



*Evaluación del efecto del fitocannabinoide cannabidiol (CBD)
en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans*

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de Grado
Bogotá, junio 2022



*Evaluación del efecto del fitocannabinoide cannabidiol (CBD)
en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans*

Presentado por:

Karen Lorena Hidalgo Pulido

Asesora Interna

Ruth Mélida Sánchez Mora MSc.PhD.

Asesora Externa:

Alejandra Mantilla Galindo MSc. Ca. PhD.

Universidad del Rosario

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá, junio 2022



*Evaluación del efecto del fitocannabinoide cannabidiol (CBD)
en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans*

Laureada _____

Meritoria _____

Aprobada _____

Jurados _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de Grado

Bogotá, junio 2022

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi familia, por confiar en mí y mis capacidades. A mi padre y hermano que desde el cielo están orgullosos por este nuevo paso.

Agradecimientos

Primeramente, le doy gracias a Dios porque me permitió culminar este proyecto y me dio la fuerza para no rendirme. A mi mamá por el apoyo incondicional en cada momento. A la profe Aleja por tanta paciencia para guiarme y enseñarme en todo, por su dedicación y disciplina. Les agradezco por cada aporte que tuvieron conmigo para que esto fuera posible.

Tabla de contenido

Índice de figuras.....	7
Índice de tablas	8
Resumen.....	9
Introducción	10
1. Antecedentes	11
2. Marco referencial	15
2.1. Alfa Sinucleína	15
2.2. Agregación de Alfa Sinucleína	17
2.3. Sistema Endocannabinoide	17
2.3.1. Receptores Cannabinoides	17
2.3.2. Endocannabinoides	18
2.4. Fitocannabinoides	19
2.4.1. CBD	19
2.5. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de agregación de alfa sinucleína	20
3. Diseño metodológico	21
3.1. Universo, población, muestra	22
3.2. Hipótesis, variables, indicadores	22
3.3. Técnicas y procedimientos.....	23
3.3.1. Obtención de CBD.....	23
3.3.2. Obtención de las cepas de <i>C. elegans</i> y <i>E. coli</i> OP50	23
3.3.3. Mantenimiento de <i>C. elegans</i> cepa silvestre N2 Bristol y NL5901.....	23
3.3.4. Reactivación Cultivo de <i>C. elegans</i> cepa silvestre N2 Bristol y NL5901	24
3.3.5. Sincronización	24
3.3.6. Determinación de longitud del cuerpo.....	26
3.3.7. Elaboración de las soluciones de trabajo	27
3.3.8. Dosis Letal 50 aguda.....	27
3.3.9. Ensayo de longevidad y movilidad sin tratamiento	28
3.3.10. Ensayo de longevidad y movilidad bajo el tratamiento	29
3.3.11. Determinación de agregados de alfa sinucleína.....	30

3.3.12. Determinación de la tolerancia al estrés térmico	30
3.3.13. Determinación de la tolerancia al estrés térmico junto con el tratamiento	31
3.3.14. Análisis Estadístico	31
4. Resultados	32
4.1. Congelación <i>E coli OP50</i>	32
4.2. Caracterización de las cepas	32
4.2.1. Identificación de los estadios larvarios	32
4.2.2. Identificación fluorescencia NL5901	33
4.2.3. Longitud	34
4.3. Dosis Letal 50	35
4.4. Ensayo de Longevidad	38
4.4.1. Efecto del CBD sobre la longevidad	38
4.5. Ensayo de Movilidad	40
4.5.1. Efecto del CBD sobre la Movilidad	42
4.6. Fluorescencia con CBD	45
4.7. Tolerancia al estrés térmico	47
4.7.1 Efecto del CBD sobre la tolerancia al estrés térmico	48
5. Discusión	48
6. Conclusiones	52
7. Referencias Bibliográficas	53
8. Anexos	57

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la ubicación y conformación de la alfa sinucleína humana.....	16
Figura 2. Distribución de receptores cannabinoideos en el cuerpo humano.....	18
Figura 3. Ciclo de vida <i>C. elegans</i>	21
Figura 4. Protocolo sincronización.....	25
Figura 5. Medición de Longitud con ImageJ.....	26
Figura 6. Protocolo Ensayo de Longitud.....	27
Figura 7. Protocolo Ensayo de Longevidad y Movilidad.....	29
Figura 8. Protocolo Ensayo Tolerancia al estrés térmico.....	31
Figura 9. Esquema representativo del análisis estadístico.....	32
Figura 10. Crecimiento de <i>E.coli</i> OP50.....	32
Figura 11. Nematodo en estadio larvario L4.....	33
Figura 12. Presencia agregados alfa sinucleína.....	34
Figura 13. Ensayo de Longitud.....	35
Figura 14. Nematodos observados al microscopio con reglilla.....	35
Figura 15. Ensayo de Dosis Letal 50 N2 Bristol.....	36
Figura 16. Ensayo de Dosis Letal 50 NL5901.....	37
Figura 17. Ensayo de Longevidad.....	38
Figura 18. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa N2 Bristol.....	39
Figura 19. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa NL5901.....	40
Figura 20. Ensayo de Movilidad.....	41
Figura 21. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa N2 Bristol.....	43
Figura 22. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa NL5901.....	44
Figura 23. Nematodos tratados con CBD.....	46
Figura 24. Determinación de alfa sinucleína.....	46
Figura 25. Ensayo Tolerancia al estrés térmico.....	48

Índice de tablas

Tabla 1. Variables Dependientes e indicadores.....	22
Tabla 2. Análisis Dosis Letal 50.....	37
Tabla 3. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Longevidad.....	40
Tabla 4. Análisis Ensayo de Movilidad.....	41
Tabla 5. Análisis efecto del CBD Ensayo de Movilidad cepa N2 Bristol.....	44
Tabla 6. Análisis efecto del CBD Ensayo de Movilidad cepa NL5901.....	44
Tabla 7. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Movilidad.....	45
Tabla 8. Análisis efecto del CBD determinación de alfa sinucleina cepa NL5901.....	47
Tabla 9. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Fluorescencia.....	47



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

*Evaluación del efecto del fitocannabinoide cannabidiol (CBD)
en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans*

Resumen

La alfa sinucleína, es una proteína pre sináptica, componente principal de los cuerpos de Lewy, esta es una característica patológica importante en la enfermedad de Parkinson (EP), en la cual se ha destacado la importancia del uso de modelos biológicos que permitan evaluar la disminución de dicha proteína, entre ellos, el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Este nematodo es ampliamente empleado en el estudio de varias enfermedades neurodegenerativas como la EP. En este proyecto se emplea la cepa transgénica NL5901, caracterizada por presentar agregados proteicos de alfa sinucleína marcados con YFP (1) lo que facilita su uso para la evaluación de posibles tratamientos que disminuyan la agregación de alfa sinucleína y así mejoren las características fisiológicas.

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicoactivo procedente de la planta de *Cannabis sativa*, al cual se le han atribuido varios beneficios, entre ellos, propiedades neuroprotectoras. Por lo tanto, el objetivo planteado fue evaluar el efecto del CBD de *Cannabis sativa*, en la cepa NL5901 y N2 Bristol de *Caenorhabditis elegans*.

Para el cumplimiento de este proyecto se evaluó en efecto del CBD (2), sobre algunas características como la movilidad por medio del número de ondas, la esperanza de vida del nematodo, protección bajo el estrés térmico y la agregación de alfa sinucleína. Finalmente, el tratamiento mejoró las características de los nematodos y se evidenció una disminución de los agregados proteicos en la cepa NL5901.

Palabras claves: Cannabidiol (CBD), *Caenorhabditis elegans*, alfa sinucleína NL5901.

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas son un problema de salud pública a nivel mundial y se caracterizan por ser patologías crónicas que tienden a generar una gran discapacidad física, intelectual y social, por lo tanto, causan dependencia y disminución de la calidad de vida, conllevando a un importante padecimiento individual y social de la persona afectada y sus familias. Entre ellas se encuentra la Enfermedad de Parkinson (EP), caracterizada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en un área del mesencéfalo llamada sustancia negra (SN), se considera hoy en día como el trastorno del movimiento más común que afecta de 1 a 2 personas por 1.000 habitantes y, dado que la prevalencia aumenta con la edad, la EP afecta al 1% de la población mayor de 60 años (3).

Se desconoce la causa exacta de su origen, aunque algunos casos son hereditarios en los cuales se han descrito mutaciones genéticas específicas, la mayoría de los casos son esporádicos. Las personas afectadas presentan agregados intracelulares en la sustancia “*nigra*”, llamados cuerpos de Lewy, en los cuales la proteína alfa sinucleína (α -syn) constituye uno de los componentes principales (4). Por otra parte, los cannabinoides son compuestos químicos que interactúan con los receptores cannabinoides y se dividen en tres tipos según su origen, los endocannabinoides, sintetizados de forma natural por el organismo, los cannabinoides sintéticos, creados en el laboratorio y, por último, los fitocannabinoides, que son derivados de las plantas. (5) En este caso el cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide derivado de la planta de *Cannabis sativa* que se le han atribuido varias propiedades, entre ellas neuroprotectoras, evaluadas en modelos animales (6,7), actualmente, la evidencia en el modelo animal *C. elegans* es muy limitada.

El nematodo presenta una serie de características muy ventajosas que lo hacen uno de los modelos biológicos experimentales más usado a nivel mundial, entre sus características se incluyen un ciclo de vida corto, de 2 a 3 días, lo que permite obtener resultados en poco tiempo; cuenta con un sistema nervioso simple conservado y bien descrito, compuesto por 302 neuronas; tamaño pequeño 1mm, transparencia, lo que facilita la visualización de los procesos celulares y de desarrollo (7). Además, los costos de mantenimiento y procedimientos experimentales son bajos, su manipulación es sencilla. Actualmente, mediante herramientas de biología molecular, se han logrado crear cepas

transgénicas de *C. elegans* aplicadas como modelo en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EP.

En este sentido la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*, que contiene agregados de alfa sinucleína, es un modelo eficaz para evaluar el efecto del CBD, por lo que el objetivo de este proyecto es “*Evaluar el efecto del cannabidiol (CBD) de Cannabis sativa, en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans*”.

1. Antecedentes

En primer lugar, se encontró el trabajo de Maupas (8), titulado, *Modes et formes de reproduction des nematodes*, en el que se menciona por primera vez el nematodo *Caenorhabditis elegans* como una nueva especie que mostraba gran diversidad y evolución en cuanto a los modos de reproducción, fue publicado en el año de 1900, inicialmente se realizó la revisión de trabajos acerca de la reproducción en nematodos, centrándose en la falta de reconocimiento y aceptación que se tenía en la reproducción hermafrodita en las especies revisadas.

Luego se continúa con un capítulo que describe los métodos de cultivo para gusanos y el mantenimiento general en el laboratorio, razón por la que tomó fuerza el uso de los nematodos como sujetos de investigación para el estudio de problemas o situaciones biológicas, se describen 18 especies de nematodos, incluyendo las observaciones y experimentos sobre el ciclo de vida, el modo de reproducción, frecuencia de los machos, apareamiento de los machos con hermafroditas y la propagación exitosa de líneas auto fecundadas durante varias generaciones, entre ellos *C. elegans*, al cual el autor denominó en ese momento *Rhabditis elegans*

A continuación, Brenner (9) en el año 1974, caracteriza aproximadamente 300 mutantes inducidos por EMS (Metanosulfonato de Etilo) que afectan el comportamiento y la morfología del nematodo, entre estos se destaca que 77 alteran el movimiento del animal. Por otra parte, se describen métodos para el aislamiento, mantenimiento y mapeo de las cepas mutantes bajo condiciones de laboratorio, donde se describen las cantidades y componentes del medio de crecimiento NGM y solución

buffer, también se usa por primera vez la bacteria *E. coli OP50* como fuente de alimento para el nematodo, la cual es mayormente usada debido a las características que presenta.

Posteriormente, en el año de 1976, en el trabajo realizado por Byerly et al (10), se describe el ciclo de vida de la cepa silvestre de *C. elegans* caracterizando cada uno de los estadios larvarios, iniciando con la descripción de la metodología para realizar la sincronización, esto con el fin de observar todos los nematodos en un mismo momento del desarrollo. También realizan la estandarización de la temperatura óptima para la supervivencia del nematodo, a su vez, diferencian cada uno de los estadios por medio de diferentes ensayos.

Por otra parte, en el año de 1998 Spillantini et al (11) realizaron un estudio en el que mostraron que la alfa sinucleína hacia parte del componente principal de las inclusiones filamentosas de la atrofia multisistémica, ésta incluye un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por compartir histológicamente conjuntos filamentosos ordenados en células nerviosas y células gliales, por lo que se demostró que no solamente la alfa sinucleína era el componente principal de los cuerpos de Lewy, que es la característica neuropatológica que definen la Enfermedad de Parkinson, sino que también de la atrofia multisistémica. Concluyeron que con los resultados encontrados se podía establecer que las alfa-sinucleopatías constituían una clase importante de trastorno neurodegenerativo humano.

En el mismo año Hampson et al (12) realizaron un estudio en el que examinaron las acciones neuroprotectoras de varios cannabinoides, entre ellos el CBD, por lo que agregaron los mismos en cultivos de neuronas corticales de rata que estaban expuestos con niveles tóxicos del neurotransmisor glutamato, se demostró que la toxicidad del glutamato se redujo tanto por el CBD, que es uno de los componentes no psicoactivos, como por el THC, que es el componente responsable de los efectos psicoactivos. Otro hallazgo significativo fue que la neuroprotección observada con CBD no fue afectada por el antagonista del receptor de cannabinoides, lo que indica que el modo de acción no es dependiente del receptor de cannabinoides.

Después, en el año 2002 Mechoulam et al (13) realizaron una revisión acerca de algunos aspectos farmacológicos del CBD, entre ellos se describieron la química del CBD y exponían las

propiedades anticonvulsivas, ansiolíticas, hipnóticas, antipsicóticas, antiinflamatorias anti náuseas y antioxidantes, en algunas de estas se describen ensayos clínicos en modelos animales que respaldan los diferentes efectos causados. Sin embargo, después se enfocan en el mecanismo o los mecanismos de acción, pero encontraron que éste no se une a los receptores cannabinoides conocidos y aún se desconoce cómo ejerce cada una de sus propiedades. Más adelante, referencian un trabajo en el que se plantea que era posible que sus efectos se deban a la inhibición recientemente descubierta de la captación e hidrólisis de la anandamida por parte del CBD.

Por otra parte, Van Ham et al (14) en el año 2008 decidieron por primera vez expresar alfa sinucleína en un modelo de *C. elegans*, por lo que la fusionaron con proteína amarilla fluorescente (YFP) bajo el control del promotor *unc-54* que dirige la expresión a las células musculares de la pared del cuerpo del nematodo, razón que permitía detectar visualmente la expresión de la proteína en el nematodo. Más adelante, ésta cepa transgénica fue recibida en el Centro de Genética de *C. elegans* y reconocida con el nombre de Cepa NL5901, desde allí ha sido muy utilizada en múltiples investigaciones relacionadas con la acumulación de alfa sinucleína.

