gen Sirtuin1, el *lagr1* y *sir2.1* donde la delación de estos genera un aumento numérico del 35% de agregación proteica evaluada en nematodos de 9 días de vida. (5)

Para la evaluación de la agregación proteica, Van Ham construyó la cepa NL5901 con el cual es posible monitorear, en *C. elegans* la formación de las inclusiones de α -sinucleína, a través de la utilización de RNA de interferencia. Para ello el gen de la α -sinucleína fue fusionado con la proteína amarilla fluorescente (YFP) que permitió evidenciar la expresión, todo el constructo bajo el control del promotor *unc-54* el cual dirige la expresión a la pared muscular del nematodo. Se prefirió hacer la expresión de la proteína en la pared muscular y no en las neuronas debido a que la expresión dirigida por *unc-54* es más fuerte en la pared muscular, los músculos al ser largos permiten una mejor visualización. (Ilustración 10) Adicionalmente, el ingreso de RNAi por vía alimenticia, funciona con más eficiencia en las paredes musculares.(5)

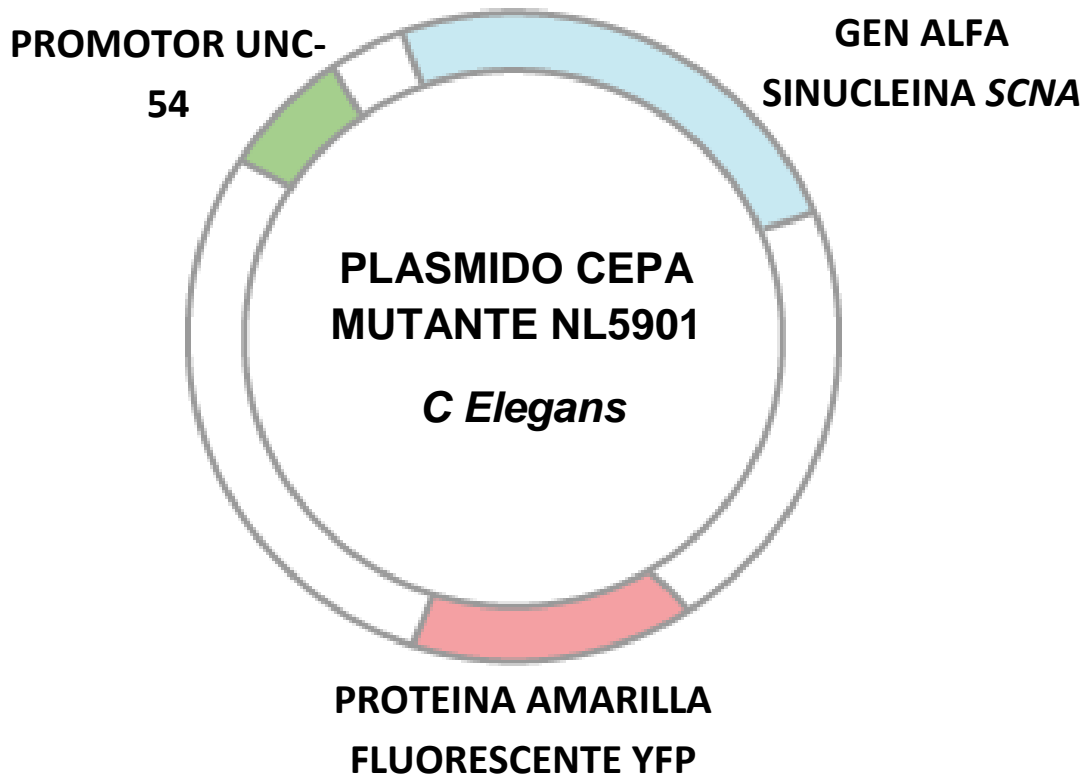


Ilustración 10 Diseño de plásmido insertado en la cepa **NL5901** para la expresión de alfa sinucleína, unida con YFP para su visualización. Grafica adaptada de <https://www.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>



Ilustración 11 Observación por fluorescencia de larva L2 de la cepa **NL5901** de *C elegans* NL5901. Tomada por Autor.

3.3 Estrés Oxidativo

La formación de especies reactivas de oxígeno produce daños en moléculas como el ADN, lípidos y proteínas, lo que contribuye al proceso general de envejecimiento, es por esto que el estrés oxidativo se define como una causa de la aparición en la EP. El proceso patológico se demostró mediante la observación post-mortem de cerebros de pacientes con EP lo que sugirió al estrés oxidativo y nitroso como un factor integral el proceso neurodegenerativo de las neuronas dopaminérgicas de la Substancia Nigra. Adicionalmente, uno de los primeros cambios bioquímicos de la EP, es la disminución del Glutathione, un antioxidante natural (GSH), lo que reafirma la relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la aparición de la EP. (37)

En la EP la medición ROS se realiza de forma indirecta con la medición de macromoléculas oxidadas, como malondialdehído, hidroperóxidos lipídicos y 4-hidroxinonenal, los cuales son producto de la peroxidación lipídica y están aumentados en la EP. Los cerebros con la EP tienen además niveles elevados de hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) y carbonilos de proteína los cuales son productos de la oxidación del ADN y de las proteínas. Otro marcador para evaluación de estrés oxidativo es el aumento en la actividad de SOD en la *Substancia Nigra*. SOD cataliza la dismutación del superóxido (O_2^-) en oxígeno y peróxido de hidrógeno y esto incrementa como medida de reducción en la producción de ROS. (23)

El aumento de ROS no solo genera daño celular sino la producción de otros productos neurotóxicos, como es el caso de 4-hidroxinonenal que modifica la agregación de α -sinucleína *in vitro* ya que lleva a la formación de fibras, las cuales son neurotóxicas en las neuronas dopaminérgicas. Adicionalmente la agregación de α -sinucleína puede ser inducida en presencia de peróxido de hidrógeno, sugiriendo que el nivel de ROS no solamente causa daño neuronal, sino que también indirectamente contribuye a la depleción de neuronas dopaminérgicas por muerte celular directa o por la agregación de α -sinucleína, lo cual exacerba la progresión en la EP.(23)

3.4 Cúrcuma

Cúrcuma y su principio activo cúrcumina, extraídos de la planta *Curcuma Longa*, reconocido como una importante especia a nivel culinario y como suplemento en

la India, China y en el Sudeste Asiático. Esta especie de color naranja, es un derivado de la raíz de la planta *Cúrcuma Longa*, la cual es miembro de la familia *Zingiberaceae*. En la medicina Ayurveda, la cúrcuma es usada por su alto espectro en actividades farmacológicas, como tratamiento para infecciones comunes en los ojos, quemaduras, acné, apósito para heridas, esguinces e inflamación. En la medicina tradicional la cúrcuma es usada por mejorar la condición del sistema inmune y como cura de enfermedades respiratorias como el asma y las alergias. Adicionalmente en diabetes, tos sinusitis, gripa, reumatismo, enfermedades hepáticas y es reconocido mundialmente como un polifenol con características inflamatorias. Los avances de la medicina moderna han permitido ver propiedades de la cúrcuma como antioxidante, anti-mutagenico, anti-cancerígeno, antibiótico, anti isquémico. (15)

Las propiedades descritas de la cúrcuma son atribuidas a la regulación de factores de transcripción, factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, proteínasas y otras enzimas. (38) (Ilustración 12). El componente activo de la cúrcuma es la curcumina el cual corresponde de 2-5% del compuesto, (38) es conocido como diferuloylmetano ($C_{21}H_{20}O_6$) es una partícula de bajo peso molecular (368.37 gr/mol) un compuesto poli fenólico con una temperatura de fusión de 183°C. La nomenclatura IUPAC de la curcumina es 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxy phenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (1E-6E), la estructura tiene dos anillos arilos fenolicos ortho-methoxy OH- que están unidos simétricamente por una cadena de enlaces beta, la cadena de unión permite el paso de átomos de hidrógenos intermoleculares, los cuales dan lugar a estructuras tautomericas keto y enol, las cuales pueden estar en formas *cis* y *trans*, la concentración de las mismas depende de la temperatura, polaridad, del solvente, pH y la sustitución de los anillos arilos. (Ilustración 11).

La cantidad de formas keto y enol juegan un papel crucial en la actividad antioxidante de la curcumina. En condiciones acidas y neutras pH 3-7 los componentes que más se encuentran en la curcumina son bis- keto donde la curcumina actúa como un donante de protones. Sin embargo, en situaciones acidas pH > 8 donde la forma enol es la dominante, la curcumina actúa como un donante de electrones, este responsable de la actividad de la curcumina como eliminador de radicales libres. (15)

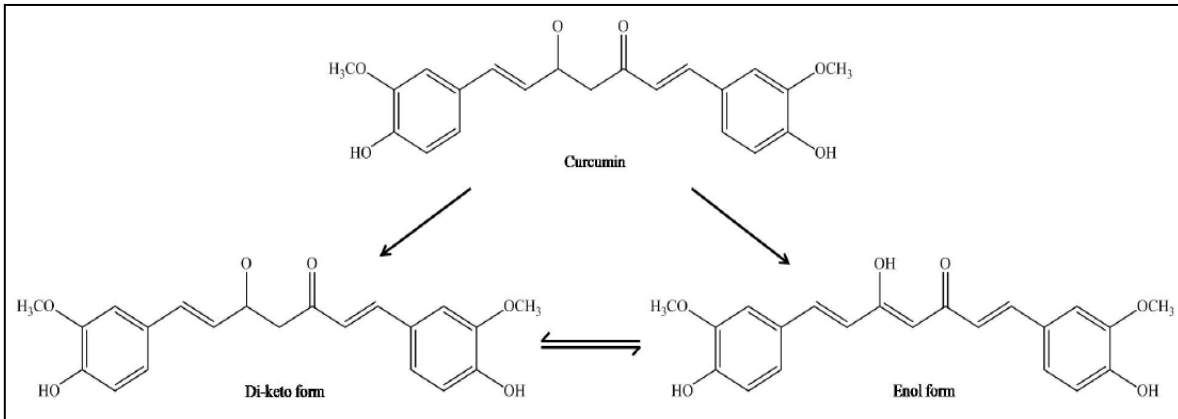


Ilustración 12 Estructura química de la curcumina

Tomado de Curcumin and its Derivatives: Their Application in neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. Disponible en <https://www.springer.com/us/book/9780387464008>

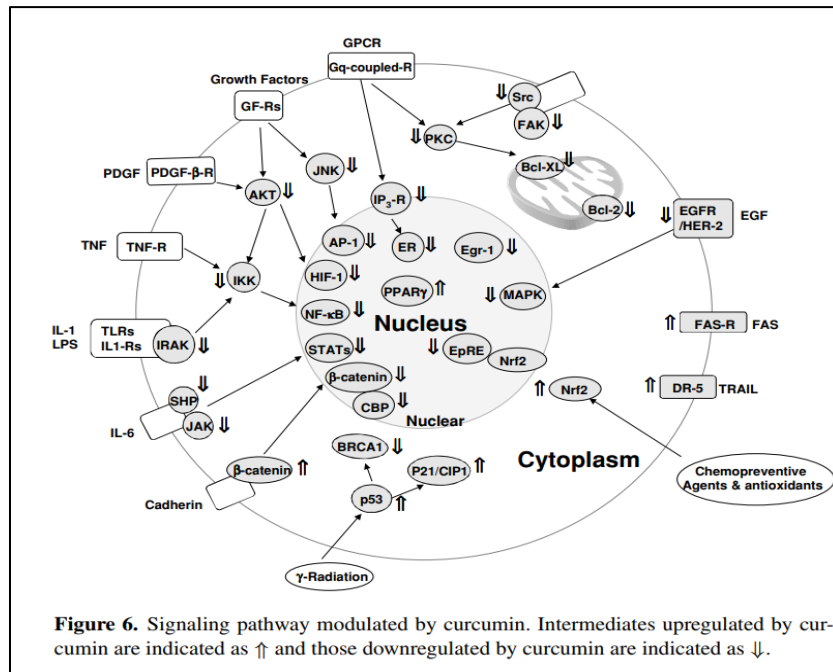


Ilustración 13 Vías de señalización reguladas por la curcumina.