Para el año 2012 Boyd et al (15) realizaron un ensayo que sirve de estándar para desarrollar estudios toxicológicos, usando como modelo biológico a *Caenorhabditis elegans*, en el que describen los mecanismos básicos para el mantenimiento y crecimiento del nematodo usando otro medio de cultivo en la cepa N2 tipo silvestre, obtenida del Centro de Genética de *C. elegans*, y cómo a partir de esta se puede realizar una comparación con las cepas transgénicas específicas para el desarrollar un proyecto de investigación. Así mismo, se describe el ensayo de cribado de alto rendimiento con el citómetro de flujo COPAS Biosort, realizan análisis de los datos llegando a la conclusión que el nematodo sea un modelo útil para investigación biológica y genética del desarrollo mediante ensayos de toxicología.

Luego, Fernández en el año 2013, realizó una revisión bibliográfica que lleva por título “Agregación de alfa sinucleína y degeneración parkinsoniana” (4) en el que inicialmente describe las características y funciones de la proteína, así mismo, resalta que la Enfermedad de Parkinson hace parte del grupo de las alfa sinucleopatías, junto a otras enfermedades como la demencia de cuerpos de Lewy (CL), atrofia multisistémica y enfermedad de Alzheimer, que tienen en común

el depósito anormal de la proteína. Se enfoca en los cuerpos de Lewy, que son agregados intraneuronales característicos de la Enfermedad de Parkinson, los cuales están constituidos por depósitos anormales de alfa sinucleína y explica que la agregación puede ser covalente y no covalente, especificando el mecanismo de cada una de ellas.

A continuación, Suero et al (5) revisaron el efecto neuroprotector de los cannabinoides derivados de la planta de *cannabis sativa* en algunas enfermedades neurodegenerativas, primero, explican que se han identificado mediante clonación molecular en ratas dos tipos de receptores cannabinoides, los CB1 y CB2, cada uno ejerce una acción diferente sobre el organismo. Por otra parte, realizan la diferenciación entre endocannabinoides, fitocannabinoides y cannabinoides sintéticos, dependiendo su origen. Continúan con las aplicaciones terapéuticas más importantes de los cannabinoides en Enfermedad de Alzheimer, de Huntington, Esclerosis Múltiple, Esclerosis Lateral Amiotrófica, y por último Enfermedad de Parkinson. Se concluye que dichas sustancias son de gran potencial no solo para disminuir los síntomas, sino para posiblemente detener el curso de la enfermedad, sin embargo, se necesitan más estudios in vivo que sustenten esta hipótesis.

Para el año 2017, Oakes et al (16) demostraron que el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la anandamida (AEA), que son agonistas de los receptores cannabinoides endógenos en el hombre, activan un receptor cannabinoide en *Caenorhabditis elegans*, *NPR-19*, modulando la señalización monoaminérgica, donde realizaron ensayos de movilidad y alimentación, como resultado estas características fueron inhibidas a través de una vía que requiere la activación del receptor NPR-19. Para confirmar la acción sobre el receptor NPR-19, se usó una cepa ausente del mismo, pero expresando CB1 y se evidenció que tanto en las cepas con el receptor y sin él. Los endocannabinoides demostraron expresión.

Por último, en el año 2020 Shrader et al (7) publicaron el primer estudio donde usaron CBD y CBDV en cepas transgénicas, la primera fue la Cepa LX703, que presenta delección de 292 pb que expresan el receptor DOP-3, un homólogo del receptor tipo D2 en mamíferos; y la Cepa CB1112, en donde la catecolamina es ausente, en ambas, evaluaron la parálisis del nematodo por medio de ensayos de natación, en la Cepa LX703 no se observó parálisis en nematodos tratados y no tratados con CBD y CBDV, ya que según investigaciones la vía de señalización DOP-3 es

necesaria para la inducción de parálisis, por lo que se requirió el ensayo para establecer si los fitocannabinoides estaban actuando sobre dicho receptor, por lo que emplearon la Cepa CB1112, que no presentaba parálisis en nematodos no tratados, ya que no presenta dopamina endógena; mientras que en los nematodos tratados con dopamina y los fitocannabinoides si se observó parálisis, por lo que se llegó a la conclusión que los fitocannabinoides actúan como agonistas parciales para los receptores de tipo dopamina en *C. elegans*.

2. Marco referencial

2.1. Alfa Sinucleína

El sello neuropatológico de la Enfermedad de Parkinson es la presencia en las neuronas dopaminérgicas presentes en la sustancia negra pars compacta (SNc) de inclusiones intracelulares conocidas como cuerpos de Lewy (LB), que se componen principalmente de alfa sinucleína (17), una proteína pre-sináptica de unión a membrana periférica que consta de 140 aminoácidos (1) y forma la familia de sinucleína de péptidos con otros dos miembros, la β -sinucleína y γ -sinucleína (18)

El gen humano que codifica la alfa sinucleína (*SNCA*) se encuentra en el cromosoma 4q21.3q22 y abarca una región de 111 kb (Figura 1a). *SNCA* consta de 6 exones que varían en tamaño de 42 a 1110 pb, de los cuales cinco corresponden a una región codificante (Figura 1b) que está altamente conservada entre especies de vertebrados (17). La traducción del gen *SNCA* comienza a partir de un codón de inicio relacionado con la autofagia, codificado por el exón 2, y se detiene en un codón de parada TAA codificado por el exón 6 (17,19) Se han identificado mutaciones de sentido erróneo en este gen; junto con la duplicación y triplicación del locus, dichas mutaciones son patógenas para las formas familiares de la Enfermedad de Parkinson. (20)

Estructuralmente la alfa sinucleína está conformada por tres dominios (figura1c); dominio N-terminal, (residuos 1-87) es una región cargada positivamente, que se divide en siete series de repeticiones imperfectas de 11 aminoácidos con una secuencia consenso KTKGEV, que similar a las apolipoproteínas, forman una alfa-hélice anfipática con 3 espirales, y median la asociación de

α -syn con los lípidos de membrana (1,17). Dominio central, denominado NAC, (residuos 61-95) participa en la formación y agregación de fibrillas, ya que puede formar estructuras β cruzadas y se cree que es responsable de la agregación de alfa sinucleína y la detección de las propiedades de los lípidos (19,21). Finalmente el dominio C-terminal, (residuos 96-140) es altamente ácido, de carga negativa y en gran medida no estructurado, implicado en diversas modificaciones posttraduccionales, y se ha sugerido como responsable de las interacciones con moduladores de la unión a membrana e involucrado en la protección de la agregación proteica (1,4)

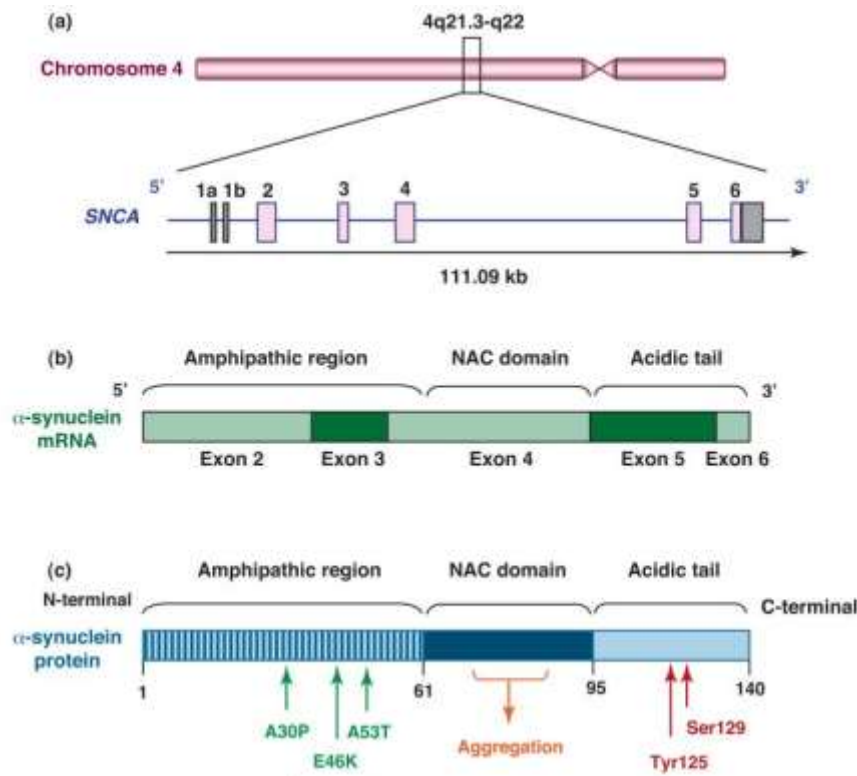


Figura 1. Representación esquemática de la ubicación y conformación de la alfa sinucleína humana. Se muestra la ubicación y conformación de la alfa sinucleína humana. **(a)** Se observa la estructura del gen SNCA que codifica para la proteína. **(b)** Se observa el RNAm de α -syn. **(c)** Se muestra los dominios proteicos de α -syn. Tomado de: Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, et al. Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* junio de 2007;358(1):104-10. (18)

2.2. Agregación de Alfa Sinucleína

En la enfermedad de Parkinson, tres mutaciones de la proteína (A30P, E46K, A53T) así como multiplicaciones del gen SNCA que codifica la alfa sinucleína se relacionan con mayor formación de protofibrillas y con EP familiar autosómica dominante (22). La agregación de alfa sinucleína en los cuerpos de Lewy puede ser no covalente o covalente, en la agregación no covalente se observan fibrillas de alfa sinucleína como bastones de 5-10 nm de diámetro, insolubles que presentan una estructura beta helicoidal (23). Estudios *in vitro* indican que diversos factores, como la concentración de proteína y un pH más ácido, favorecen la formación de las fibrillas.(4)

En la agregación covalente se forman uniones cruzadas principalmente entre los residuos de tirosina de las moléculas. El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la formación covalente de enlaces cruzados, así como metales como el hierro que aceleran la formación de fibrillas amiloides.

2.3. Sistema Endocannabinoide

El sistema endocannabinoide está compuesto de receptores cannabinoides localizados en el cerebro de los mamíferos y a través de los sistemas nerviosos central y periférico; así mismo, se compone de cannabinoides endógenos que van a interactuar en dichos receptores. Este sistema se ha asociado en la regulación de varios procesos como la sensación de apetito, dolor, placer, aprendizaje, memoria. También se ha relacionado con la modulación de distintos procesos a nivel cardiovascular e inmunológico (24).

2.3.1. Receptores Cannabinoides

Los dos principales receptores que se han descrito en el sistema endocannabinoide son los receptores tipo CB1 y CB2 pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas de clase AG (GPCR) (25). El primer receptor que se descubrió fue CB1, que se localiza principalmente en el cerebro, sin embargo, se ha demostrado su expresión en órganos periféricos como el hígado, pulmones, músculos, tracto gastrointestinal y órganos reproductivos. Por otra parte, el CB2 se

encontró primeramente en células del sistema inmunitario con mayor expresión en linfocitos B y menor en linfocitos T, aunque estudios posteriores han demostrado su presencia en fibras nerviosas de la piel y células óseas como los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos. (26). Ambos receptores se encuentran en común en el sistema inmunes, hígado, medula ósea y células pancreáticas para CB1 y células secretoras de somatostatina del páncreas para CB2. (Figura 2).

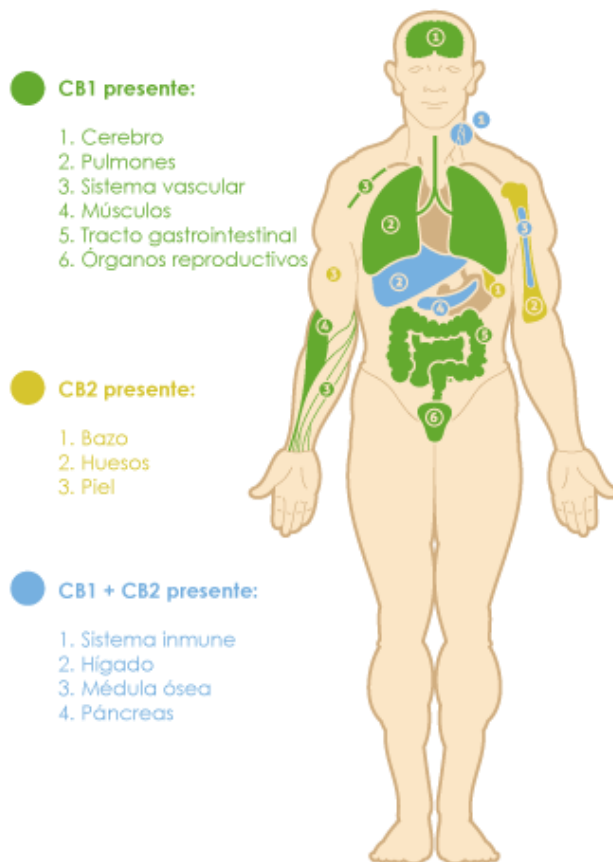


Figura 2. Distribución de receptores cannabinoides en el cuerpo humano.

Tomado de: Fundación CANNA. El Sistema Endocannabinoide [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide>. (24)

2.3.2. Endocannabinoides

Los endocannabinoides son ácidos grasos polinsaturados de cadena larga derivados de fosfolípidos de membrana, específicamente del ácido araquidónico. Los principales endocannabinoides son la anandamida (AEA) y el 2-araquidilglicerol (2-AG), siendo éste último el más abundante en el cerebro, el cual se genera a partir de fosfolípidos de membrana plasmática, como la anandamida y su degradación se debe principalmente a la acción del monoacilglicérido lipasa (MAGL) (24),

mientras la anandamida se forma por la escisión de un precursor de fosfolípido, la N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) y su degradación se debe a la acción de MAGL o de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (26). En el nematodo *C. elegans* se ha descrito que 2-AG y AEA activan un receptor cannabinoide denominado *NPR-19*, que modula el comportamiento, además, 2-AG estimula la liberación independiente de NPR-19 tanto de serotonina (5-HT) como de dopamina (DA) para modular los comportamientos locomotores a través de una vía de señalización. (16,27)

2.4. Fitocannabinoides

Los fitocannabinoides son cannabinoides que provienen de la planta de *cannabis sativa*, originaria de Asia y perteneciente a la familia Cannanaceae, es una planta herbácea anual de hasta 4 m de alto, hojas palmadas estipuladas, cada una compuesta de 3 a 9 folíolos angostos y tricomas glandulares (28), donde según estudios se sintetizan y almacenan principalmente los fitocannabinoides y a su vez, se encuentran la mayoría de terpenos que son los encargados de otorgar el aroma a cada especie de la planta. Se han descrito tres tipos de tricomas glandulares: Bulbosos, capitados sésiles y capitados pedunculados y se ha encontrado que en las plantas macho se presenta un cuarto tipo, el tricoma glandular de anteras, que como su nombre lo indica solo se encuentra en las anteras de la planta. (29). Se han descubierto alrededor de 70 fitocannabinoides, incluyendo sus formas ácidas, neutras y demás transformaciones; la planta solo sintetiza y acumula los cannabinoides en forma de ácidos cannabinoideos y se descarboxilan gradualmente en el proceso de secado y almacenaje hasta alcanzar su forma final, por ejemplo el cannabidiol (CBD) (28,29)

2.4.1. CBD

El cannabidiol (CBD) es un fitocannabinoide no psicoactivo derivado de la planta de *cannabis sativa* y en la actualidad uno de los más estudiados debido a sus propiedades: analgésicas, ansiolíticas, antitumorales, antiinflamatorias, antioxidantes y neuroprotectoras (30), estas tres últimas en particular han llevado a los científicos a establecer su eficacia en modelos de enfermedades neurodegenerativas; como la Enfermedad de Parkinson, donde se ha encontrado el efecto neuroprotector en modelos inducidos con 6-hidroxi-dopamina, evidenciando la reducción en

el deterioro dopaminérgico y el estrés oxidativo (31). Presenta una baja afinidad en los receptores CB1 y CB2, sin embargo, se ha demostrado que también puede actuar sobre el receptor vaniloide potencial transitorio tipo 1 (TPVR-1), ya que muestra una acción similar a la provocada por la capsaicina, un agonista natural del TPVR-1 (31).

2.5. *Caenorhabditis elegans* como modelo de agregación de alfa sinucleína

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) es un nematodo de aproximadamente 1 mm de longitud y cuerpo transparente, que gracias a sus cualidades se ha convertido en uno de los modelos biológicos experimentales más usado a nivel mundial, entre ellas, cuenta con un sistema nervioso simple y conservado, bien descrito compuesto por 302 neuronas (7). Así mismo, presenta un ciclo de vida corto, lo que permite la obtención de resultados en poco tiempo, comparados con otros modelos. En este sentido, el tiempo de desarrollo de huevo a larva L1 es de aproximadamente 9 horas, seguido por el estadio L1 a L2 con un tiempo de 12 horas, de L2 a L3 y de L3 a L4, con 8 horas aproximadamente entre estadio, (32) de L4 a la larva adulto joven alrededor de 10 horas después, y por último, llega al estadio adulto 8 horas después, donde desarrolla un sistema reproductor maduro y funcional, como se muestra en la Figura 3. Adicionalmente, su vida útil esta entre 2 y 3 semanas, lo que facilita su estudio, así mismo, su manipulación es sencilla, y en comparación a otros modelos los costos de mantenimiento y procedimientos son bajos, presenta gran conservación genética entre los mamíferos, tanto a nivel celular como molecular y es por esta razón que se han logrado crear cepas transgénicas como modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la EP. (33,34).

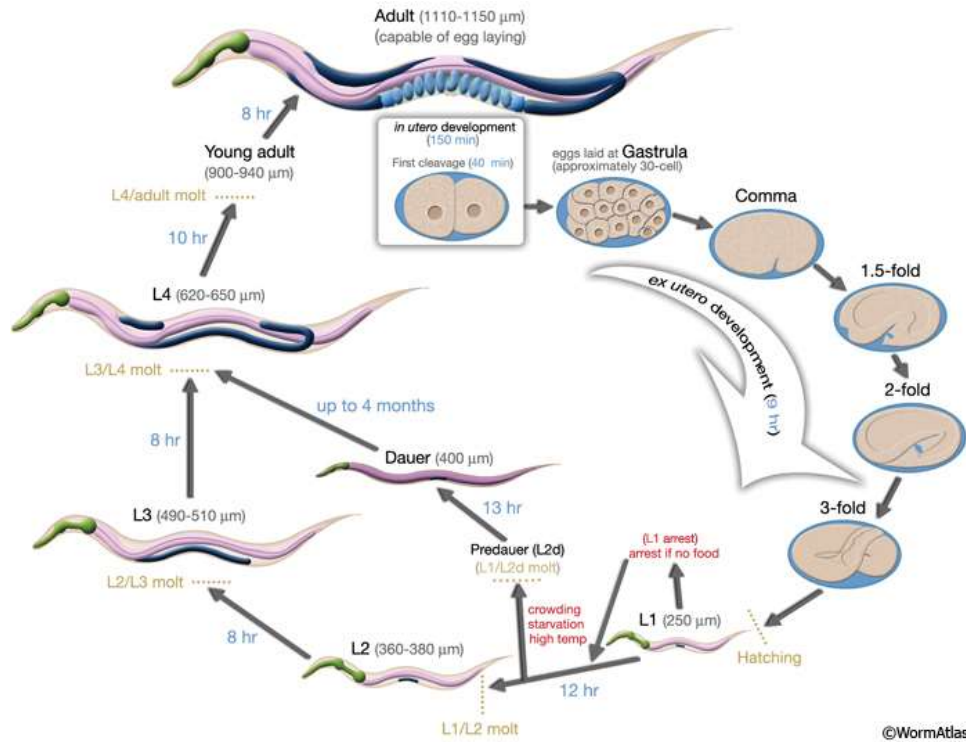


Figura 3. Ciclo de vida *C. elegans*. Se toma como 0 minutos el tiempo de la fertilización. Los números en azul a lo largo de las flechas indican la cantidad de tiempo que el nematodo pasa en una determinada etapa. La primera escisión se produce a los 40 minutos aproximadamente. Post fertilización, los huevos se encuentran afuera 150 minutos aproximadamente, y durante la etapa gástrula, la longitud del animal en cada etapa se marca junto al nombre de la etapa en micrómetros. Tomado de: Altun ZF, Hall DH. WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction. Herndon LA, editor. WormAtlas [Internet]. junio de 2006 [citado 24 de septiembre de 2021]; Disponible en: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>. (32)

En este sentido, la cepa NL5901 ha sido un ejemplo de estas cepas transgénicas (pkIs2386 [unc-54p::alphasynuclein::YFP + unc-119(+)]), la cual contiene el tras gen pkIs2386, que codifica para la alfa sinucleína humana marcada con YFP (Proteína amarilla fluorescente), bajo el promotor unc 54, que dirige la expresión a las células del músculo de la pared corporal, lo que permite la detección visual de la presencia de agregados de alfa sinucleína a través de un microscopio de fluorescencia. (14).

3. Diseño metodológico

Este es un estudio piloto exploratorio, basado en un diseño descriptivo y experimental exponiendo a los nematodos *in vivo* con el tratamiento (CBD). La hipótesis nula (H_0) implica que no se

presenta ningún efecto producto del CBD sobre las características en estudio. La hipótesis alterna (H_a) implica que se produzca al menos un efecto del CBD sobre dichas características.

El objetivo planteado fue evaluar el efecto del CBD de *Cannabis sativa*, en la cepa NL5901 y N2 Bristol de *Caenorhabditis elegans*, para dar cumplimiento al mismo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Describir la esperanza de vida y movilidad en las cepas de *C. elegans*.
2. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre la esperanza de vida y movilidad de la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.
3. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre los agregados de alfa sinucleína en la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.
4. Evaluar el efecto del CBD sobre el estrés térmico en las cepas de *C. elegans*.

3.1. Universo, población, muestra

Universo: Nematodo *Caenorhabditis elegans*

Población: Cepa silvestre N2 Bristol y NL5901

Muestra: Nematodos de cada cepa

3.2. Hipótesis, variables, indicadores

Hipótesis: El Cannabidiol (CBD) tiene un efecto sobre la movilidad, longevidad y resistencia al estrés térmico y la agregación de alfa sinucleína en la cepa NL5901 de *C. elegans*.

Variable Independiente: Cannabidiol

Variable Dependiente: Supervivencia, movilidad, tolerancia al estrés térmico y agregación de alfa sinucleína.

Indicadores: Ver tabla 1

Tabla 1. Variables Dependientes e indicadores.

Variable Dependiente	Indicador
Supervivencia	Esperanza de vida

Movilidad	Numero de ondas / 30 segundos
Tolerancia al estrés térmico	Esperanza de vida
Agregación de alfa sinucleína	Intensidad de Fluorescencia

3.3. Técnicas y procedimientos

3.3.1. Obtención de CBD

El Cannabidiol (CBD) número CAS: 13956-29-1, se adquirió de la compañía Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) y fueron importados por Quasfar M&S S.A. en presentación de 5 mg, con una pureza $\geq 98\%$. Posterior a la recepción en el laboratorio de Investigación del Grupo Biotecnología y Genética UCMC, de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá (Colombia), fueron almacenados a -20°C , hasta la realización de los ensayos en el laboratorio.

3.3.2. Obtención de las cepas de *C. elegans* y *E. coli* OP50

Las cepas de *C. elegans* N2 Bristol y NL5901 junto con la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50, fueron donadas por la Dra. Ann Rougvie Ph.D. Directora del CGC (Centro de Genética Caenorhabditis), y el Dr. Aric Daul PhD. Curador del C.G.C.

3.3.3. Mantenimiento de *C. elegans* cepa silvestre N2 Bristol y NL5901

La preparación del medio NGM (Nematode Growth Medium), utilizado para el crecimiento de nematodos, se realizó de acuerdo con el protocolo estandarizado previamente en el grupo de Biotecnología y Genética UCMC, en el cual se utiliza 3 gr de NaCl, 17 gr de Agar y 2.5 gr de peptona disueltos en 975 ml de agua destilada, para ser autoclavados por una hora, dejar enfriar y posteriormente enriquecerse con 1ml de CaCl_2 1M, 1ml de colesterol y 25 ml de buffer KPO_4 1M pH 6.0 (Ver Anexo 1).

La solución de NGM se sirvió en placas de Petri en condiciones de esterilidad, llenando las cajas con 20 ml de medio aproximadamente. La cepa de *E. coli OP50* se cultivó en agar LB o en caldo LB, se deja incubar por 24 horas a 37°C y se pueden mantener a 4°C durante 1 o 2 meses.

3.3.4. Reactivación Cultivo de *C. elegans* cepa silvestre N2 Bristol y NL5901

Para la reactivación del cultivo se traspasaron fragmentos de agar de las cajas donde transportaron las cepas a cajas NGM completamente nuevas y con *E. coli OP50*, incubadas a 20°C hasta la reactivación de su ciclo de vida con el consecuente aumento poblacional.

3.3.5. Sincronización

La sincronización se hace con el objetivo de tener todas las larvas de *C. elegans* en el mismo estadio larvario al momento de realizar el ensayo. A continuación, se describe el procedimiento: Inicialmente, lavar las cajas (con nematodos en estado de gravidez) con Buffer M9 pH 6.0 estéril (3 ml aproximadamente) aspirando y botando con pipeta durante 5 minutos, para desprender el mayor número de nematodos. El producto lavado se pone en tubos eppendorf de 1,5 o 2 mL de acuerdo con el volumen, después, centrifugar (4000 rpm por 3 minutos) para recuperar en el pellet los nematodos.

Eliminar el sobrenadante con pipeta, sin retirar la fracción orgánica suspendida en la parte inferior del tubo. agregar 1 ml de la solución de Bleaching (hipoclorito/NaOH), con este tratamiento se rompen los nematodos y se desprenden los huevos, además se eliminan microorganismos, (se puede adicionar 1 ml o hasta llegar arriba del eppendorf) y agitar vigorosamente (NO usar vórtex) con la mano por 4 minutos (exactos).

Luego, centrifugar (4000 rpm por 3 minutos) y eliminar el sobrenadante con pipeta, sin retirar la fracción orgánica suspendida en la parte inferior del tubo (aproximadamente 1800 uL). Adicionar Buffer M9, (1800 uL o hasta llegar arriba del eppendorf); con el fin de diluir la solución de Bleaching. Centrifugar (4000 rpm a 4 °C por 3 minutos) y eliminar el sobrenadante con pipeta, sin

retirar la fracción orgánica suspendida en la parte inferior del tubo. Realizar dos lavados con Buffer M9 (hasta arriba del tubo). Centrifugar 4000 rpm, por 3 minutos.

Finalmente, los huevos se resuspenden en 200 uL de buffer M9, o en el menor volumen posible. Los huevos sincronizados también se pueden colocar en cajas de Petri con medio NGM con o sin comida, dependiendo del ensayo. Los huevos se ponen en placas sin comida para que eclosionen las L1 y no puedan seguir creciendo (quedan sincronizadas en éste estadio luego de un día).

Al día siguiente las L1 se ponen en una placa con comida y quedan sincronizadas. Por último, revisar la presencia de huevos en las cajas de cultivo con medio NGM, e incubar a temperatura ambiente. (Ver Anexo 2)

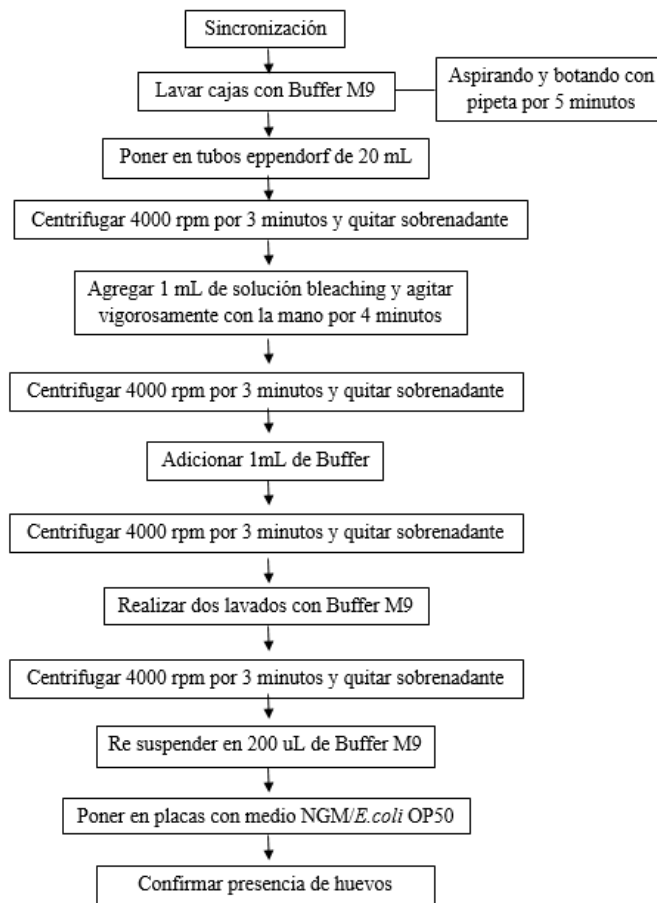


Figura 4. Protocolo sincronización.