Tomado de: The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Disponible en: <https://www.springer.com/us/book/9780387464008>

Debido a todas las características farmacológicas atribuidas a la cúrcuma, la posibilidad como un principio activo para el tratamiento y la prevención de enfermedades como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Parkinson, tumores cerebrales, esclerosis múltiple, epilepsia, daño cerebral,

neurodegeneración asociada a la edad, esquizofrenia, encefalopatía espongiiforme, dolor neuropático y depresión ha sido evaluada a través de varios estudios en los cuales se demuestra su actividad protectora por distintas vías de acción. (15, 39)

La relación entre los efectos de la cúrcuma en las enfermedades neurodegenerativas como la EP, se evidencia a través de procesos oxidativos e inflamatorios. Se han identificado defectos mitocondriales de transporte de electrones en el complejo I y el aumento en la producción de radicales libres en cerebros de pacientes con EP y en tejidos periféricos, este aumento genera el daño por estrés oxidativo a neuronas dopaminérgicas. Este proceso se ha reproducido en modelos biológicos en los cuales la propiedad antioxidante de la cúrcuma muestra una reducción los radicales libres. (38)

Dentro de las teorías de la etiología de la EP, el estrés oxidativo forma parte importante tanto en la causa como en la progresión de la enfermedad. El cerebro es el órgano más vulnerable de al daño por estrés oxidativo, ya que es el responsable del 20% del consumo de oxígeno aun cuando solo es el 2% del peso del cuerpo humano. En presencia de abundantes ácidos grasos insaturados y los iones metálicos de transición redox activos también proporcionan daño oxidativo al cerebro. El estrés oxidativo y la generación de radicales procesos que ocurren en un microambiente altamente oxidativo alrededor de las neuronas y las células gliales las cuales están asociadas a enfermedades relacionadas con la edad y daño cerebral. (15, 23)

4 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio y población

Estudio experimental de tipo factorial.

Población: Nematodos de vida libre del genero *C elegans*.

Muestra: Cepa silvestre del nematodo *C. elegans* N2 y cepa mutante para la enfermedad de Parkinson NL5901.

4.2 Hipótesis

La cúrcuma tiene un efecto en la reducción de agregados proteicos y características fenotípicas, con una alta capacidad de reducción del estrés oxidativo en la cepa mutante NL5901 del modelo *C elegans* correspondiente a la enfermedad de Parkinson.

Variables dependientes: Mantenimiento y viabilidad de las cepas. Absorción del tratamiento.

Variable independiente: tratamiento a diferentes concentraciones de Cúrcuma 1.5 mg/ml 1 mg/ml y 0.5 mg/ml.

Indicadores: La efectividad del tratamiento es determinada por la medición de características fenotípicas de las dos cepas, siendo N2 y NL5901 sin tratamiento las cepas control.

4.3 Procedimientos y técnicas

Todas las técnicas serán realizadas por triplicado y son tomadas de la bibliografía y adecuadas a la práctica diaria.

4.3.2 Preparación del NGM y condiciones de cultivo

Para la preparación de 500 ml de medio

Se adicionó en un Erlenmeyer de 500 mL, 200 mL de agua destilada al cual fue agregado 1,5 g de NaCl en constante agitación y calor. Posteriormente, fueron agregados 8,5 g de agar y 1,25 g de peptona. Se completó con 300 mL de agua destilada. Se procedió a autoclavar por 50 minutos. Después del proceso de autoclavado el Erlenmeyer fue sumergido en una tina de agua destilada fría. Se dejó en reposo hasta que se encontraba tibio entre 40-50°C, con el fin de poder

hacer el enriquecimiento del medio con la solución 0,5 mL de CaCl₂ 1M, 0,5mL de colesterol en etanol, 0,5 mL de MgSO₄ 1M y 12,5 mL de Buffer KPO₄ 1M. (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄ en 1L de H₂O), el enriquecimiento de los medios se realizó por medio de un filtro y finalmente fue mezclado el resultado final muy bien y servido en cajas de Petri con relación 2/3.

Para la evaluación de contaminación en las cajas obtenidas, estas fueron dejadas de 2 a 3 días antes de ser usadas. Para la siembra de nematodos, se dejaba un césped de *E coli* OP50 y se procedía a realizar pases usando un Pick de aluminio.(40)

La preparación de los medios con la solución de tratamiento se realizó con la técnica de difusión de agar. En el transcurso de la práctica se pudo observar que para la consistencia optima del agar, debían ser agregados 2 Mg de Agar bacteriológico por cada 5 ml de la solución de tratamiento. Este procedimiento fue estandarizado para las tres concentraciones.

4.3.3 Preparación de solución de la cúrcuma

Las soluciones obtenidas fueron producto de la combinación de cúrcuma y solución salina como lo recomienda estudios (15, 41). Las concentraciones preparadas fueron de 0.5mg/mL 1.0mg/mL y 1.5 mg/mL. El cálculo matemático se realizó partiendo del volumen total requerido, calculando así, los valores que eran necesarios para la preparación de cada concentración con la fórmula de $C_1.V_1=C_2.V_2$.

Las mediciones fueron realizadas con pesa electrónica.

4.3.4 Sincronización por medio del tratamiento con hipoclorito.

Tratándose de una enfermedad neurodegenerativa, la evaluación de las características a través del tiempo tiene una gran importancia. Es por eso que los nematodos fueron sometidos a una sincronización por medio del método de blanqueamiento el cual se basa en el principio de sensibilidad de las larvas al hipoclorito a 5% y la resistencia de los huevos al mismo, permitiendo la eliminación de nematodos de todos los estadios, dejando solo los huevos.

Se realizaron lavados y raspados de las cajas base de sincronización con Buffer M9 para asegurar la estabilidad de los nematodos y huevos, traspasando el resultado a un tubo falcón el cual fue centrifugado a 2500 rpm por 3 minutos, repitiendo esto 2 veces más y eliminando el sobrenadante entre cada centrifugación. Fueron agregados 2 ml de la solución de blanqueamiento con una

agitación en vortex de entre 2 a 3 minutos hasta completar diez, corroborando entre cada procedimiento la ausencia de larvas. El resultado fue centrifugado a 3000rpm por 5 minutos, lavando de dos a tres veces hasta que las larvas no sean observadas. El sobrenadante fue descartado y se adicionaron 2 ml de buffer M9 para detener la reacción ocasionada, y finalmente el resultado del procedimiento fue centrifugado a 2500 rpm por 3 minutos, para descartar el sobrenadante.

Posterior al tratamiento con hipoclorito se procedió a la incubación de los huevos sin comida una noche con el fin de prevenir que los huevos de un estadio larvario más avanzado eclosionaran y finalmente al siguiente día transfiriéndolo a una caja nueva con alimento, permitiendo su desarrollo normal.(40)

4.3.5 Concentración Mínima Inhibitoria

Para la evaluación de la sensibilidad de *E coli* se realizó una siembra por el método de rejilla en medio de cultivo Muller Hinton con concentración del microorganismo a una escala 0,5 MacFarland. Como sensidiscos fueron usados discos de 6 mm de papel filtro, impregnados de cúrcuma a diferentes concentraciones (1.5mg/mL 1.0 mg/mL 0.5 mg/mL), La incubación de estas cajas fue a 37°C por 72 horas y se evaluó la aparición de un halo de inhibición a las 72 horas.(42)

Para *C elegans* la cúrcuma fue suministrada como suplemento dietario al NGM en cual el desarrollo fue evaluado por medio de la longevidad del nematodo identificando así la concentración óptima para los dos microorganismos.

4.3.6 Fenotipificación de las cepas de *C. elegans* NL5901y N2

4.3.6.1 Ensayo de Locomoción

La tasa de locomoción fue evaluada por la medición del movimiento del nematodo en la superficie del agar contando el número de ondulaciones del cuerpo anterior durante periodos de tiempo de treinta segundos. Para esto fueron tomados 10 nematodos de cada solución de tratamiento y de la caja control a los cuales se les realizo la medición, para seguir con el análisis de los datos obtenidos.

Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada concentración y para la población control.

4.3.6.2 Ensayo de Longevidad

En placas con la solución de tratamiento incorporada al medio de cultivo, nematodos obtenidos de una previa sincronización, fueron dejados siete días, para que alcancen el estadio L4. Quince nematodos fueron tomados y transferidos a una nueva caja de Petri. Diariamente los nematodos en estudio fueron contados y transferidos a una nueva caja, evitando así la interferencia de la descendencia para el conteo de larvas vivas. Cuando los nematodos cumplían el octavo día de traspaso, el procedimiento de transferencia se realizaba cada dos días.

El análisis fue basado en el conteo de las larvas vivas, encontradas en las placas de tratamiento, las larvas que no respondían a estímulos fueron contadas como larvas muertas.

El ensayo de esperanza de vida es un método directo que determina la relación entre edad y muerte. Al finalizar el ensayo, se realizan unas curvas, para evidenciar el porcentaje de población de nematodos vivos a través del tiempo, el impacto del tratamiento en la esperanza de vida y la variación de los resultados por las diferentes concentraciones aplicadas. (43)

Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada concentración y para la población control.

4.3.6.3 Ensayo de Reproducción

Cinco larvas provenientes del procedimiento de sincronización fueron puestas en cajas diferentes (un nematodo por caja), el nematodo en estudio fue transferido diariamente a una caja nueva, hasta que este estuviera muerto.

Las cajas donde estuvo el nematodo se incuban a 20°C. La evaluación de las cajas fue realizada cuatro días después y se realizó un conteo de larvas L2 y L3.

El análisis de este ensayo fue realizado a partir del conteo de larvas presentes en las cajas donde el nematodo en estudio estuvo.

Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada concentración y para la población control.