3.3.6. Determinación de longitud del cuerpo

Para el ensayo de longitud del cuerpo los nematodos sincronizados en el estadio larvario L1 se cultivaron en cajas de medio NGM con *E.coli OP50* hasta llegar a estadio larvario L4, en esta etapa de desarrollo se transfieren de 10 a 15 nematodos en una caja de NGM/*E.coli OP50*, se les provoca parálisis del cuerpo lavando con 4000 uL de Levamisol 1mM + 1000 uL de buffer M9 y realizar lavados por aproximadamente 4 minutos, agregar en un tubo eppendorf la solución y esperar de 30 a 45 minutos.

Posterior al tiempo de incubación, se retira una gota de muestra (tomar del fondo del tubo) en una lámina y colocar laminilla (Ver Anexo 3) observar al microscopio con reglilla milimetrada previamente calibrada y tomar fotos con objetivo de 100X, analizar las fotos mediante el programa ImageJ, donde inicialmente se debe establecer la escala con una medida conocida, en este caso la reglilla, posteriormente se selecciona el nematodo y se mide respecto a la escala previamente establecida (Figura 5) (2) cada uno de los resultados se debe multiplicar por 1.0, que es el factor de calibración del objetivo 100X en el que se tomaron las fotos.

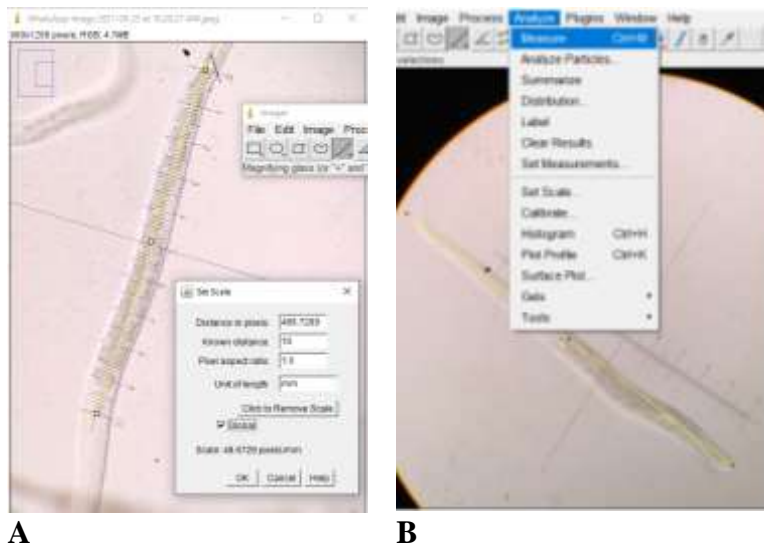


Figura 5. Medición de Longitud con ImageJ. Fotografías del análisis de longitud por el programa ImageJ, donde se visualiza (A) medición de la reglilla y (B) medición del nematodo.

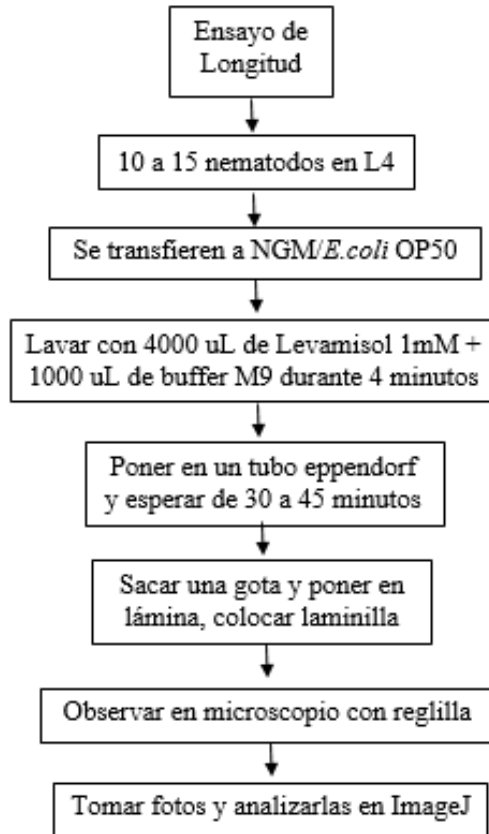


Figura 6. Protocolo Ensayo de Longitud.

3.3.7. Elaboración de las soluciones de trabajo

El CBD, en presentación de 5 mg se adquirió de Cayman Chemicals y se disolvió en 3.97 ml de etanol para obtener una solución madre de 4 mM (6) a partir de la formula $V1 * C1 = V2 * C2$. De la solución madre se toman 750 uL y se adicionan 250 uL de medio K para obtener la solución 1 (3000 uM), a partir de esta realizar diluciones seriadas agregando 100 uL de la solución y 900 uL de medio K, hasta llegar a concentraciones de 300 uM, 30 uM, 3 uM, 0.3 uM (7).

3.3.8. Dosis Letal 50 aguda

Para realizar el ensayo se debe usar una caja de cultivo celular de 24 pozos fondo plano (200 uL en cada uno), donde se deben colocar 10 larvas en estadio larvario L4 en cada pozo de estudio, se distribuyen de la siguiente manera (Anexo 4).

Control medio K: Colocar 200 uL de medio K sin suplementar y sin comida (15).

Control solvente: Inicialmente poner en un pozo 112 uL de etanol y agregar 38 uL de medio K, para llegar a un volumen de 150 uL y concentración final de 75% de etanol.

Muestras: Colocar 200 uL de cada solución a evaluar, ejemplo: solución 1, 2, 3, 4, 5.

Se deja en incubación a 20°C en oscuridad, y se evalúa la supervivencia de los nematodos (respuesta positiva al movimiento y a la estimulación con el asa de pick de planito) a las 0, 3 y 6 horas de incubación en el tratamiento, leer en el mismo orden que se montó el ensayo.

3.3.9. Ensayo de longevidad y movilidad sin tratamiento

Ensayo de longevidad

Para el ensayo de longevidad, se usan de 10 a 15 nematodos sincronizados en estadio larvario L4 y se transfieren a cajas de medio NGM con *E. coli OP50* inactivada al calor, diariamente se pasan estos nematodos a caja de cultivo NGM con *E. coli OP50* y se determina el número de larvas vivas y muertas (si responden al estímulo con el pick, se determinan como vivas) hasta finalizar su periodo reproductivo, con el fin de evitar mezcla de generaciones.

Posteriormente, solo se transfirieren cada dos días y se espera hasta que la última larva no responda al estímulo, en ese momento se da por terminado el ensayo.

Ensayo de movilidad

Para el ensayo de movilidad realizaron pases de cada cepa a 2 cajas con *E.coli OP50*, 4 días después realizar la sincronización, cuando los nematodos se encuentren en estadio L4 se transfieren de a 10 larvas a cajas con medio NGM/*E.coli OP50* y se procede a contar el número de ondas que ejecuta cada larva durante 30 segundos (se estimula el cuerpo con el pick de platino, cada onda corresponde a una oscilación senoide iniciada en la cabeza del nematodo). El ensayo se realizará por triplicado, para cada cepa de estudio.

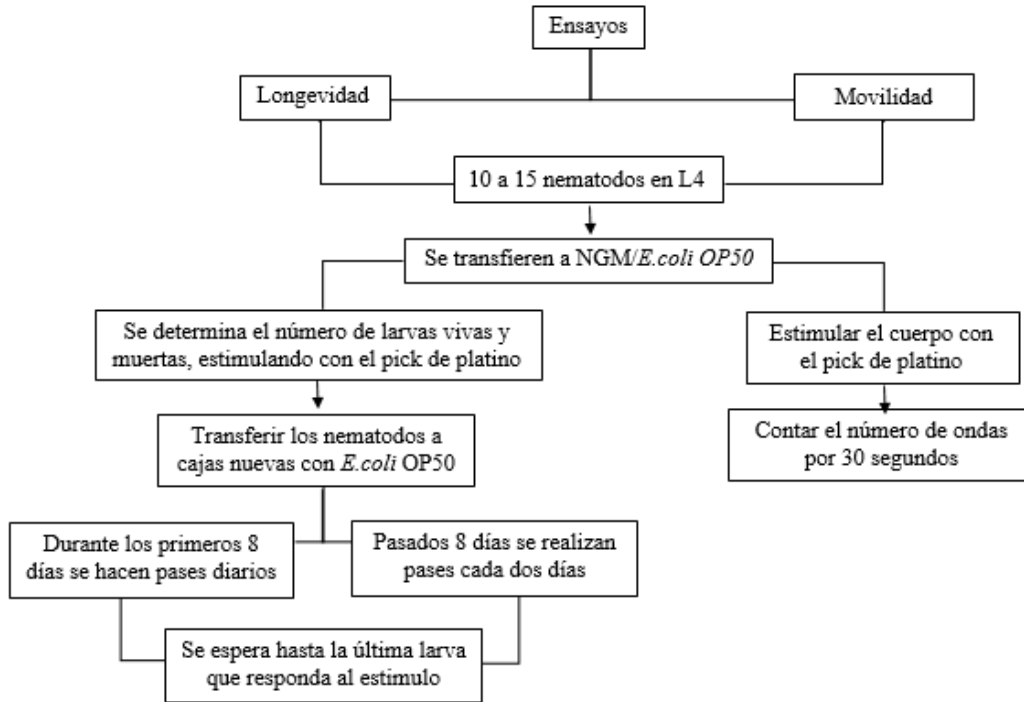


Figura 7. Protocolo Ensayo de Longevidad y Movilidad.

3.3.10. Ensayo de longevidad y movilidad bajo el tratamiento

Para los dos ensayos se preparan cajas con 2.4 ml de medio NGM, se agregan 50 uL de *E.coli OP50* en suspensión (anexo 5) se deja secar por 2 horas y se agregan 100 uL de CBD a concentración de 750, 75 y 7.5 uM para alcanzar concentraciones en el medio de 30, 3 y 0.3uM, usando la formula $V1 * C1 = V2 * C2$ (anexo 6).

Para el ensayo de longevidad se transfieren de 10 a 15 nematodos sincronizados en estadio larvario L4 de las dos cepas a las cajas preparadas anteriormente, y se sigue el mismo procedimiento del ensayo de longevidad descrito previamente.

Para el ensayo de movilidad se transfieren de 10 a 15 nematodos sincronizados en estadio L4 de las dos cepas a las cajas preparadas anteriormente, se dejan los nematodos por 24 horas y se procede a contar el número de ondas que ejecuta cada larva durante 30 segundos. El ensayo se realiza por triplicado por cada solución de trabajo.

3.3.11. Determinación de agregados de alfa sinucleína

Realizar pases de cada cepa a 4 cajas de Petri de 3.5ml NGM con *E.coli OP50*, 4 días después realizar la sincronización. Cuando los nematodos se encuentren en estadio L4 se transfieren a cajas que contienen 2.4 mL de medio NGM con 50uL de *E.coli OP50* y 100 uL de CBD a concentración de 750, 75 y 7.5 uM para alcanzar concentraciones en el medio de 30, 3 y 0.3 uM, se incuban por 24 horas a 20°C y se inmovilizan adicionando a la caja de petri 4000 uL de Levamisol 1mM + 1000 uL de buffer M9 y realizar lavados por aproximadamente 4 minutos, agregar en un tubo eppendorf la solución y esperar de 30 a 45 minutos, sacar una gota de muestra (tomar del fondo del tubo) en una lámina y colocar laminilla, leer al microscopio. Se observan y analizan los nematodos sin tratamiento (control) y tratados con las diferentes concentraciones de CBD usando un filtro de barrera amarilla, las imágenes son analizadas con el programa ImageJ cuantificando la intensidad de fluorescencia.

3.3.12. Determinación de la tolerancia al estrés térmico

Para evaluar la viabilidad del nematodo ante el estrés térmico estos se deben sincronizar y cultivar en cajas con medio NGM/*E.coli OP50*, cuando alcanzan el estadio L4 se transfieren de 10 a 15 nematodos a cajas con NGM/*E.coli OP50* y se someten a 37°C durante 8 horas. La viabilidad es determinada estimulando a los nematodos con el pick de platino, si no responden se consideran muertos. Este ensayo se realiza con 30 nematodos por triplicado.

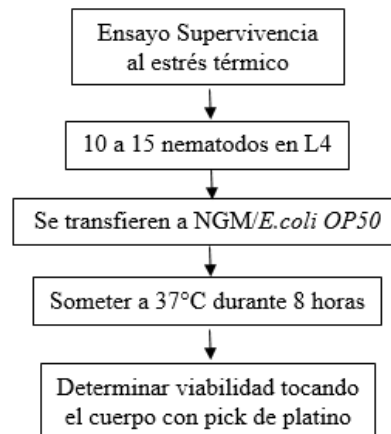


Figura 8. Protocolo Ensayo Tolerancia al estrés térmico.

3.3.13. Determinación de la tolerancia al estrés térmico junto con el tratamiento

Se preparan cajas con 2.4 ml de medio NGM, se agregan 50 uL de *E.coli OP50* en suspensión (anexo 5), se deja secar por 2 horas y se agregan 100 uL de CBD a concentración de 750, 75 y 7.5 uM para alcanzar concentraciones en el medio de 30, 3 y 0.3uM (anexo 6), se transfieren 10 nematodos sincronizados en estadio larvario L4 por cada cepa, se dejan allí por 24 horas y posteriormente son sometidos a 37°C durante 8 horas, se evalúa la viabilidad tocando a los nematodos con el pick de platino, si no responden se consideran muertos.

3.3.14. Análisis Estadístico

Los datos son analizados y graficados con el programa GraphPad Prism 9.3.1, analizando si los datos presentan una distribución normal o no normal y en base a esto realizar un análisis con pruebas paramétricas o no paramétricas según sea el caso. Para contrastar las pruebas de hipótesis (H_0 y H_a) se consideran diferencias estadísticamente significativas en los estadísticos, cuyo valor de $p \leq 0.05$. Para analizar los ensayos de longevidad se realizó el test de Mantel Cox con el programa GraphPad Prism 9.3.1, donde se comparan las curvas de supervivencia entre los nematodos de cada cepa y cuando son expuestos los tratamientos con CBD.

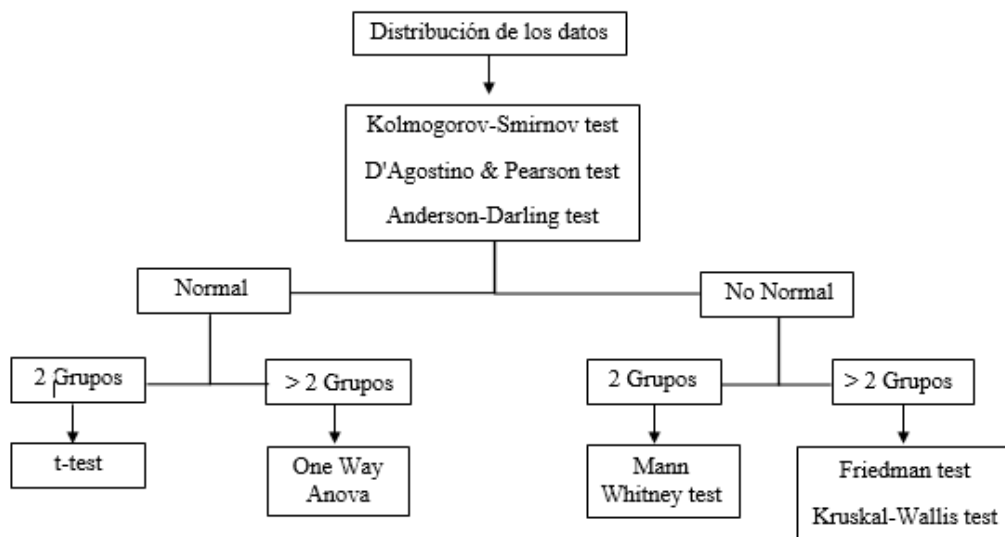


Figura 9. Esquema representativo del análisis estadístico.

4. Resultados

4.1. Congelación *E. coli* OP50

Se estandarizó un protocolo para la congelación de *E. coli* OP50 (Anexo 7), el cual se evaluó después de 30 días. Para esto se descongeló uno de los crioviales y se agregó en 20mL de caldo LB, se dejó en agitación constante en shaker por 24 horas a 37°C.

Pasado este tiempo se realizó siembra por agotamiento en agar LB y MacConkey, se incubó por 36 horas a 37°C, pasado este tiempo se observó crecimiento en los dos agares, se tomó muestra del agar MacConkey y se realizó Tinción de Gram, donde se encontraron bacilos Gram positivos correspondientes con la morfología de *E. coli*, así mismo, se realizó prueba de motilidad la cual fue negativa, lo que indica que el protocolo fue desarrollado con éxito (Figura 10).

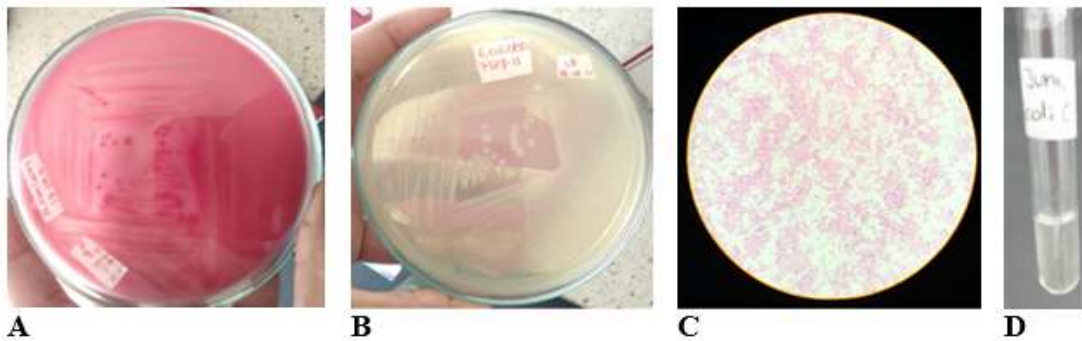


Figura 10. Crecimiento de *E. coli* OP50. Se observa crecimiento en (A). Agar MacConkey (B). Agar LB. (C). Coloración de Gram, bacilos gram negativos (D). Prueba motilidad negativa.

4.2. Caracterización de las cepas

4.2.1. Identificación de los estadios larvarios

Inicialmente se realizó la sincronización de cada cepa, donde los huevos obtenidos se colocaron en medio NGM con *E. coli* OP50, se esperó por un tiempo aproximado de 8 horas que es lo que el nematodo tarda en pasar del estadio embrionario al estadio larvario L1, el cual se caracteriza por

su pequeño tamaño que no permite diferenciar ningún órgano interno, a su vez presenta un movimiento muy rápido en comparación con los demás estadios.

Doce horas después los nematodos se encuentran en estadio larvario L2, en el cual se presenta un pequeño alargamiento a nivel interno y pueden diferenciar algunos órganos internos. Al cabo de 8 horas se pudo evidenciar que las larvas aumentan su tamaño y se la diferenciación de los órganos internos es más notoria, se considera que estaban en estadio Larvario L3.

Aproximadamente 6 horas más tarde, se pueden apreciar más claramente las estructuras internas del nematodo, como la vulva y el esófago, aquí se consideran como estadio larvario L4 (Figura 11), pasadas 10 horas alcanzaron su estadio Adulto Joven, donde por ultimo da inicio a su etapa reproductiva y madurez 8 horas después, dando inicio a un nuevo ciclo. No se encontraron diferencias en el ciclo de vida entre cada una de las cepas evaluadas.

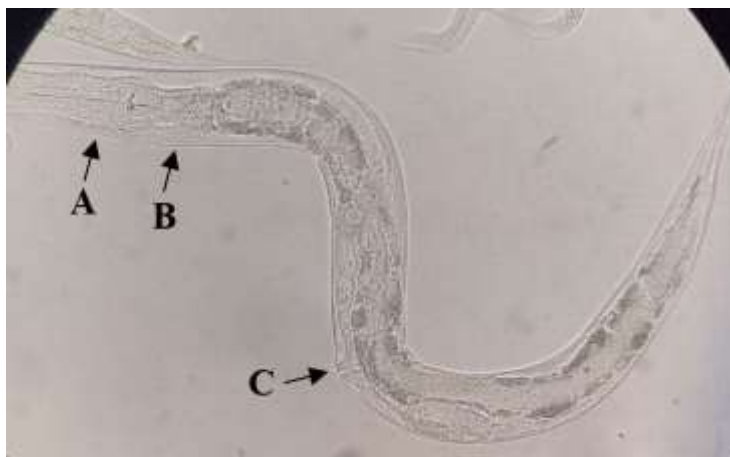


Figura 11. Nematodo en estadio larvario L4. Se observan partes del cuerpo en objetivo de 20 X como (A) La faringe, (B) El esófago y (C) La vulva.

4.2.2. Identificación fluorescencia NL5901

Se realizó la identificación de la fluorescencia para la cepa NL5901 el mismo día de la recepción al laboratorio, por lo que se realizó un pase en una caja con medio NGM/*OP50* y se esperaron 3 días, tiempo suficiente para obtener larvas jóvenes. Luego se agregaron 4000 uL de Levamisol 1mM + 1000 uL de buffer M9 y se realizaron lavados por aproximadamente 4 minutos (Anexo 3),

se agregó el lavado en un tubo eppendorf y se espera de 30 a 45 minutos, después se toma una gota del fondo del tubo y se coloca en una laminilla, por último, se observó al microscopio de fluorescencia. Como se evidencia en la Figura 12, los nematodos presentan en la pared muscular del cuerpo la presencia de agregados de alfa si nucleína marcados con YFP. Para la cepa N2 no se evidencia fluorescencia, ya que no presenta agregados debido a que no es una cepa transgénica en comparación de NL5901.

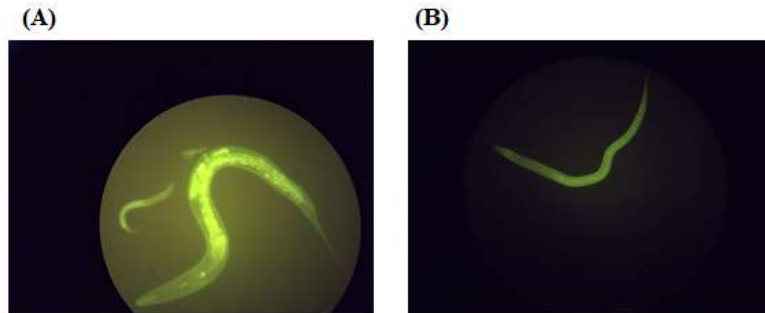


Figura 12. Presencia agregados alfa sinucleína Se observan nematodos de la cepa NL5901 con presencia de agregados proteicos en microscopio de fluorescencia, (A) Estadio Adulto, en objetivo 20 X. (B) Estadio L3, en objetivo 10 X.

4.2.3. Longitud

Para el determinar de longitud de los nematodos, se esperó hasta que alcanzaran su etapa reproductiva, posterior a la sincronización de las cepas. Después, se inmovilizaron con levamisol, como se describió previamente en el procedimiento para identificar la fluorescencia de la cepa NL5901. Se tomaron fotografías de 10 nematodos por cada cepa, para su análisis se empleó el software ImageJ 1.53k y se multiplicaron los resultados por 1.0 (que es el factor de calibración para el objetivo de 100X). Se observó que el promedio de longitud para la cepa N2 Bristol fue de 1.32 mm y con desviación estándar $SD=0.2201$, mientras que para la cepa NL5901 la longitud promedio fue de 1.29 mm con una desviación estándar $SD=0.2514$. No se encontró diferencia significativa en el tamaño de los nematodos entre las dos cepas (Figura 13 y 14).

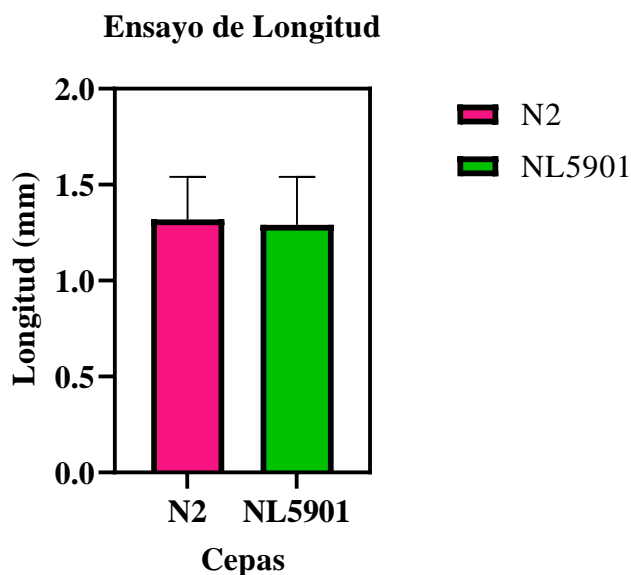


Figura 13. Ensayo de Longitud. Comparación de la longitud entre nematodos de la cepa N2 (color fucsia) y NL5901 (color verde). Se expresa la media y desviación estándar. La distribución normal de los datos se analizó con el test de Anderson-Darling. Los datos se analizaron utilizando t-test $p = 0,7797$. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

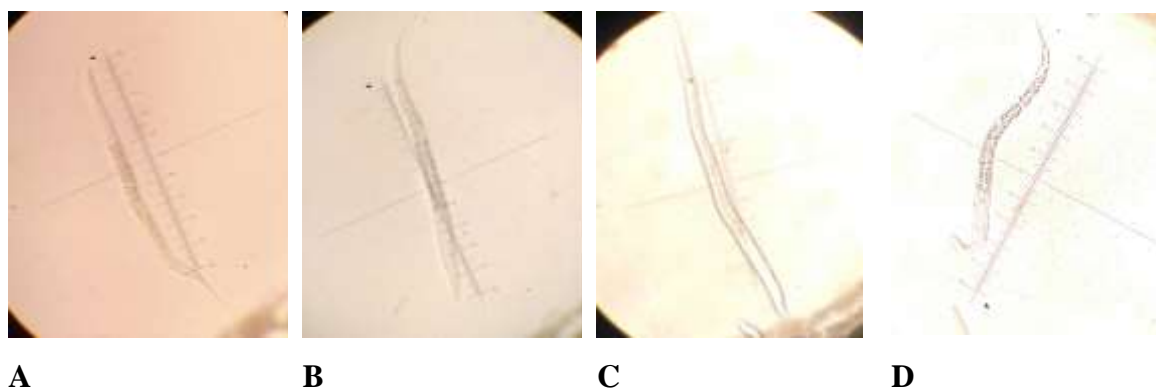


Figura 14. Nematodos observados al microscopio con reglilla. Se observan nematodos inmovilizados con levamisol 1mM en microscopio con reglilla con objetivo de 100X (A, B) Cepa N2 Bristol. (C, D) Cepa NL5901.

4.3. Dosis Letal 50

Se realizó el ensayo de DL50 empleando como control Medio K, Etanol al 0.75%, y 5 soluciones de CBD a concentraciones de 0.3, 3, 30, 300 y 3000 μM , evaluando la supervivencia de las larvas a la hora 0, 3 y 6, tomando como vivas las que respondían al estímulo con el pick de platino, el

ensayo se desarrolló por triplicado. Se encontró que para las concentraciones de 300 y 3000 μM en las dos cepas los nematodos se paralizaban a los pocos segundos de colocar el CBD para las dos cepas incluidas en el estudio.

Se observó en la cepa NL5901 un 100% de supervivencia para las soluciones de 0.3, 3 y 30 μM , medio K y etanol 0.75% respecto a la cepa N2 Bristol (Figura 15 y 16). El análisis de normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el análisis de la supervivencia a la 0, 3 y 6 de incubación por el test de Friedman se encuentran en la tabla No 2. En ninguno de los ensayos para las dos cepas se observa que las concentraciones de 0.3, 3 y 30 μM , causen parálisis en el nematodo (Anexo 7).