4.3.6.4 Observación por medio del microscopio de fluorescencia

La observación de los agregados proteicos del nematodo se realizó mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. Los nematodos observados fueron inmovilizados con Levamisol, para posteriormente ubicarlos en una lámina con una

delgada capa de agarosa como césped. Tres nematodos en estadio L4 de cada concentración fueron observados, a los cuales se les tomo una fotografía la cual fue analizada por el programa Image J versión FIJI en el cual el valor de la fluorescencia fue cuantificado.

4.3.7 Evaluación estadística de los datos obtenidos

Cada ensayo arrojo un set de datos provenientes de los tres triplicados. Las tres observaciones fueron sometidas a la determinación de una media con sus respectivas desviaciones estándar con intervalo de confianza del 95%. El valor de la media fue el valor graficado.

Los datos obtenidos de los ensayos de evaluación del efecto de la cúrcuma, fueron sometidos a evaluaciones estadísticas. La evaluación de la varianza se hizo a través de una prueba One Way ANOVA, por tratarse de una prueba con una sola variable (concentración del tratamiento). La prueba ANOVA se realiza para determinar si existe evidencia estadística de que algunos de los tratamientos aplicados y el grupo de control presentan alguna diferencia.

Para evaluar si los datos obtenidos son estadísticamente significativos se definió:

-Hipótesis nula: El tratamiento no tiene ningún efecto sobre la característica evaluada.

-Hipótesis alterna: El tratamiento tiene efecto sobre la característica evaluada.

La hipótesis nula puede ser rechazada, por dos valores obtenidos de la prueba.

- Se rechaza la hipótesis nula si, el valor del estadístico F, es mayor al valor crítico del estadístico.
- O si, el P value es menor al valor critico de significancia, el cual es igual al 5%.

Los resultados obtenidos de los ensayos de fenotipificación de las cepas NL5901 y N2. Fueron evaluados estadísticamente de la misma manera. Sin embargo, las hipótesis tomadas fueron:

-Hipótesis nula: La mutación de la cepa NL5901 no tiene ningún efecto sobre la característica evaluada.

-Hipótesis alterna: La mutación de la cepa NL5901 tiene efecto sobre la característica evaluada.

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	3	24,8	8,26666667	1,84333333		
Fila 2	3	36,6	12,2	3,24		
Fila 3	3	48,3	16,1	0,73		
Fila 4	3	58,8	19,6	9		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Grupos	Suma de los cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	215,6225	3	71,8741667	19,4079658	0,000498088	4,066180551
Dentro de los grupos	29,6266667	8	3,70333333			
Total	245,249167	11				

Tabla 2 Explicación de valores obtenidos de una prueba One Way ANOVA.

Cuando se rechaza la hipótesis nula en la prueba ANOVA, se concluye que al menos uno de los tratamientos genera una respuesta media diferente a los demás. Para definir la diferencia estadística entre los tratamientos contra el control se procede a aplicar la prueba de Dunnet.

Ecuación estadística de Dunnet

$$D_{\alpha} = d_{\alpha}(a - 1, f) + \frac{\sqrt{2MS_E}}{n}$$

Donde

n: Tamaño de la muestra

a. Tratamientos: 4 (Tratamientos, incluyendo control)

f: Grados de libertad de error N-a

Cuadrado medio del error MS_E

Constante de Dunnet: $d_{\alpha}(a - 1, f)$ El valor está consignado en la tabla de constante determinada por la tabla de valores críticos, estadísticos de Dunnet. Está determinado por los grados de error y el número de tratamientos.

Si el valor del estadístico de Dunnet es menor a la diferencia entre la media del tratamiento y el control, la hipótesis nula es rechazada. Concluyendo el efecto del tratamiento es estadísticamente significativo.

El cálculo fue realizado por el programa GraphPad Prism es su versión 7.

5 RESULTADOS

Las cepas NL5901 y N2 de *C. elegans* fueron obtenidas del *Caenorhabditis Genetics Center* de la Universidad de Minnesota para ser analizadas y así determinar el efecto de la cúrcuma. La cepa N2 fue usada como control de los ensayos y la cepa NL5901 fue sometida al tratamiento, fueron alimentadas con *E. coli* OP50. La evaluación de los efectos de la cúrcuma sobre agregados proteicos fue realizada mediante la medición de características fenotípicas como la longevidad, movilidad, medición de reproducción. El tratamiento fue aplicado con soluciones a diferentes concentraciones de cúrcuma.

Inicialmente se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de la cúrcuma sobre la cepa OP50, se analizaron tres concentraciones de la solución de cúrcuma 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL y 1.5 mg/mL impregnadas en discos de 6 mm de papel filtro, la evaluación se realizó a través de la medición de halos de inhibición, donde observó que ninguna de las concentraciones presento halo de inhibición contra la cepa de *E. coli* OP50.

5.1 Estadios Larvarios y diferencias fenotípicas de las cepas N2 y NL5901.

Los diferentes estadios larvarios del nematodo N2 fueron examinados directamente en las cajas de NMG hasta diferenciar cada uno. Para iniciar cada ensayo los nematodos fueron sincronizados y se tomaron larvas en estadio L4, la evaluación de los nematodos fue basada en tamaño, anatomía y tiempo de desarrollo, donde, para el estadio L1 se consideraron los más pequeños, ubicándolos por movimiento. Para el estadio L2, las larvas aumentan su tamaño, lo que permitió una mejor observación. El intercambio a estadio L3 y L4 es un aumento de tamaño y la observación del sistema reproductor del nematodo, sin huevos a la vista, la observación del aparato reproductor de *C. elegans*, determino el momento de inicio de todos los ensayos por indicar el estadio L4. En el siguiente estadio, la adultez, la característica más notoria fue la aparición de huevos al interior del nematodo (Ver ilustración 14)

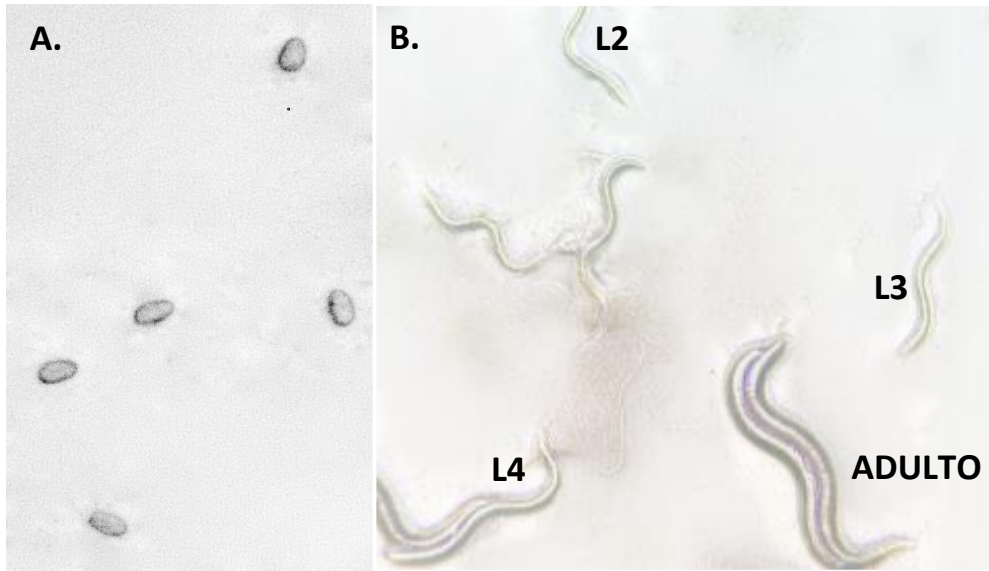
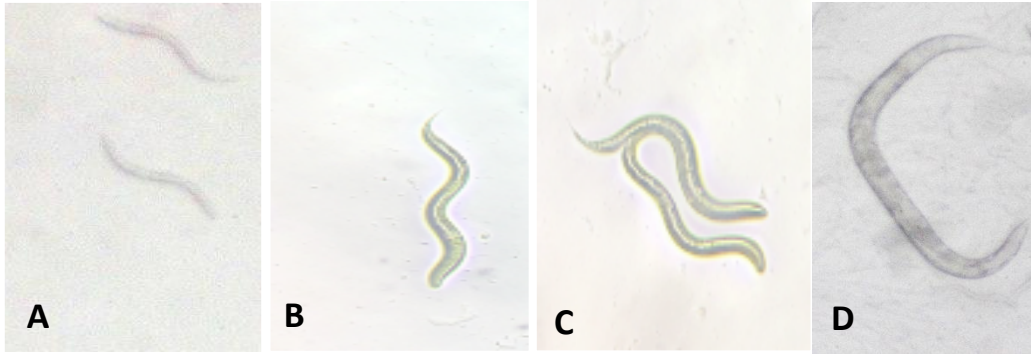


Ilustración 14 Observación de cajas NGM en estereoscopio, se observan las diferencias fenotípicas de los nematodos en diferentes estadios a lo largo del ciclo de vida del nematodo. A) Producto del tratamiento de sincronización, obtención de huevos en el mismo estadio. B) Caracterización fenotípica de estadios en una placa de NGM, observación realizada en estereoscopio.

Las cepas NL5901 y N2 (cepa salvaje) fueron caracterizadas fenotípicamente usando los parámetros de longitud, longevidad, movilidad, reproducción y cuantificación de agregados proteicos. Al observar las características fenotípicas de longitud de las cepas N2 y la NL5901 no se observaron diferencias, sin embargo, la movilidad, reproducción y agregados proteicos fueron diferencias entre las dos cepas.

Cepa N2



Cepa NL5901

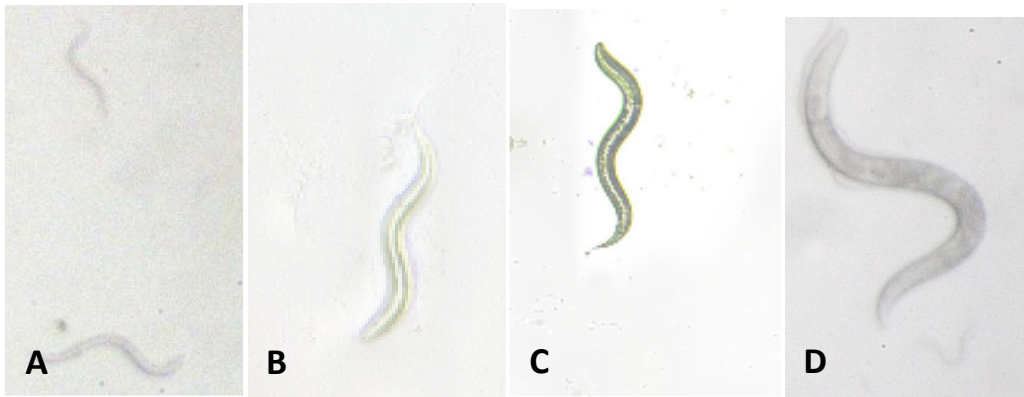


Ilustración 15 Comparación fenotípica de nematodos de la cepa mutante NL5901 y cepa salvaje N2 de *Caenorhabditis elegans*. Observación en estereoscopio de los nematodos a través del ciclo de vida del nematodo. A) Larvas en estadio L1 y L2 de la cepa N2 Y NL5901. B) Larvas en estadio L3 de la cepa N2 Y NL5901. C) Larvas en estadio L4 de la cepa N2 Y NL5901. D) Larvas en estadio adulto de la cepa N2 Y NL5901. -

La principal diferencia entre las dos cepas se observó en la longevidad posterior al desarrollo de la larva L4. El dato de longevidad obtenido para la cepa salvaje fue de una media de 26 días de duración y para la cepa NL5901 de 18 días, es necesario tener en cuenta que los 7 primeros días corresponden al desarrollo larvario entre huevo y larva L4. Lo que arrojó una diferencia de 12 días. Ver ilustración 16.

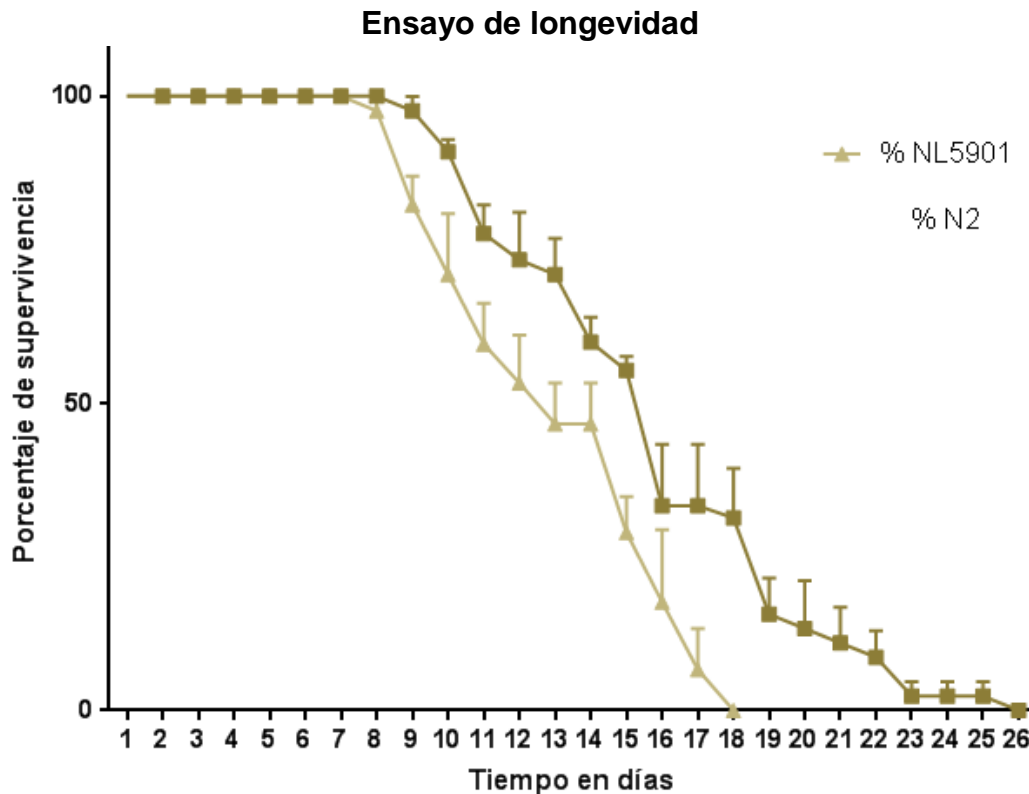


Ilustración 16 Caracterización fenotípica de longevidad en cepas de *C. elegans* NL5901 junto con N2 o cepa salvaje. Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. P value <0.001. Se rechaza la hipótesis nula.

Por otro lado, en ensayo de reproducción se observó que la aparición de los huevos de las dos cepas tardo el mismo tiempo, sin embargo, la postura de huevos en cuanto a cantidad tuvo una marcada diferencia, arrojando que la cepa N2 contaba con una alta capacidad de producción de progenie, con una media de 139 larvas durante todo su ciclo de vida, mientras que NL5901 arrojó una media de 47 larvas, la diferencia entre las dos cepas está dada en promedio por la capacidad de producción de aproximadamente 100 nematodos adicionales más para la cepa salvaje. Los valores obtenidos fueron sometidos a una prueba ANOVA de una vía para la comparación de varianza, lo que arrojó que, uno de los valores es estadísticamente significativo con un valor de P value <0.001. (Ver ilustración 17)

Ensayo de reproducción

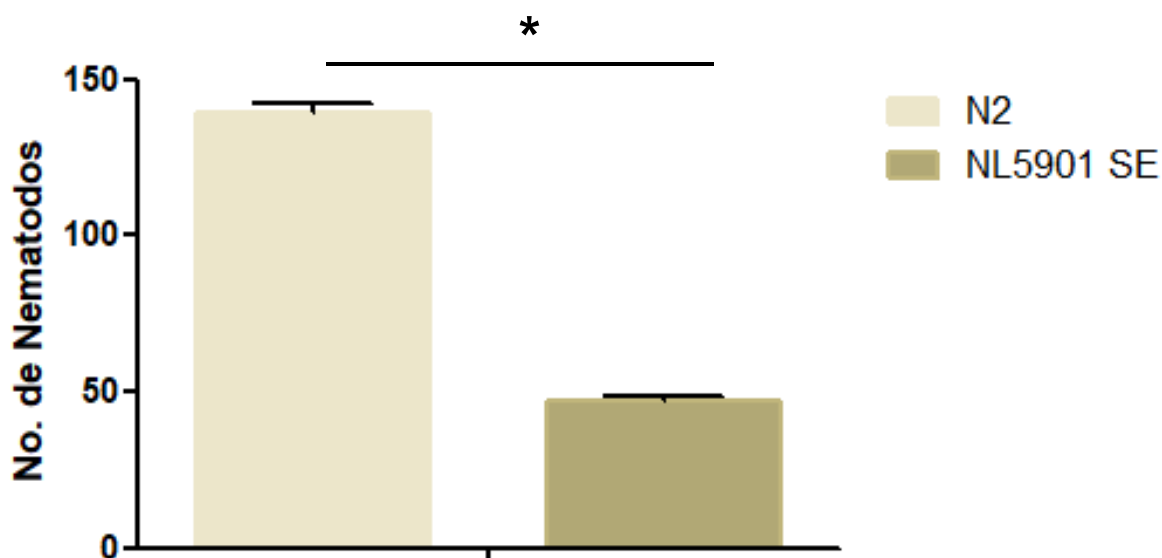


Ilustración 17 Caracterización fenotípica de reproducción en cepas de *C. elegans* NL5901 junto con N2 o cepa salvaje. Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7.*Significancia estadística entre valores. P value <0.001.

Dentro de la fenotipificación de las dos cepas fue posible observar una relación entre la capacidad de producción de progenie y la longevidad, esto debido a que fue observado un fenómeno de eclosión de huevos dentro de los nematodos NL5901. (Ver ilustración 18)

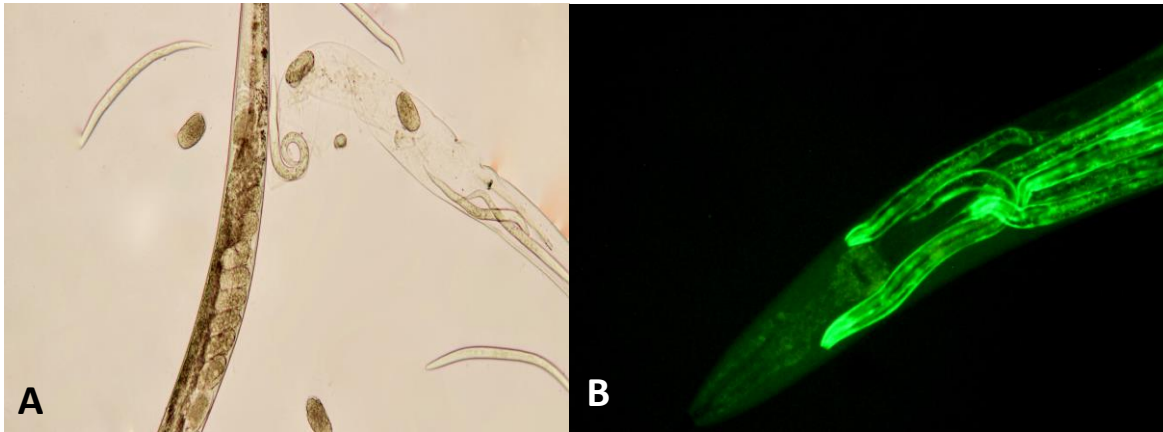


Ilustración 18 Observación del fenómeno de Eclosión Matricida en la cepa NL5901. **A.** Observación de nematodo en estadio L4 en microscopio con aumento de 40X. **B)** Observación de nematodo en estadio L4 en microscopio de fluorescencia con aumento de 40X.

Finalmente, la acumulación proteica de la cepa NL5901 se da en las paredes musculares, es por eso que, al realizar la medición de la motilidad de los nematodos, la cepa N2 mostró un valor marcado de 25 ondulaciones en 30 segundos, en contraste con NL5901 la cual arrojo un dato de 8 ondulaciones en 30 segundos, con una diferencia de 17 ondulaciones en 30 segundos, con lo que se puede deducir que la agregación proteica afecta la movilidad del nematodo, esto fue observado durante el manejo del nematodo, donde eran realizados los pases y manejos con más facilidad en la cepa NL5901. Ver ilustración 19

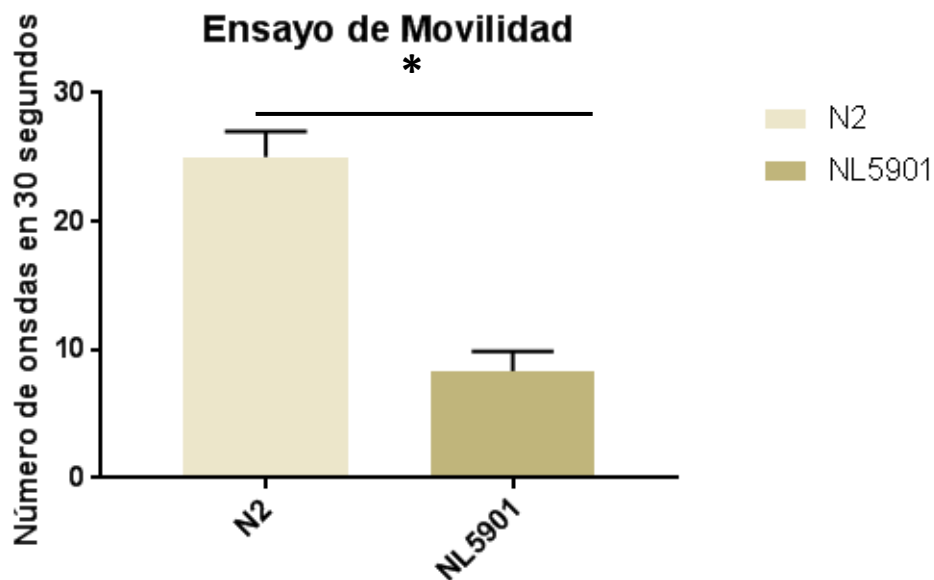


Ilustración 19 Caracterización fenotípica de movilidad en cepas de *C elegans* NL5901 junto con N2 o cepa salvaje. Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. *Significancia estadística entre valores, P value <0.001 . Se rechaza la hipótesis nula.