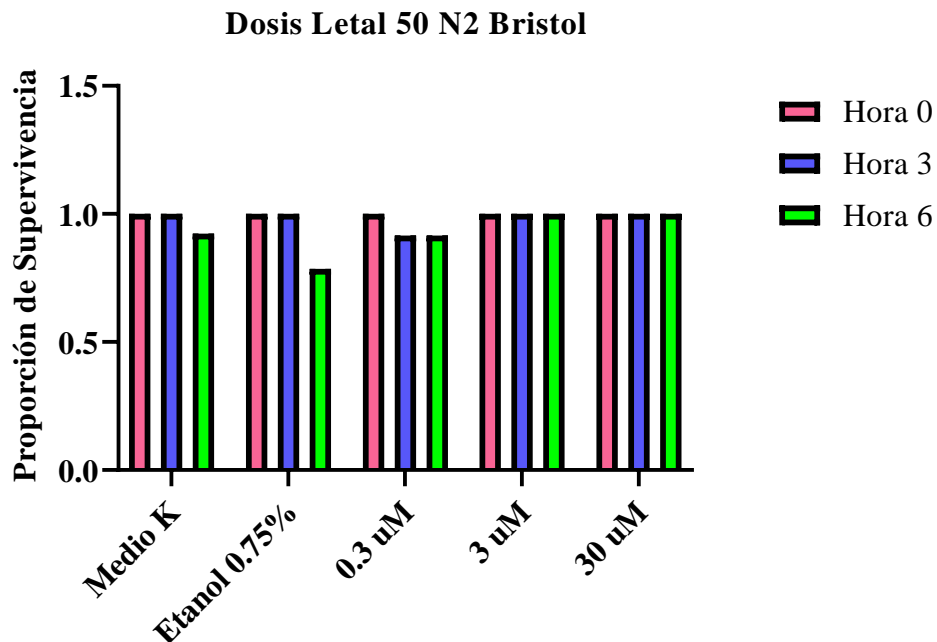


Figura 15. Ensayo de Dosis Letal 50 N2 Bristol. Se observa la proporción de supervivencia en nematodos de la cepa N2 Bristol tratados con Medio K, Etanol 0.75% y concentraciones de CBD a 0.3, 3 y 30 μM . Periodos de incubación a la hora 0 (color fucsia) hora 3 (color azul) y hora 6 (color verde). La distribución normal de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se analizaron utilizando el test de Friedman $p = 0,2222$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

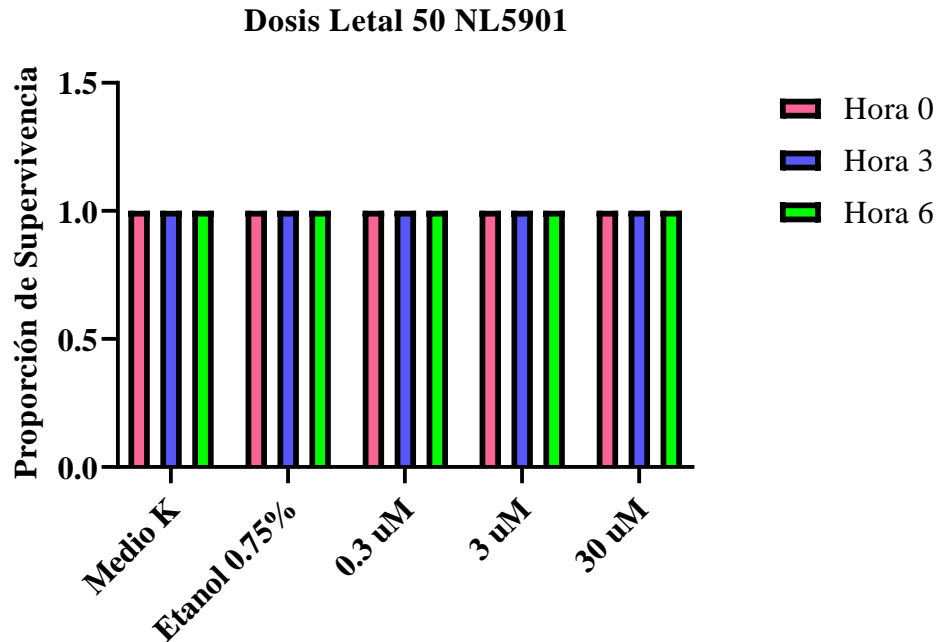


Figura 16. Ensayo de Dosis Letal 50 NL5901. Se observa la proporción de supervivencia en nematodos de la cepa NL5901 tratados con Medio K, Etanol 0.75% y concentraciones de CBD a 0.3, 3 y 30 uM. Periodos de incubación a la hora 0 (color fucsia) hora 3 (color azul) y hora 6 (color verde). La distribución normal de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se analizaron utilizando el test de Friedman $p > 0,9999$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Tabla 2. Análisis Dosis Letal 50

Test de Normalidad						
Kolmogorov-Smirnov test	N2			NL5901		
Valor de p	<0,0001	0,0005	>0,1000	<0,0001	<0,0001	<0,0001
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	No	No	Si	No	No	No
Resumen del valor p	****	***	Ns	****	****	****
Test de Friedman	N2			NL5901		
Valor de p				0,2222		
Las medias son diferentes significativamente ($p < 0.05$)				No		
Estadística de Friedman				4,667		
				>0,9999		

Test de normalidad y prueba no paramétrica de Friedman para las dos cepas en la determinación de la Dosis Letal 50. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

4.4. Ensayo de Longevidad

Para el ensayo de longevidad, después de sincronizadas las cepas se realizaron pases diarios a cajas de medio NGM/ *E. coli OP50*, los primeros 8 días ya que las larvas se encontraban en periodo reproductivo, y se debe evitar el cruce de generaciones para evaluar la supervivencia de los mismos nematodos desde el comienzo. Se tomaron 10 larvas por cada cepa de estudio, realizando el ensayo por triplicado; para la cepa N2 Bristol la mediana de supervivencia fue de 18 días, mientras que la cepa NL5901 fue de 16 días. (Figura 17). El análisis entre las dos cepas se realizó por el test de Mantel-Cox, donde no se encontró diferencia significativa entre el tiempo de supervivencia de las dos cepas incluidas en el estudio.

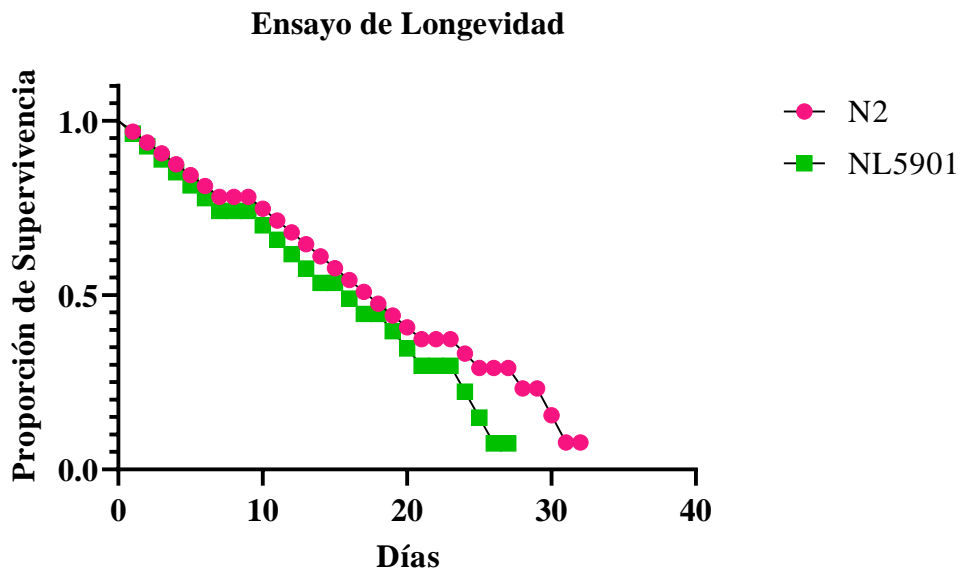


Figura 17. Ensayo de Longevidad. Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa N2 Bristol (color fucsia) y NL5901 (color verde). Los datos se analizaron utilizando el test de Mantel-Cox $p = 0,2956$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

4.4.1. Efecto del CBD sobre la longevidad

Para el ensayo de longevidad se transfieren de 10 a 15 nematodos en estadio adulto a cajas de 2.4 mL de medio NGM, 50 uL de *E. coli OP50* y 100 uL de CBD a concentraciones de 30, 3 y 0.3 uM, durante los primeros 8 días se realizaron pases diariamente a las cajas preparadas

anteriormente, las cuales se preparaban 1 día antes de realizar el pase. Después de este tiempo se realizaron pases cada 2 a 3 días.

Como resultados, para la cepa N2 Bristol con el tratamiento de CBD 0.3 uM la mediana de supervivencia fue de 18 días, con el tratamiento de CBD 3 uM de 30 días y con el tratamiento de CBD 30 uM de 28 días (Figura 18). Por otra parte, para la cepa NL5901 con el tratamiento de CBD 0.3 uM la mediana de supervivencia fue de 30 días, con el tratamiento de CBD 3 uM de 21 días y con el tratamiento de CBD 30 uM de 28 días (Figura 19). En la tabla No 3 se encuentra la comparación del control respecto a cada una de las concentraciones en las dos cepas incluidas en el estudio. En la cepa N2 se presentó aumento en el tiempo de supervivencia en las concentraciones de CBD 3 y 30 uM respecto al control, mientras que para la cepa NL5901 en las tres concentraciones se presentó aumento en el tiempo de supervivencia respecto al control.

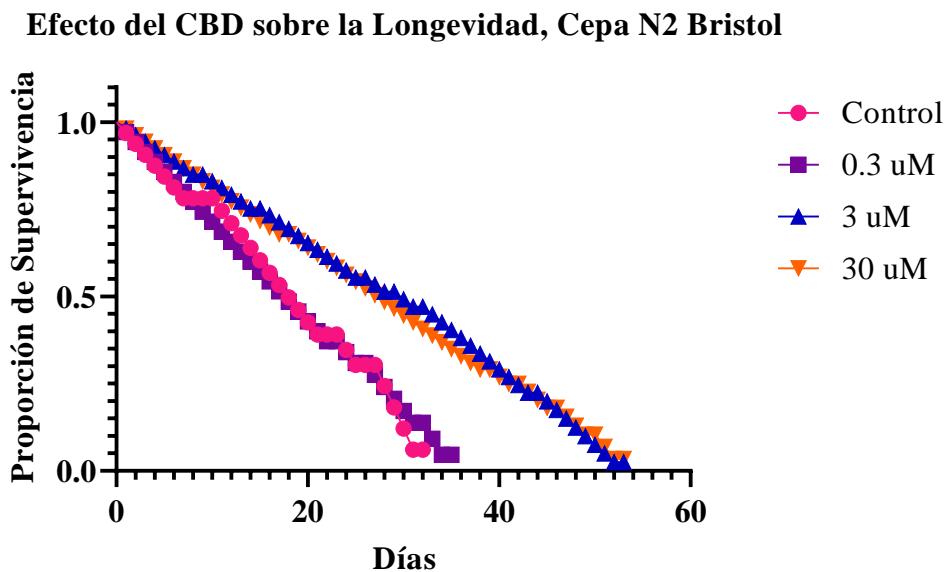


Figura 18. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa N2 Bristol. Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa N2 Bristol. Sin tratamiento (color fucsia) tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM (color morado), 3 uM (color azul) y 30 uM (color naranja). Los datos se analizaron utilizando el test de Mantel-Cox $p = 0,0003$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Efecto del CBD sobre la Longevidad, Cepa NL5901

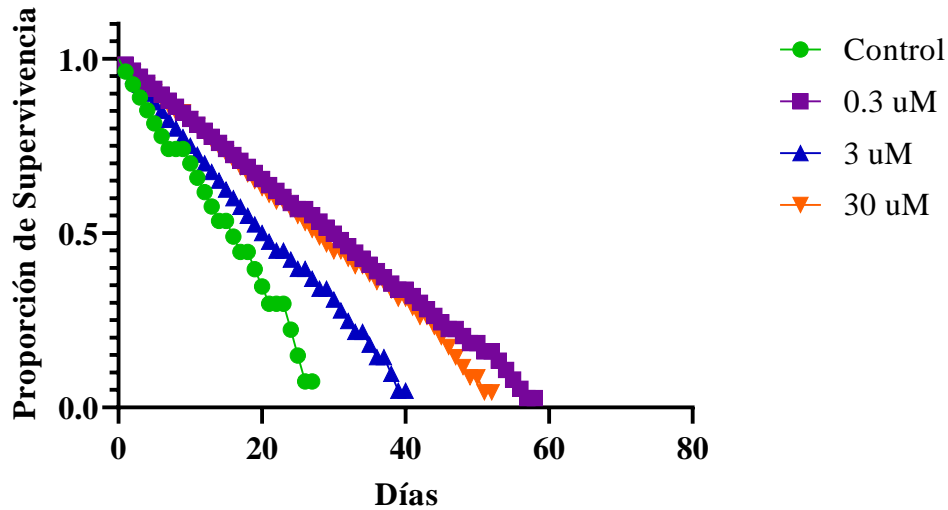


Figura 19. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa NL5901. Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa NL5901. Sin tratamiento (color verde) tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM (color morado), 3 uM (color azul) y 30 uM (color naranja). Los datos se analizaron utilizando el test de Mantel-Cox $p = 0,0002$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Tabla 3. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Longevidad

Control vs	N2			NL5901		
	0.3 uM	3 uM	30 uM	0.3 uM	3 Um	30 uM
Valor de p	0,8697	0,0007	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0015
Es significativo ?	No	Si	Si	Si	Si	Si

Comparación de la prueba de Mantel Cox para las dos cepas en el ensayo de longevidad. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

4.5. Ensayo de Movilidad

Para el ensayo de movilidad se tomaron 10 nematodos después de ser sincronizados y transferidos a medio NGM/*E.coli OP50*, con ayuda del pick de platino se estimula la cabeza o cola del gusano y se lee el número de ondas que hace durante 30 segundos, cada onda se cuenta como la oscilación sinusoide iniciada en la cabeza. Para cada cepa se realizó el ensayo por triplicado arrojando como resultados que para la cepa N2 Bristol se presentó un promedio de 15 ondas/30 segundos y una desviación estándar $SD=14.69$, mientras que para la cepa NL5901 un promedio de 13 ondas/30 segundos y una desviación estándar $SD=13.29$ (Figura 20). En la tabla No 4 se observa el análisis

descriptivo del ensayo, el análisis de normalidad por la prueba de D'Agostino & Pearson y el análisis de comparación entre las dos cepas por la prueba de Mann Whitney. Se observó disminución en el número de ondas de la cepa NL5901 en comparación con la cepa N2 Bristol.

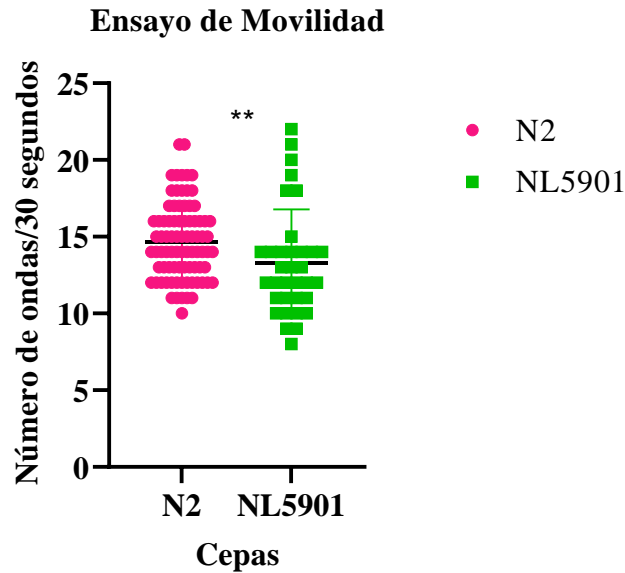


Figura 20. Ensayo de Movilidad. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa N2 (color fucsia) y NL5901 (color verde). Se expresa la media y desviación estándar. La distribución normal de los datos se analizó con el test de D'Agostino & Pearson. La comparación de los datos se analizó con el test de Mann Whitney $p = 0,0034$. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativas. ** Indica diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 4. Análisis Ensayo de Movilidad

	N2 Bristol	NL5901
Estadística Descriptiva		
Número de valores	83	34
Media	14,69	13,29
Desviación Estándar	2,469	3,495
Test de Normalidad		
Test D'Agostino & Pearson		
Valor de p	0,2098	0,0469
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	Si	No
Resumen del valor p	ns	*
Test de Mann Whitney		
Valor de p	0,0034	
Resumen del valor p	**	
¿Significativamente diferente ($P < 0.05$)	Yes	

Estadística Descriptiva, test de normalidad y prueba no paramétrica de Mann Whitney para las dos cepas en el ensayo de movilidad. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

4.5.1. Efecto del CBD sobre la Movilidad

Para el ensayo de movilidad se prepararon cajas de 2.4 mL de medio NGM, 50 uL de *E. coli OP50* y 100 uL de CBD a concentraciones de 30, 3 y 0.3 uM, se transfieren 10 nematodos en estadio L4, se incubaron 20 horas a 20°C, y con ayuda del pick de platino se estimula la cabeza o cola del gusano y se lee el número de ondas que hace durante 30 segundos.