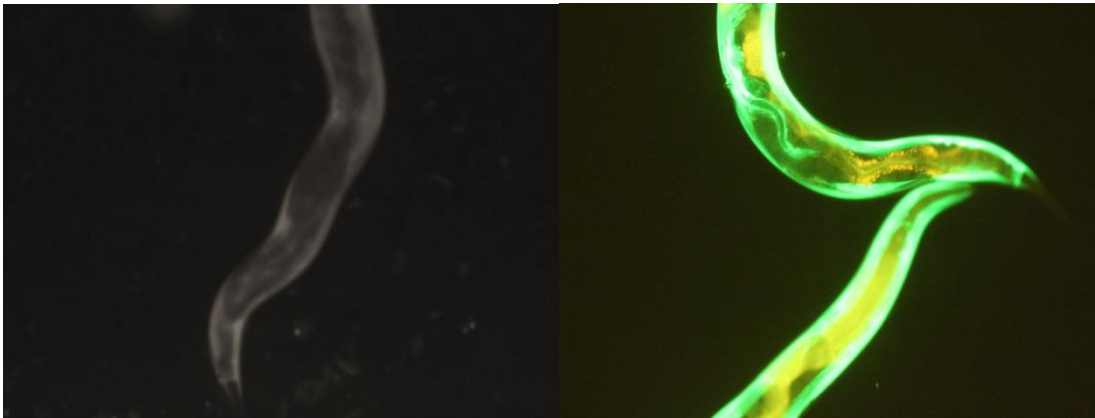


Ilustración 20 Observación de agregados proteicos de α -sinucleína en cepas N2 y NL5901 *C elegans*. Observación en microscopio de fluorescencia. Foto tomada por autora.

5.2 Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la longevidad de la cepa NL5901 de *C elegans*.

Después de sincronizada la cepa NL5901 los huevos obtenidos fueron transferidos a diferentes placas de tratamiento con la respectiva concentración de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL) con lo que se determinó la longevidad de los nematodos frente al extracto. La cepa NL5901 sin tratamiento fue usada como control. En la concentración de 0.5mg/ml la longevidad de los nematodos fue de 21 días, en la concentración de 1.0 mg/ml presentaron una longevidad de 26 días y en la concentración de 1.5 mg/mL de 13 días comparadas con el control que fue de 18 días. Para este ensayo es importante resaltar que la cepa con el tratamiento a concentración de 1.0 mg/mL presentó una longevidad similar a la cepa salvaje N2 de 26 días. Ver ilustración 21

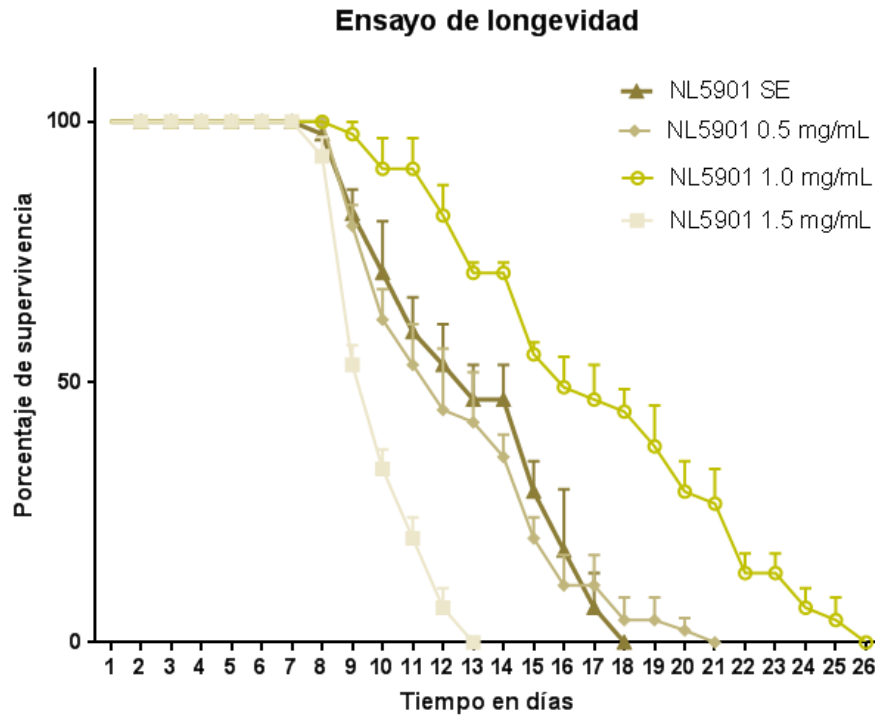


Ilustración 21 Ensayo de Longevidad en cepa de *C elegans* NL5901 en tratamiento 8 diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL) dato expresado en porcentaje. Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. P value <0.001. Se rechaza la hipótesis nula.

5.3 Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la movilidad de la cepa NL5901 de *C elegans*

Nematodos provenientes del proceso de sincronización fueron transferidos a placas de tratamiento (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL), permitiendo que estos alcanzaran un estadio L4, para posteriormente tomar diez las larvas L4, las cuales fueron transferidas a una placa, donde se realizó el conteo de las ondas en un periodo de 30 segundos, esto fue realizado por triplicado. Se observó como la cepa control tenía una capacidad de movimiento de 8.3 ondas en 30 segundos, la cepa sometida a la concentración 1.5 mg /mL fue la que presentó una mejor recuperación del movimiento con 20 ondas en 30 segundos. Al relacionarlos con la cepa N2, se encuentra que a esta concentración de tratamiento el valor se acerca a la cepa salvaje. La concentración de 0.5 mg/mL arrojó un dato de 12 ondas en

30 segundos, para la concentración de 1.0 mg/mL el dato obtenido fue de 16 ondas en treinta segundos. Lo que se puede sugerir es que, ante el tratamiento con cúrcuma, la cepa NL5901, es capaz de recuperar el movimiento y que esta capacidad, disminuye en relación a la concentración aplicada. Ver ilustración 22

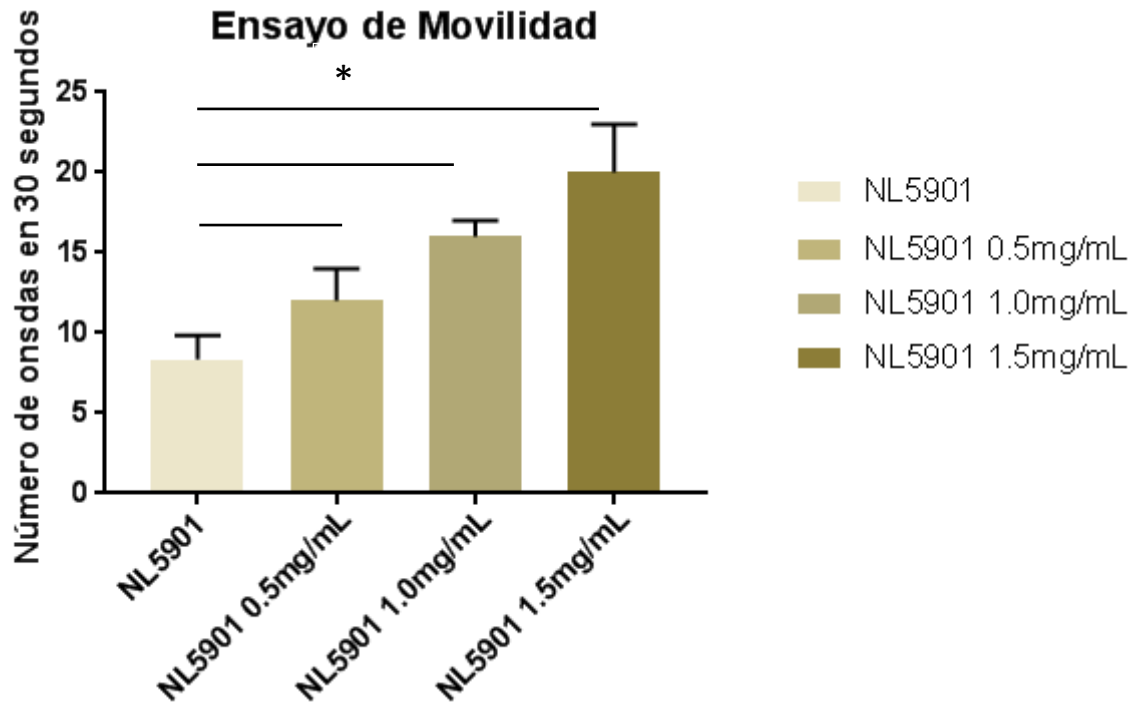


Ilustración 22 Ensayo de movilidad en cepa de *C elegans* NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL), movilidad expresada en número de ondas realizadas en 30 segundos. Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. *Significancia estadística entre valores, validada por la prueba de Dunnet. P value <0.0001. Se rechaza la hipótesis nula.

5.4 Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la reproducción de la cepa NL5901 de *C elegans*.

Larvas en estadio L4 fueron sometidas a las tres concentraciones de cúrcuma, cinco nematodos fueron transferidos de forma individual, a los cuales diariamente se les realizo un pase a caja nueva hasta que el nematodo en estudio muriera, este procedimiento fue realizado por triplicado. El análisis de la reproducción, fue realizado por el conteo de las larvas que aparecían en las cajas por donde paso el

nematodo en estudio. Posterior al tratamiento, se observó que la cepa sometida a una concentración de 1.5 mg/mL mostro el valor más alto en reproducción con un valor de 107 nematodos durante todo el ciclo de vida, en contraste con la cepa sin tratamiento la cual tenía una capacidad de producción de 47 nematodos, lo que arroja una diferencia de aproximadamente 100 nematodos, así mismo basado en el resultado de las demás mediciones, fue observado que la mejoría para esta característica fenotípica es directamente proporcional a la dosis aplicada. A mayor dosis aplicada la reproducción de la nematodo mejora.

Cabe resaltar que basado en la observación del comportamiento en reproducción de los nematodos los días en los que hubo una puesta de huevos y donde pudo ser evaluada la reproducción del nematodo estaban entre el primer día y el tercero, posterior a que llegaran al estadio L4.

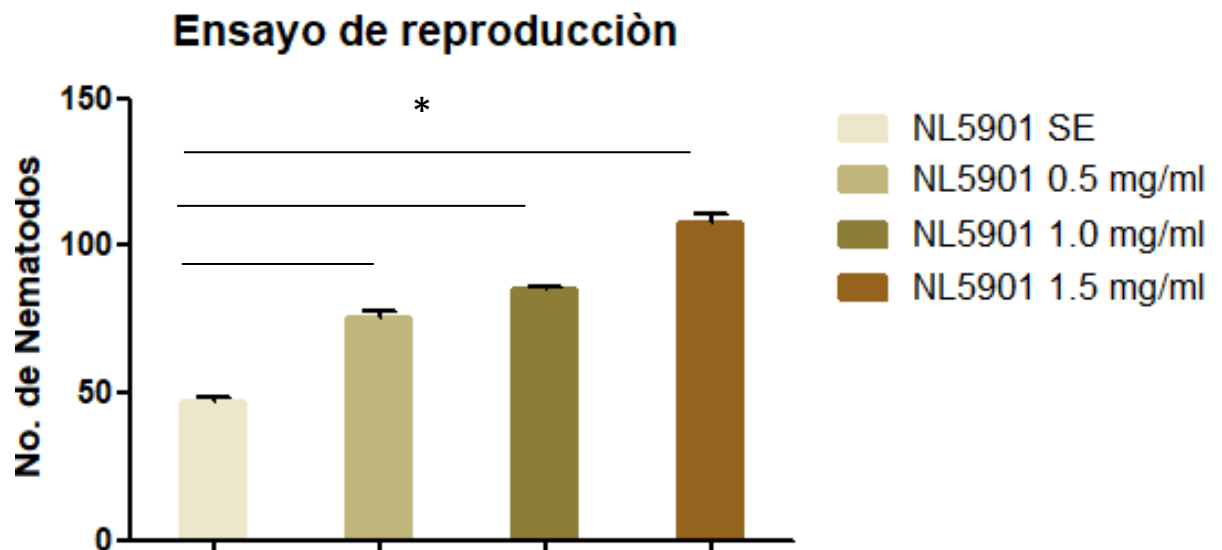


Ilustración 23 Ensayo de reproducción en cepa de *C elegans* NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL). Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. *Significancia estadística entre valores, validada por la prueba de Dunnet. P value <0.001. Se rechaza la hipótesis nula.

5.5 Evaluación del efecto de la cúrcuma sobre la agregación proteica de la cepa NL5901 de *C elegans*.

La evaluación del efecto de la cúrcuma fue realizada en nematodos L4, tomados de cada placa tratamiento, los nematodos tomados fueron observados en el microscopio de fluorescencia. Para posteriormente tomar imágenes las cuales fueron analizadas con el programa Image J, en el cual se realizó la cuantificación proteica.

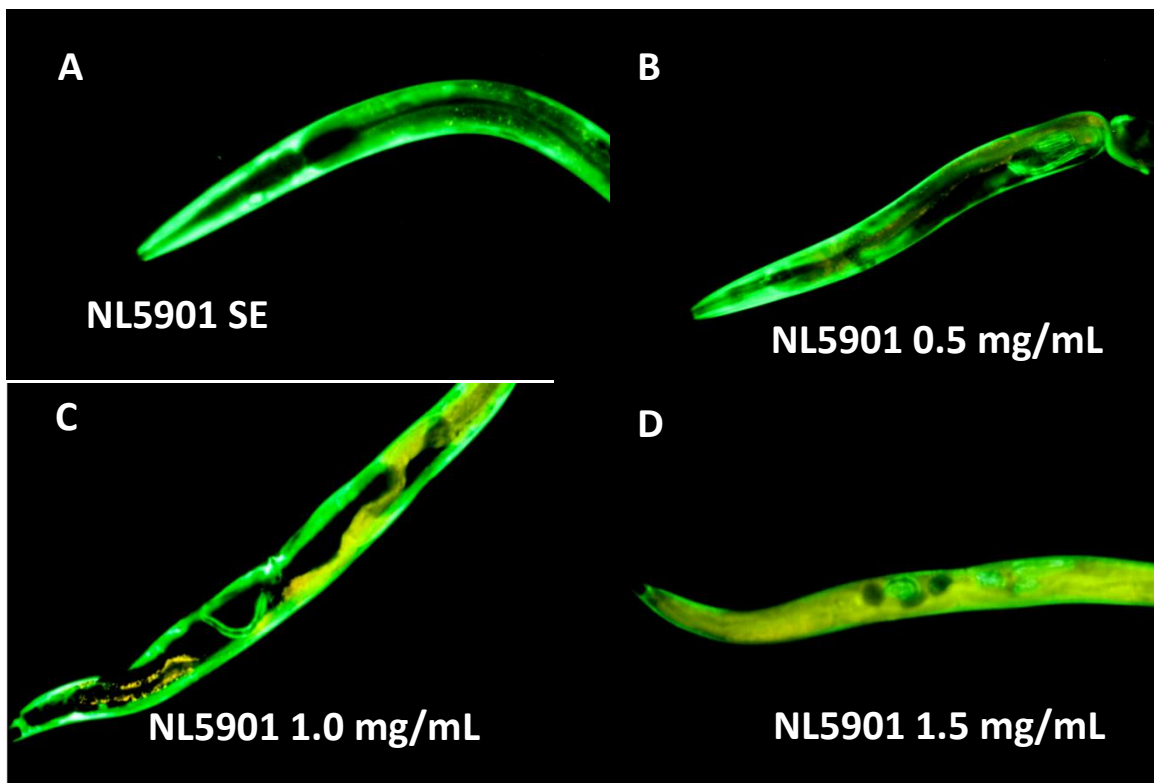


Ilustración 24 Observación de fluorescencia de nematodos sometidos al tratamiento junto con la cepa control. A) Nematodo de la cepa NL5901 sin exposición al tratamiento. B) Nematodo de la cepa NL5901 con exposición a solución 0.5 mg/mL. C) Nematodo de la cepa NL5901 con exposición a solución 1.0 mg/mL D) Nematodo de la cepa NL5901 con exposición a solución 1.5 mg/mL.

Los resultados obtenidos se expresan en el porcentaje de fluorescencia en relación al control, donde se obtuvo que la concentración más alta de tratamiento (1.5 mg/mL) presenta una fluorescencia de 46% con respecto al control, para la concentración de 1.0 mg/mL el valor obtenido fue de una reducción del 68%, con

respecto al control y el valor más bajo de las tres concentraciones arrojo que con respecto al control contada con 76% de fluorescencia.

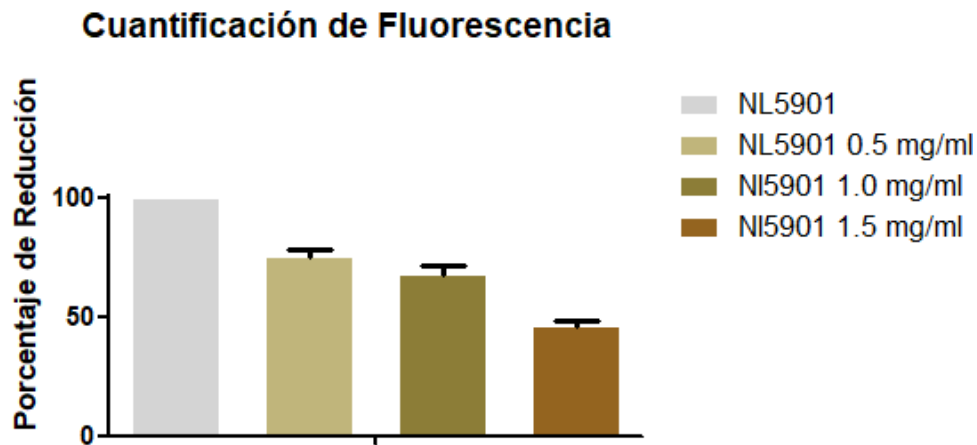


Ilustración 25 Cuantificación de fluorescencia en cepa de *C. elegans* NL5901 en tratamiento a diferentes concentraciones de cúrcuma (0.5mg/mL 1.0 mg/mL Y 1.5 mg/mL). Se muestra el resultado de tres ensayos realizados para evaluar las diferencias de las cepas. Se realizó una prueba ANOVA de una vía, con el programa GraphPad Prism versión 7. *Significancia estadística entre valores, validada por la prueba de Dunnet. P value <0.001. Se rechaza la hipótesis nula. Para la concentración 0.5 mg/mL, la hipótesis no puede ser rechazada debido a que el valor que arroja la prueba de Dunnet, indica que no hay significancia estadística en relación al control.

En base a los resultados obtenidos de los ensayos realizados, es posible afirmar que hay una relación dosis dependiente entre las concentraciones de la solución de tratamiento con la agregación proteica. Así mismo, los resultados de los demás ensayos demuestran que la disminución proteica, mejora las características de la cepa NL5901.

6 DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó el efecto que tiene la cúrcuma sobre la agregación proteica de α -sinucleína, presente en la pared muscular de la cepa mutante de *Caenorhabditis elegans* NL5901 y su consecuencia sobre las características fenotípicas de longevidad, movilidad, reproducción.

El proceso de absorción en paredes celulares es dependiente del pH del solvente del compuesto(44, 45). En soluciones básicas o neutras, el compuesto no se absorbe pero la absorción mejora condiciones acidas en un 20% (15, 45) Teniendo en cuenta lo anterior el solvente ideal la cúrcuma fue la solución salina, por su pH ácido de 5.5. Como lo recomiendan varios estudios (15, 41).

Previo a la realización de los ensayos en *C elegans*, la *E coli* OP50, fuente de alimento del nematodo fue sometida a una determinación de concentración mínima inhibitoria, en la cual se garantiza que las características bactericidas de la cúrcuma no infirieran en la cantidad y calidad del alimento del nematodo, donde se encontró que la cúrcuma no tiene ningún efecto en la inhibición del crecimiento de la bacteria. En un estudio realizado en el 2015 en cepas ATCC de *E. coli* se reportó la actividad bactericida de la cúrcuma, el cual afirma que la cúrcuma aumenta la permeabilidad de la membrana celular, por medio de la formación de liposomas, causando la muerte bacteriana (46) gracias a un compuesto de clase terpenoide (47) Es importante aclarar que la cepa usada en esta investigación fue la *E coli* OP50 la cual cuenta con mecanismos de resistencia a antibióticos como la estreptomicina (48).

La acumulación de la α -sinucleína se relaciona con la degeneración neuronal en la Enfermedad del Parkinson en varios modelos de estudio (49-53). *C elegans* NL5901 mostro cambios en las características fenotípicas de longevidad, movilidad y reproducción reportadas en la literatura. La disminución de la longevidad en la cepa NL5901 ha sido demostrada previamente (43) y es explicada por varios factores que intervienen en la duración de ciclo de vida del nematodo, principalmente, la agregación proteica que expresa la cepa mutante NL5901 la cual muestra aumento en estrés oxidativo (36, 54), proceso que acelera el envejecimiento del nematodo.