Como resultados para la cepa N2 Bristol se presentó un promedio de 15 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=2.469$, para la concentración de 0.3 uM, de 17 ondas/30 segundos y desviación estándar $SD=3.164$, para 3 uM de 16 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=2.312$ y para 30 uM de 15 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=2.066$ (Figura 21).

Mientras que para la cepa NL5901 un promedio de 13 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=3.495$, para la concentración de 0.3 uM de 16 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=1.814$, para la concentración de 3 uM de 15 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=1.080$ y para la concentración de 30 uM de 14 ondas/30 segundos con desviación estándar $SD=2.860$ (Figura 22).

El análisis descriptivo del ensayo, el análisis de normalidad por la prueba de D'Agostino & Pearson y el análisis de comparación entre todos los datos por la prueba one-way ANOVA para la cepa N2 y Kruskal-Wallis para la cepa NL5901 se observan en la tabla 5 y 6 respectivamente. El análisis de cada concentración respecto al control analizado con la prueba Dunnett's multiple comparisons para la cepa N2 y NL5901 se observa en la tabla 7. No se encuentra diferencia significativa en el número de ondas de cada concentración (0.3, 3 y 30 uM) respecto al control en la cepa N2. Sin embargo, en la cepa NL5901, encontró aumento en el número de ondas/30 segundos, en el grupo de nematodos tratados con CBD 0.3 uM respecto al control.

Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa N2 Bristol

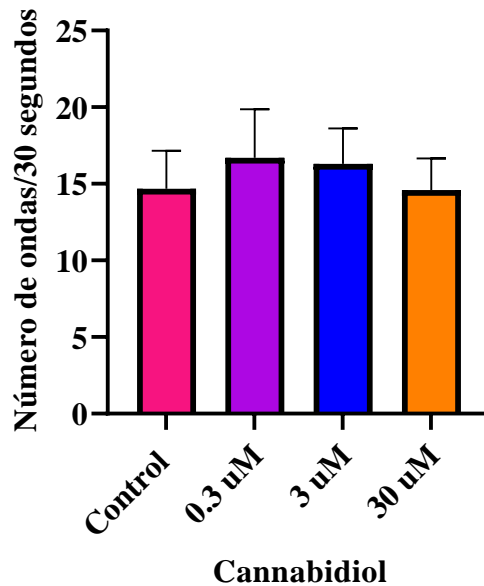


Figura 21. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa N2 Bristol. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa N2 sin tratamiento (color fucsia) tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM (color morado), 3 uM (color azul) y 30 uM (color naranja). Se expresa la media y desviación estándar. La distribución normal de los datos se analizó con el test de D'Agostino & Pearson. La comparación de los datos se analizó con la prueba one-way ANOVA y la comparación de cada una respecto al control se analizó con la prueba Dunnett's multiple comparisons /30 segundos. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa NL5901

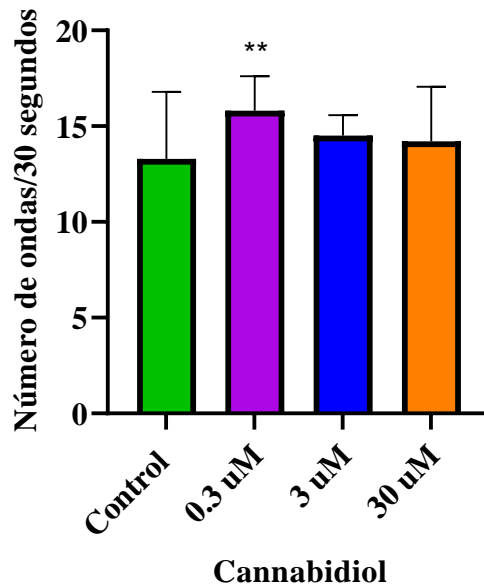


Figura 22. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa NL5901. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa NL5901 sin tratamiento (color verde) tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM (color morado), 3 uM (color azul) y 30 uM (color naranja). Se expresa la media y desviación estándar. La distribución normal de los datos se analizó con el test de D'Agostino & Pearson. La comparación de los datos se analizó con la prueba Kruskal-Wallis test y la comparación de cada una respecto al control se analizó con la prueba Dunnett's multiple comparisons $p = 0,0147$. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Tabla 5. Análisis efecto del CBD Ensayo de Movilidad cepa N2 Bristol

	Control	0.3 uM	3 uM	30 uM
Estadística Descriptiva				
Número de valores	83	10	10	10
Media	14,69	16,70	16,30	14,60
Desviación Estándar	2,469	3,164	2,312	2,066
Test de Normalidad				
Test D'Agostino & Pearson				
Valor de p	0,2098	0,8973	0,2480	0,4448
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	Si	Si	Si	Si
Resumen del valor p	Ns	Ns	ns	ns
ANOVA Una-vía				
Valor de p	0,0345			
Resumen del valor p	*			
¿Significativamente diferente ($P < 0.05$)	Yes			

Estadística Descriptiva, test de normalidad y prueba paramétrica de Anova Una-vía para la cepa N2 Bristol en el ensayo del efecto del CBD en la movilidad. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

Tabla 6. Análisis efecto del CBD Ensayo de Movilidad cepa NL5901

	Control	0.3 uM	3 Um	30 uM
Estadística Descriptiva				
Número de valores	34	10	10	10
Media	13,29	15,80	14,50	14,20
Desviación Estándar	3,495	1,814	1,080	2,860
Test de Normalidad				
Test D'Agostino & Pearson				
Valor de p	0,0469	0,9777	0,7332	0,4424
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	No	Si	Si	Si
Resumen del valor p	*	ns	Ns	ns
Test de Kruskal-Wallis				
Valor de p	0,0147			
Resumen del valor p	*			
Las medias son diferentes significativamente ($p < 0.05$)	Si			

Estadística Descriptiva, test de normalidad y prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la cepa NL5901 en el ensayo del efecto del CBD en la movilidad. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

Tabla 7. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Movilidad

	N2			NL5901		
Control vs	0.3 uM	3 uM	30 uM	0.3 uM	3 uM	30 uM
Valor de <i>p</i>	0,0510	0,1561	0,9994	0,0083	0,1870	0,7515
Es significativo ?	No	No	No	Si	No	No

Comparación de la prueba paramétrica de Anova Una-vía para la cepa N2 Bristol y no paramétrica de Kruskal-Wallis para la cepa NL5901 en el ensayo del efecto del CBD en la movilidad. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

4.6. Fluorescencia con CBD

Se transfirieron nematodos de la cepa NL5901 a cajas de Petri con 2.4 ml de NGM, 50 uL de *E.coli* OP50 y 100 uL de CBD a concentración de CBD 30, 3 y 0.3 uM, se esperaron 24 horas y se inmovilizaron con levamisol (ver anexo 3), se tomaron las fotos y posteriormente se analizaron en el programa ImageJ, arrojando como resultados que, para los nematodos del grupo control, el promedio en la intensidad de fluorescencia fue de 90.72 con una desviación estándar SD=36.20, mientras que para los nematodos tratados con CBD 0.3uM fue de 32.19, con una desviación estándar SD=11.53. El grupo de nematodos tratados con CBD en una concentración de 3 uM, el promedio de la intensidad de fluorescencia fue 37.39 con una desviación estándar SD=12.11 y por ultimo para el grupo tratado con CBD en concentración de 30 uM un promedio 25.13 y una desviación estándar SD=6.710. Se destaca la disminución de fluorescencia en la parte de la cola de los nematodos con respecto a todo el cuerpo (Figura 23).



Figura 23. Nematodos tratados con CBD. Se observan nematodos de la cepa NL5901 tratados con concentraciones de CBD 0.3 uM, 3 uM y 30 uM, inmovilizados con levamisol 1mM en microscopio de fluorescencia con objetivo 10X.

El análisis descriptivo del ensayo, el análisis de normalidad por la prueba de Anderson-Darling y el análisis de comparación entre todos los tratamientos por la prueba one-way ANOVA se observan en la tabla No 8 mientras que el análisis de cada concentración respecto al control analizado con la prueba Dunnett's multiple comparisons se observan en la tabla No 9. Se observó disminución en la fluorescencia en los grupos tratados con CBD 0.3, 3 y 30 uM respecto a los nematodos control (Figura 24).

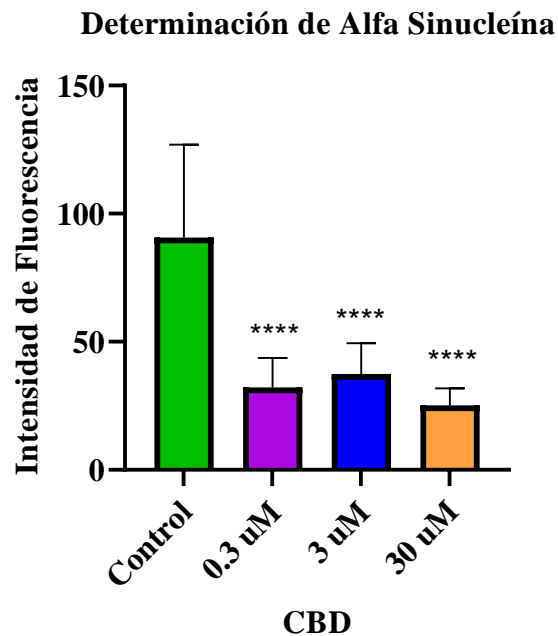


Figura 24. Determinación de alfa sinucleína. Comparación de la intensidad de fluorescencia entre nematodos de la cepa NL5901 sin tratamiento (color verde) tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM (color morado), 3 uM (color azul) y 30 uM (color naranja). Se expresa la media y desviación estándar. La distribución normal de los datos se analizó con el test de Anderson-Darling. La comparación de los datos se analizó con la prueba one-way ANOVA y la comparación de cada una respecto al control se analizó con la prueba Dunnett's multiple comparisons $p = <0,0001$. Los valores de $p < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos. **** Indica diferencia estadísticamente significativa respecto al control.

Tabla 8. Análisis efecto del CBD determinación de alfa sinucleína cepa NL5901

	Control	0.3 uM	3 uM	30 Um
Estadística Descriptiva				
Número de valores	7	10	10	10
Media	88,84	32,56	36,32	24,89
Desviación Estándar	38,46	12,25	11,36	6,665
Test de Normalidad				
Test de Anderson-Darling				
Valor de <i>p</i>	0,1728	0,1478	0,2326	0,9751
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	Si	Si	Si	Si
Resumen del valor <i>p</i>	ns	Ns	ns	Ns
ANOVA Una-vía				
Valor de <i>p</i>	<0,0001			
Resumen del valor <i>p</i>	****			
Las medias son diferentes significativamente (<i>p</i> < 0.05)	Si			

Estadística Descriptiva, test de normalidad y prueba paramétrica de ANOVA Una-vía para la cepa NL5901 en el ensayo de determinación de alfa sinucleína. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

Tabla 9. Comparación estadística del efecto del CBD Ensayo de Fluorescencia

	Control vs 0.3 uM	Control vs 3 uM	Control vs 30 uM
Valor de <i>p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Es significativo ?	Si	Si	Si

Comparación de la prueba de ANOVA Una-vía para la cepa NL5901 en el ensayo de determinación de alfa sinucleína. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

4.7. Tolerancia al estrés térmico

Para el ensayo de estrés térmico se transfirieron 10 nematodos sincronizados de cada cepa a medio NGM/*E.coli* OP50 y se sometieron durante 8 horas a una temperatura de 37°C, donde pasado este tiempo se observaron al estereoscopio los nematodos, y aquellos que no respondían al estímulo con el asa se determinan muertos, arrojando como resultado que ninguno de los nematodos para las cepas incluidas en el estudio sobrevivieron al estrés térmico generado.

4.7.1 Efecto del CBD sobre la tolerancia al estrés térmico

Para el ensayo de estrés térmico se tomaron nematodos por cada cepa, donde pasadas las 8 horas a una temperatura de 37°C, se observaron y estimularon con el pick de platino, arrojando que ninguno de los nematodos que habían sido tratados resistió la influencia del estrés térmico, por lo que ninguna de las concentraciones de CBD presenta efecto protector en cuanto a la tolerancia al estrés térmico.

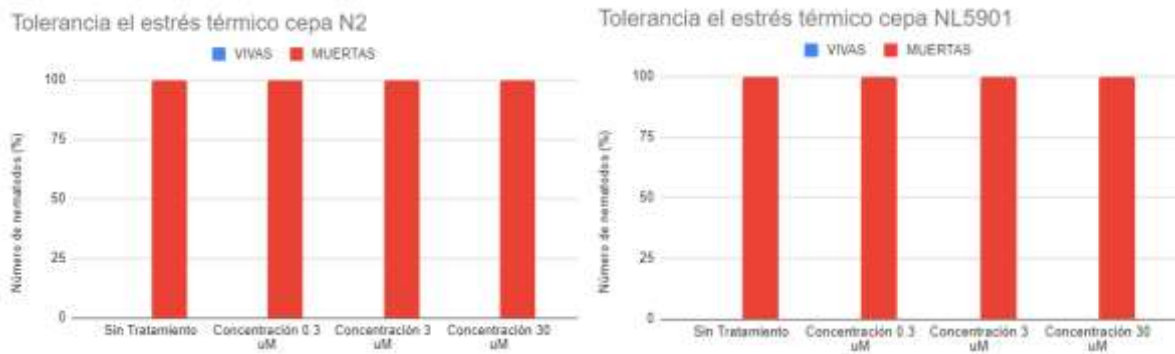


Figura 25. Ensayo Tolerancia al estrés térmico. Comparación del número de larvas viva muertas en porcentaje por estrés térmico entre nematodos de la cepa N2 y NL5901 tratados con concentraciones de CBD de 0.3 uM, 3 uM y 30 uM. Se expresa la media

5. Discusión

La agregación de alfa sinucleína es una característica patológica presente en pacientes con enfermedad de Parkinson, así lo describió por primera vez Spillantini et al. 1998 (11). Son pocos los modelos biológicos disponibles que permiten evaluar la agregación de alfa sinucleína *in vivo*, es por esta razón que el modelo de *C. elegans*, cepa transgénica NL5901 es de gran utilidad, esta expresa agregados de alfa sinucleína marcados con YFP en los músculos de la pared del cuerpo del nematodo.