La disminución en la longevidad para la cepa NL5901 en ocho días puede ser explicada por el fenómeno observado de eclosión interna de huevos en NL5901.(55) La literatura define este fenómeno como Eclosión Matricida, este es producido en cepas que han sido manipuladas genéticamente, lo que genera un cambio en la capacidad de expulsión de los huevos o en las neuronas encargadas

de la estimulación de este proceso (55, 56). En 2011 se demostró que la capacidad se ve disminuida en 30% en cepas mutantes por el efecto de eclosión matricida (56), efecto en el cual se ve en cepas mutantes como NL5901, donde la agregación proteica se desarrolla en la pared muscular del nematodo, lo que impide la contracción muscular evitando la salida de los huevos para su desarrollo extra uterino, extendiendo la estadía dentro de la madre y los huevos eclosionan, alimentándose dentro de la madre y causando su muerte temprana, acortando la longevidad del nematodo.

Por otro lado, la movilidad del nematodo se ve afectada por la agregación proteica la cual es dirigida por el promotor *unc-54* a la pared muscular, los efectos producidos están relacionados a la contracción muscular, la mutación no genera ningún cambio de constitución al musculo (57). La expresión de la proteína en la pared muscular y no en las neuronas debido a que la expresión dirigida por *unc-54* es más fuerte en la pared muscular, los músculos al ser largos permiten una mejor visualización (5)

La cúrcuma, es conocida por tener múltiples efectos como los de neuro protección, inmuno modulación, antibacteriales, antioxidantes, entre otros (9) La cepa NL5901 el modelo de *C elegans* mostro ante el tratamiento de la cúrcuma la reducción de agregados proteicos y con esto la mejoría en las características fenotípicas evaluadas.

El valor obtenido por otros estudios está relacionado con los obtenidos en este proyecto en donde demostró que la cúrcuma produce una extensión en la vida del nematodo, siendo el valor óptimo de tratamiento para esta variable 1.0 mg/mL el cual igualo el valor de la cepa N2 en este estudio. Un estudio realizado en el 2001 por Liao demostró un aumento en la longevidad en la cepa N2 ante el tratamiento con cúrcuma, el cual arrojó un valor de longevidad de 17.9 días y la cepa tratada de 20.3 días (Este valor no incluye el desarrollo de larva L1 a L4) (58) El valor de la longevidad de *C elegans* se replica en otro estudio que asegura que para la cepa N2 sin tratamiento, en su comportamiento normal es de 22 días. (59) En 2013, el efecto de la cúrcuma fue demostrado en tres modelos biológicos, ratones, *Drosophila melanogaster* y *C elegans*. Los resultados mostraron que, el tratamiento con cúrcuma aumenta la longevidad en todos los modelos y que el valor de aumento es dosis dependiente, *C elegans* aumenta su longevidad en 39.3% con un tratamiento de 20mM de cúrcuma. (9)

Los ensayos realizados arrojan que la reducción de los agregados proteicos depende de la dosis aplicada, con una relación inversamente proporcional, la concentración aplicada de 1.5 mg/mL es el grupo de estudio con menor porcentaje

de fluorescencia 46%, en comparación a la cepa control. Los efectos de la cúrcuma en la reducción de agregados proteicos es atribuido a sus propiedades antioxidantes (9, 10) Poderosos antioxidantes han sido evaluados en su capacidad de reducción e agregados proteicos. Como *Chondrus crispus* mostro que podía reducir la agregación proteica en *C elegans* mejorando así sus características fenotípicas, cabe resaltar el impacto del tratamiento en la reducción del estrés oxidativo.(7) Adicionalmente *Rhodiola rosea* un potente antioxidante fue probado en un modelo para la Enfermedad de Huntington, el cual reduce la agregación proteica característica de esta enfermedad y aclara que aunque la agregación de PolyQ sigue presente en el curso de la enfermedad, la muerte neuronal y la disfunción del comportamiento disminuye significativamente(6). Al comparar distintos antioxidantes encontrados en la naturaleza y su acción sobre la reducción de la agregación proteica, la cúrcuma ocupa el tercer puesto entre los compuestos con más poder antioxidante. (8).

La evaluación de los efectos de la cúrcuma para las enfermedades neurodegenerativas muestra el poder de este compuesto como reductor de la agregación proteica por la vía del estrés oxidativo.(11) Modelos como ratones han sido usados para la medición del efecto de la cúrcuma en lesiones de las células dopaminérgicas, la medición es realizada por características del comportamiento, donde se demuestra una recuperación y mejoría del daño motor (10). Cabe resaltar que el modelo de ratones no explica el proceso biológico de agregación proteica, mientras que *C elegans* es un modelo en el cual es posible observar, cuantificar el efecto de la agregación proteica. Esta misma evaluación se realiza en modelos como *Drosophila* donde se demuestra que el consumo de la cúrcuma o de su metabolito activo aumenta la longevidad y suprime los fenotipos neuronales producidos por daños inducidos en el modelo. (60)

Las propiedades antioxidantes de la cúrcuma, demuestran un efecto en la reducción de agregados proteicos. Lo que sugiere una vida en la cual la agregación es dependiente del estrés oxidativo.

7 CONCLUSIONES

La cepa mutante de *E coli* OP50, no presenta un halo de inhibición ante el tratamiento de cúrcuma, pese a lo reportado en la literatura acerca de la sensibilidad de *E coli* ATCC. Lo que sugiere que la cepa OP50 de *E coli*. Cuenta con mecanismos de resistencia para los efectos bactericida de la cúrcuma.

Los nematodos NL5901, contienen una mutación que expresa la agregación proteica de alfa sinucleina en la pared muscular del nematodo *Caernohabditis elegans*, la cual puede ser observada mediante un microscopio de fluorescencia.

La cepa NL5901 de *C elegans*, tiene características fenotípicas diferentes de la cepa N2. La longevidad de la cepa NL5901 se ve disminuida, así como su reproducción y movilidad. Esto debido a la agregación proteica que NL5901 expresa.

Los nematodos de la cepa NL5901, sufren un acortamiento de la vida por un fenómeno llamado eclosión matricida donde, los huevos, eclosionan dentro de la madre, este se presenta por la incapacidad del nematodo de contraer sus fibras musculares lo que impide la expulsión de los huevos.

La solución de cúrcuma reduce los agregados proteicos de la cepa NL5901 de *C elegans*. Características fenotípicas de la cepa mejoran cuando la reducción proteica de alfa sinucleina disminuye.

8 REFERENCIAS

1. Goetz CG. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011;1(1):a008862.
2. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(7):492-501.
3. Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, et al. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American Journal of Pathology*. 1998;152(4):879-84.
4. Chen X, Barclay JW, Burgoyne RD, Morgan A. Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative diseases. *Chem Cent J*. 2015;9.
5. Van Ham TJ, Thijssen KL, Breitling R, Hofstra RMW, Plasterk RHA, Nollen EAA. *C. elegans* Model Identifies Genetic Modifiers of α -Synuclein Inclusion Formation During Aging. *PLOS Genetics*. 2008;4(3):e1000027.
6. Xiao L, Li H, Zhang J, Yang F, Huang A, Deng J, et al. Salidroside protects *Caenorhabditis elegans* neurons from polyglutamine-mediated toxicity by reducing oxidative stress. *Molecules*. 2014;19(6):7757-69.
7. Liu J, Banskota AH, Critchley AT, Hafting J, Prithiviraj B. Neuroprotective effects of the cultivated *Chondrus crispus* in a *C. elegans* model of Parkinson's disease. *Mar Drugs*. 2015;13(4):2250-66.
8. Ono K, Yamada M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *J Neurochem*. 2006;97(1):105-15.
9. Shen LR, Parnell LD, Ordovas JM, Lai CQ. Curcumin and aging. *BioFactors*. 2013;39(1):133-40.
10. Harish G, Venkateshappa C, Mythri RB, Dubey SK, Mishra K, Singh N, et al. Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(7):2631-8.
11. Khuwaja G, Khan MM, Ishrat T, Ahmad A, Raza SS, Ashafaq M, et al. Neuroprotective effects of curcumin on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Brain Research*. 2011;1368:254-63.
12. Pandey N, Strider J, Nolan WC, Yan SX, Galvin JE. Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein. *Acta Neuropathol*. 2008;115(4):479-89.
13. Liu Z, Yu Y, Li X, Ross CA, Smith WW. Curcumin protects against A53T alpha-synuclein-induced toxicity in a PC12 inducible cell model for Parkinsonism. *Pharmacological Research*. 2011;63(5):439-44.
14. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1356-64.
15. Lee WH, Loo CY, Bebawy M, Luk F, Mason RS, Rohanizadeh R. Curcumin and its derivatives: their application in neuropharmacology and neuroscience in the 21st century. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11(4):338-78.

16. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *Cmaj*. 2016;188(16):1157-65.
17. Marjama-Lyons JM, Koller WC. Parkinson's disease. Update in diagnosis and symptom management. *Geriatrics*. 2001;56(8):24-5, 9-30, 3-5.
18. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*. 2010;33(12):559-68.
19. Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, et al. α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *The Lancet*. 2004;364(9440):1167-9.
20. Burre J. The Synaptic Function of alpha-Synuclein. *J Parkinsons Dis*. 2015;5(4):699-713.
21. Xu L, Pu J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. 2016;2016:1720621.
22. Fink VNUALFAL. Protein misfolding, aggregation and conformational Diseases. . Fink VNUALFAL, editor: Springer US 2007.
23. Chege PM, McColl G. Caenorhabditis elegans: a model to investigate oxidative stress and metal dyshomeostasis in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2014;6:89.
24. Bodhicharla RK. Transgenic nematodes as a model for Parkinson's disease. United Kingdom: University of Nottingham 2012.
25. Sato K, Norris A, Sato M, Grant BD. C. elegans as a model for membrane traffic. *WormBook : the online review of C elegans biology* [Internet]. 2014 2014/04//:[1-47 pp.]. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/24778088>
<https://doi.org/10.1895/wormbook.1.77.2>.
26. Book W. Caenorhabditis elegans as a genetic organism. In: book H, editor. *Anatomy* 2014.
27. Asan A, Raiders SA, Priess JR. Morphogenesis of the C. elegans Intestine Involves Axon Guidance Genes. *PLoS Genet*. 2016;12(4):e1005950.
28. C elegans feeding [Internet]. *WormBook : the online review of C. elegans biology*. 2005.
29. Nicolas D, Lindy H-D, James D, Vincent OC, Robert JW. *Caenorhabditis elegans Feeding Behaviors*

Interactive Factory.

30. University SF. C elegans nervous system In: sciences DoB, editor. *Publications* 2008.
31. Gieseler K QH, Benian GM. . Development, structure, and maintenance of C. elegans body wall muscle. In: *WormBook*, editor. 2005.
32. Bargmann CI. Chemosensation in C elegans *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2006(6).
33. Database JSE. C. elegans Development and Reproduction. *Biology I: yeast, Drosophila and C elegans: JoVe*; 2018.
34. Maulik M, Mitra S, Bult-Ito A, Taylor BE, Vayndorf EM. Behavioral Phenotyping and Pathological Indicators of Parkinson's Disease in C. elegans Models. *Frontiers in Genetics*. 2017;8:77.

35. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
36. Harrington AJ, Hamamichi S, Caldwell GA, Caldwell KA. *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease. *Dev Dyn*. 2010;239(5):1282-95.
37. Danielson SR, Andersen JK. Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(10):1787-94.
38. Bharat B, Aggarwal Y-JS, Shishir Shishodia. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease.*: Springer; 2007. 501 p.
39. Satapathy P, Salim C. Attenuation of Dopaminergic Neuronal Dysfunction in *Caenorhabditis elegans* by Hydrophilic Form of Curcumin 2016.
40. Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Ceron J. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *J Vis Exp*. 2012(64):e4019.
41. Reddi BAJ. Why Is Saline So Acidic (and Does It Really Matter?). *Int J Med Sci*. 2013;10(6):747-50.
42. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016;6(2):71-9.
43. Park HH, Jung Y, Lee SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 2017;40(2):90-9.
44. Chen Z, Sun D, Bi X, Zeng X, Luo W, Cai D, et al. Pharmacokinetic based study on "lagged stimulation" of *Curcumae Longae Rhizoma* - *Piper nigrum* couplet in their main active components' metabolism using UPLC-MS-MS. *Phytomedicine*. 2017;27:15-22.
45. Peng S, Li Z, Zou L, Liu W. Improving curcumin solubility and bioavailability by encapsulation in saponin-coated curcumin nanoparticles prepared using a simple pH-driven loading method. 2018.
46. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121313.
47. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):564-82.
48. Gomez F, Monsalve GC, Tse V, Saiki R, Weng E, Lee L, et al. Delayed accumulation of intestinal coliform bacteria enhances life span and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* fed respiratory deficient *E. coli*. *BMC Microbiology*. 2012;12:300-.
49. Yedlapudi D, Joshi GS, Luo D, Todi SV, Dutta AK. Inhibition of alpha-synuclein aggregation by multifunctional dopamine agonists assessed by a novel in vitro assay and an in vivo *Drosophila* synucleinopathy model. *Scientific Reports*. 2016;6:38510.
50. Mizuno H, Fujikake N, Wada K, Nagai Y. alpha-Synuclein Transgenic *Drosophila* As a Model of Parkinson's Disease and Related Synucleinopathies. *Parkinson's disease*. 2010;2011:212706.
51. Falkenburger BH, Saridaki T, Dinter E. Cellular models for Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2016;139(S1):121-30.

52. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
53. Lo Bianco C, Ridet JL, Schneider BL, Deglon N, Aebischer P. alpha - Synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(16):10813-8.
54. Martinez BA, Caldwell KA, Caldwell GA. *C. elegans* as a model system to accelerate discovery for Parkinson disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;44:102-9.
55. Trent C, Tsuing N, Horvitz HR. Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1983;104(4):619-47.
56. Pestov NB, Shakhparonov MI, Kornienko TV. [Matricide in *Caenorhabditis elegans* as an example of programmed death of whole animal organism: role of mitochondrial oxidative stress]. *Bioorg Khim*. 2011;37(5):705-10.
57. Moerman DG, Plurad S, Waterston RH, Baillie DL. Mutations in the unc-54 myosin heavy chain gene of *Caenorhabditis elegans* that alter contractility but not muscle structure. *Cell*. 1982;29(3):773-81.
58. Liao VH, Yu CW, Chu YJ, Li WH, Hsieh YC, Wang TT. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 2011;132(10):480-7.
59. Li Q, Zhang SH, Yu YH, Wang LP, Guan SW, Li PF. Toxicity of sodium fluoride to *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Environ Sci*. 2012;25(2):216-23.
60. Lee S, Bang SM, Lee JW, Cho KS. Evaluation of traditional medicines for neurodegenerative diseases using *Drosophila* models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:967462.

9 ANEXOS

1. Tablas de resultados para el ensayo de Longevidad

Día	N2			NL5901			NL5901 SE			NL5901 0.5 mg/mL			NL5901 1.0 mg/mL			NL5901 1.5 mg/mL		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
8	100	100	100	93	100	100	93	100	100	100	100	100	100	100	100	100	87	93
9	100	100	93	73	87	87	73	87	87	80	87	73	100	100	93	53	60	47
10	93	87	93	53	73	87	53	73	87	53	60	73	100	80	93	40	33	27
11	87	73	73	53	53	73	53	53	73	40	53	67	100	80	93	27	13	20
12	87	73	60	40	53	67	40	53	67	27	40	67	93	80	73	13	7	0
13	80	73	60	40	40	60	40	40	60	27	40	60	73	67	73	0	0	0
14	67	60	53	40	40	60	40	40	60	27	40	40	73	67	73			
15	53	60	53	20	27	40	20	27	40	27	13	20	60	53	53			
16	53	20	27	0	13	40	0	13	40	13	0	20	60	40	47			
17	53	20	27	0	0	20	0	0	20	13	0	20	60	40	40			
18	47	20	27	0	0	0	0	0	0	0	0	13	53	40	40			
19	27	7	13							0	0	13	53	27	33			
20	27	0	13							0	0	7	40	27	20			
21	20	0	13							0	0	0	40	20	20			
22	13	0	13										13	20	7			
23	0	0	7										13	20	7			
24	0	0	7										13	7	0			
25	0	0	7										13	0	0			
26			0										0	0	0			

Tabla 3. Resultados expresados en porcentaje del Ensayo de Longevidad

# NEMATODOS	# TOTAL	PORCENTAJE
15	15	100
14	15	93
13	15	87
12	15	80
11	15	73
10	15	67
9	15	60
8	15	53
7	15	47
6	15	40
5	15	33
4	15	27
3	15	20
2	15	13
1	15	7

Tabla 3 Tabla de conversión a porcentaje, de los datos obtenidos en ensayo de Longevidad

2. Tablas de resultados de Ensayo de movilidad.

N2				NL5901 SE			
POBLACION	T1	T2	T3	POBLACION	T1	T2	T3
NEMATODO 1	23	29	26	NEMATODO 1	10	5	9
NEMATODO 2	27	26	24	NEMATODO 2	9	9	8
NEMATODO 3	18	27	19	NEMATODO 3	9	7	4
NEMATODO 4	22	24	23	NEMATODO 4	12	6	9
NEMATODO 5	25	30	24	NEMATODO 5	9	5	10
NEMATODO 6	28	24	27	NEMATODO 6	7	7	6
NEMATODO 7	30	28	18	NEMATODO 7	8	8	7
NEMATODO 8	28	30	26	NEMATODO 8	10	9	9
NEMATODO 9	25	29	24	NEMATODO 9	9	8	10
NEMATODO 10	24	26	21	NEMATODO 10	14	6	9
PROMEDIO	25	27,3	23,2	PROMEDIO	9,7	7	8,1

NL5901 0.5mg/ml				NL5901 1.0mg/ml			
POBLACION	T1	T2	T3	POBLACION	T1	T2	T3
NEMATODO 1	12	11	8	NEMATODO 1	15	13	13
NEMATODO 2	11	14	11	NEMATODO 2	18	12	12
NEMATODO 3	17	11	7	NEMATODO 3	15	15	16
NEMATODO 4	14	13	13	NEMATODO 4	19	18	17
NEMATODO 5	12	14	11	NEMATODO 5	15	17	11
NEMATODO 6	15	9	9	NEMATODO 6	14	19	14
NEMATODO 7	17	12	11	NEMATODO 7	14	16	15
NEMATODO 8	18	14	13	NEMATODO 8	21	17	18
NEMATODO 9	12	13	12	NEMATODO 9	19	15	17
NEMATODO 10	12	11	9	NEMATODO 10	20	18	20
PROMEDIO	14	12	10,4	PROMEDIO	17	16	15,3

NL5901 1.5mg/ml			
POBLACION	T1	T2	T3
NEMATODO 1	15	21	22
NEMATODO 2	16	22	15
NEMATODO 3	18	29	25
NEMATODO 4	19	24	24
NEMATODO 5	15	18	22
NEMATODO 6	13	22	21
NEMATODO 7	18	19	9
NEMATODO 8	17	25	18
NEMATODO 9	19	24	17
NEMATODO 10	16	22	23
PROMEDIO	17	22,6	19,6

Tabla 4 Tabla de resultados del Ensayo de Movilidad, valores expresados en ondas en 30 segundos.

3. Tabla de resultados para el Ensayo de reproducción

	N2			NL5901 SE			NL5901 0.5mg/mL			NL5901 1.0mg/mL			NL5901 1.5mg/mL		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Nematodo 1	14 2	12 9	14 0	5 2	4 4	4 0	72	77	72	84	89	75	11 5	14	10 0
Nematodo 2	15 2	12 6	12 9	4 9	4 4	4 9	74	78	74	88	82	88	11 0	12 0	13 0
Nematodo 3	14 2	12 9	14 2	5 1	4 7	4 8	80	84	62	90	87	84	10 7	13 0	11 0
Nematodo 4	13 9	15 0	13 9	4 2	4 8	5 0	76	79	74	83	92	95	12 2	12 8	10 6
Nematodo 5	14 9	13 9	13 7	4 4	6 0	4 1	78	76	77	82	74	91	98	11 0	11 1

Tabla 5 Tabla de resultados en el ensayo de Reproducción

4. Tabla de resultados de cuantificación e fluorescencia

GRUPO DE TRATAMIENTO	T 1	PORCENTAJE	T 2	PORCENTAJE	T 3	PORCENTAJE
NL5901	11.91 9	100%	9.718	100%	10.68 4	100%
NL5901 0.5 mg/ml	8.490	71%	7.877	81%	8.001	75%
NL5901 1.0 mg/ml	8.275	69%	7.266	61%	7.958	74%
NL5901 1.5 mg/ml	5.148	43%	5.667	44%	5.468	51%

Tabla 6 Tabla de resultados de cuantificación proteica, valor expresado del programa Imaje J y su conversión en porcentaje.

GRUPO DE TRATAMIENTO	T1	T2	T3	PROMEDIO
NL5901	100%	100%	100%	100%
NL5901 0.5 mg/ml	71%	81%	75%	76%
NL5901 1.0 mg/ml	69%	61%	74%	68%
NL5901 1.5 mg/ml	43%	44%	51%	46%

5. Certificado de presentación del IV Congreso de la Asociación Científica Latina. Noviembre 2017



"ASOCIACION CIENTIFICA LATINA"
Conocimiento para la integración y progreso

La Asociación Científica Latina A.C. (ASCILA) otorga esta **CONSTANCIA** a Fajardo Rusinque Angie Fernanda y Sánchez Mora Ruth Mérida, como **expositoras** del trabajo "Evaluación de la cúrcuma sobre agregados de α -sinucleína en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*", dentro del VI Congreso Internacional de la ASCILA, llevado a cabo los días 23 y 24 de Noviembre, en la Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Estado de Yucatán, México.

Mérida, México, 23 de Noviembre de 2017

Atentamente;

Hugo Mendieta Zerón, PhD.
Director General - "ASCILA"



Roberto Acevedo Olivan, MSc.
Secretario "ASCILA"