Antes de realizar los ensayos se debe conocer y aprender a manejar el nematodo, por lo cual inicialmente se realizó la caracterización a lo largo del ciclo de vida, tanto para la cepa Silvestre N2 Bristol como la cepa NL5901. Los resultados para cada estadio larvario se encuentran dentro de los tiempos establecidos y previamente reportados, al igual que las características fenotípicas de cada uno, así como lo reportado por Altun y Hall (32), así mismo, se realizó la identificación

anat6mica de algunos 6rganos como lo mencion6 Cheg y McColl (35), entre ellos se destacan la faringe, es6fago y vulva, en nematodos de estadio larvario L4. Dentro de esta caracterizaci6n se realiz6 la medici6n de la longitud de las larvas, donde la cepa N2 Bristol es levemente m6s larga en comparaci6n con la cepa NL5901 en nematodos de estadio larvario L4.

Caracterizadas las dos cepas se procedi6 inicialmente a realizar los ensayos de longevidad, movilidad y tolerancia al estr6s t6rmico, donde se encontr6 un resultado similar a lo reportado por Gonz6lez Devia en el a6o 2018 (1). Se observ6 disminuci6n en la esperanza de vida y movilidad de la cepa NL5901 con respecto a la cepa N2 Bristol, lo que sugiere que la acumulaci6n de alfa sinucle6na presente en los m6sculos de la pared corporal interviene en el movimiento de los nematodos. Por otra parte, se realiz6 el ensayo de supervivencia al estr6s t6rmico, pero ninguno de los nematodos sobrevivi6 pasados las 8 horas a una temperatura de 37°C, de hecho, los nematodos se observaban oscuros, como si sus 6rganos internos estuvieran deshidratados y cuando se tocaban con el pick de platino el cuerpo se dividia en dos, lo que muestra la fragilidad de los cuerpos.

Posteriormente, se evalu6 el efecto del cannabidiol (CBD) sobre las cepas incluidas en el estudio. Inicialmente se realiz6 el ensayo de Dosis letal 50 aguda con el fin de determinar si las concentraciones propuestas, presentaban alg6n efecto que comprometiera la supervivencia de los nematodos. En las soluciones de trabajo se emple6 como solvente medio K para hacer la diluciones, como lo realizado por Shrader et al y Windy et al (7,15), encontrando que para las concentraciones de 3000 y 300 uM se observ6 par6lisis corporal de los nematodos a los pocos segundos que entraban en contacto con el CBD, contrario a lo reportado por Land et al (6) donde observaron nematodos activos a la hora 0, 3 y 6 tratados con concentraciones de 4000 y 400 uM de CBD, una posible hip6tesis puede deberse a la interacci6n con los receptores de la dopamina lo que seg6n la literatura causa par6lisis en los nematodos (7).

Se evidenciaron diferentes efectos del CBD sobre la cepa N2 Bristol, donde a concentraciones de 3 y 30 uM se observ6 un aumento significativo en el tiempo de vida entre las diferentes concentraciones (30, 3 y 0.3 uM) respecto al control. En la cepa NL5901 tambi6n se evidencia un aumento significativo sobre la esperanza de vida en los tres grupos de nematodos tratados con

diferentes concentraciones (30, 3 y 0.3 μM) respecto al grupo control, este efecto puede deberse a la acción antioxidante que presenta el fitocannabinoide (31).

Sin embargo, se requieren futuros estudios que evalúen este efecto sobre la esperanza de vida, resultados similares han sido reportados por Land et al (6) en donde se evaluó el efecto de la toxicidad en la vida útil del nematodo de la cepa N2 a concentraciones de 10, 40 y 100 μM de CBD, no se evidenciaron efectos negativos en la esperanza de vida y por el contrario se evidenció un aumento significativo en la vida útil media con un 14.8%, 18.3% y 12,2% para cada grupo de tratamiento respectivamente.

Con respecto al ensayo de movilidad, no se evidenció un aumento en el número de ondas en 30 segundos para los grupos de nematodos de la cepa N2 Bristol tratados con CBD. Sin embargo, al evaluar el efecto de CBD sobre la cepa NL5901, se observó un aumento en el número de ondas en el grupo tratado con la concentración de CBD de 0.3 μM respecto al control, con una media de 16 y 13 ondas respectivamente. Esto podría relacionarse a una disminución en la agregación de alfa sinucleína en la pared muscular del nematodo. Hasta la fecha, no se han reportado ensayos de longevidad y movilidad en las cepas N2 Bristol y NL5901 tratadas con CBD. Sin embargo, González Devia (1) reportó trabajo un aumento en la esperanza de vida y movimiento del nematodo cuando fue tratado con extracto etanólico de *Witheringia coccoloboides* a diferentes concentraciones.

A pesar de que no se observó un efecto protector con el tratamiento de CBD frente al estrés térmico, debido que ninguno de los nematodos sobrevivió las 8 horas de exposición a 37°C, cabe resaltar que los cuerpos de los nematodos se observaron íntegros y mejor conservados anatómicamente en comparación con el grupo control, por lo que se sugiere en estudios futuros evaluar el posible efecto protector del CBD frente al estrés térmico por menor tiempo de incubación a 35°C y explorar estrés térmico en menores temperaturas como 25°C. Hasta la fecha no se han reportado efectos del CBD sobre el estrés térmico en las cepas N2 Bristol y NL5901 tratadas con CBD.

Se evidenció un efecto protector frente a la agregación de alfa sinucleína en la cepa transgénica NL5901, debido a una disminución significativa en la fluorescencia en todos los grupos de

tratamiento con CBD (0.3, 3 y 30 uM) respecto al control. Es de resaltar los resultados con el tratamiento 30 uM, donde se encontró una menor fluorescencia, asociada a la disminución en la agregación de alfa sinucleína en comparación con los otros grupos y el control. Lo que sugiere el efecto protector del CBD, así mismo, otro hallazgo importante es destacar que los nematodos pierden la fluorescencia en la zona caudal posterior en los grupos con tratamiento de CBD, porque en esta zona hay menos músculos corporales en comparación con el resto del cuerpo (36). Este es el primer reporte del efecto del CBD sobre la agregación de alfa sinucleína *in vivo*, en un modelo de *C. elegans*.

Se observó además, mayor intensidad de fluorescencia en la parte anterior del cuerpo del nematodo, lo que puede deberse a la presencia de los músculos faríngeos, los cuales intervienen en las contracciones y relajaciones rítmicas de la faringe que hace el nematodo para alimentarse (37), estos resultados son similares a lo reportado por Arias et al (38), donde trataron nematodos de la cepa NL5901 con extracto de *Witheringia coccoloboides* y evidenciaron una reducción de los agregados proteicos, así mismo, lo reportó Fajardo (39), donde usó el tratamiento con diferentes concentraciones de cúrcuma y también se evidenció disminución de la agregación de alfa sinucleína, conllevando a un posible efecto protector por parte de los tratamientos como en este caso el CBD.

Hasta la fecha no se han reportado estudios relacionados al uso del CBD en cuanto a la disminución en la agregación de alfa sinucleína para la cepa NL5901 de *C.elegans*, sin embargo, se han creado otros modelos transgénicos para el estudio de la proteína, como los mencionados por Fernagut y Chesselet (40) donde se realiza una revisión de algunos modelos transgénicos de ratones que sobre expresan alfa sinucleína humana bajo diferentes promotores, entre ellos se destacan los ratones tipo α Syn A53T, que son de los más usados por los científicos.

Zhao et al, realizaron un estudio empleando este tipo de ratones evaluando el efecto neuroprotector del CBD, observaron a través de microfotografías histopatológicas la presencia o ausencia de cuerpos de lewy después del tratamiento, concluyendo que el CBD previene la agregación de alfa sinucleína (41) cabe resaltar que este modelo no puede ser evaluado de manera *in vivo*, a diferencia de *C. elegans*; se encontraron resultados similares en el estudio realizado por Ueda et al (42), donde

emplearon ratones inyectados con fibrillas preformadas de alfa sinucleína en las neuronas primarias, pero fueron tratados con perampanel, un fármaco usado para tratar ciertos tipos de convulsiones y evidenciaron una inhibición en el desarrollo de la proteína en las neuronas.

Recientemente se han publicado estudios con el uso del CBD en *C. elegans*, se destacan los resultados reportados por Wang et al (43) donde evidenciaron que el CBD prolonga la vida útil del nematodo, ya que el fitocannabinoide inducía autofagia por la vía SIRT1/ sir-2.1, la cual se relaciona con el aumento en la longevidad cuando es estimulada, así mismo, reguló el envejecimiento neuronal. También se encuentra el estudio realizado por Zhang et al (44) donde encontraron que los grupos hidroxilo fenólicos del CBD generan un efecto protector empleando a *C. elegans*, como modelo de Alzheimer, ya que puede mejorar la resistencia al estrés oxidativo eliminando las especies reactivas de oxígeno, así mismo, inhibió la agregación del péptido beta amiloide, evaluado en la cepa CL4176 de *C. elegans*.

El nematodo se ha convertido en uno de los modelos biológicos más usados para el estudio de enfermedades neurodegenerativas debido a la gran variedad de cepas que se han creado expresando características propias de cada enfermedad, evaluando de forma *in vivo* potenciales compuestos que pueden mejorar las mismas y así en un futuro evitar la progresión de la enfermedad y disminución de síntomas. En el grupo de Biotecnología y Genética de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca se seguirán realizando ensayos en cepas de *C. elegans* como modelo de estudio de diversas enfermedades, y así, impulsar estudios a gran escala que permitan un mayor acercamiento con los pacientes implicados, mejorando su calidad de vida y la de sus familias.

6. Conclusiones

Los nematodos de la cepa transgénica NL5901 presentan una disminución en cuanto a la esperanza de vida y movilidad respecto a la cepa N2 Bristol.

Las concentraciones de 3000 y 300 μ M de CBD, no son útiles para evaluar el efecto del CBD sobre los indicadores de esperanza de vida, movilidad, agregación de alfa sinucleína, estrés térmico. Por

el contrario, las concentraciones de CBD de 30, 3 y 0.3 uM son útiles para evaluar el efecto del mismo.

El CBD a concentraciones de 30 y 3 uM aumenta la esperanza de vida en la cepa N2 Bristol, mientras que para la cepa NL5901, se observó un aumento en la esperanza de vida en todos los tratamientos con CBD.

No se observó efecto de CBD sobre la movilidad en la cepa N2 Bristol, sin embargo, en la cepa NL5901 se evidenció un aumento en la movilidad en el grupo tratado con CBD en la concentración 0.3 uM.

Se observó una disminución de los agregados de alfa sinucleína en los nematodos de la cepa NL5901 en todos los grupos tratados con CBD, es de resaltar que el grupo tratado con la concentración 30 uM se observó la mayor disminución de fluorescencia, en comparación con los otros grupos de tratamiento y el grupo control.

No se observó efecto protector en cuanto a la tolerancia al estrés térmico en nematodos tratados con CBD, pero se sugiere repetir el ensayo, con menos horas de exposición a una temperatura de 35°C.

Los resultados de este proyecto se emplearon como prueba piloto para determinar el tamaño de la muestra de cada ensayo para desarrollar un proyecto de doctorado.

7. Referencias Bibliográficas

1. González Devia JL. Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Witheringia coccoloboides* sobre agregados de α sinucleína en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans* [Internet]. [Bogotá D.C.]: Universidad Nacional de Colombia; 2018. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/68758/Tesis%20de%20Maestr%c3%ada%20Johanna%20Lizeth%20Gonzalez%20Devia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
2. Parada Ferro LK, Gualteros Bustos AV, Sanchez Mora RM. Caracterización fenotípica de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como un modelo en enfermedades neurodegenerativas. NOVA. diciembre de 2017;15(28):69-78.

3. Brunetti G, Di Rosa G, Scuto M, Leri M, Stefani M, Schmitz-Linneweber C, et al. Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson's-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in *C. elegans*. *Int J Mol Sci*. 8 de abril de 2020;21(7).
4. Fernández Espejo E. Agregación de alfa-sinucleína y degeneración Parkinsoniana. *Fisiología: Boletín informativo de la SECF*. 2013;
5. Suero-García C, Martín-Banderas L, Holgado MÁ. Neuroprotective Effect of Cannabinoids in Neurodegenerative Diseases. *Ars Pharm Internet*. 2015;56(2):77-87.
6. Land MH, Toth ML, MacNair L, Vanapalli SA, Lefever TW, Peters EN, et al. Effect of Cannabidiol on the Long-Term Toxicity and Lifespan in the Preclinical Model *Caenorhabditis elegans*. *Cannabis Cannabinoid Res*. 1 de diciembre de 2021;can.2020.0103.
7. Shrader SH, Tong YG, Duff MB, Freedman JH, Song ZH. Involvement of dopamine receptor in the actions of non-psychoactive phytocannabinoids. *Biochem Biophys Res Commun*. diciembre de 2020;533(4):1366-70.
8. Maupas E. Modes et formes de reproduce des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale*. 1900;8:463-624.
9. S. BRENNER. THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*. mayo de 1974;77:71-94.
10. L. BYERLY, R. C. CASSADA, R. L. RUSSELL. The Life Cycle of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1976;51(23-33).
11. Grazia Spillantini M, Anthony Crowther R, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*. julio de 1998;251(3):205-8.
12. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-) 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci*. 7 de julio de 1998;95(14):8268-73.
13. Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects. *J Clin Pharmacol*. noviembre de 2002;42(S1):11S-19S.
14. 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. Kim SK, editor. *PLoS Genet*. 21 de marzo de 2008;4(3):e1000027.
15. Boyd WA, Smith MV, Freedman JH. *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2012;889:15-24.
16. Oakes MD, Law WJ, Clark T, Bamber BA, Komuniecki R. Cannabinoids Activate Monoaminergic Signaling to Modulate Key *C. elegans* Behaviors. *J Neurosci*. 15 de marzo de 2017;37(11):2859-69.

17. Venda LL, Cragg SJ, Buchman VL, Wade-Martins R. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* diciembre de 2010;33(12):559-68.
18. Nakai M, Fujita M, Waragai M, Sugama S, Wei J, Akatsu H, et al. Expression of α -synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* junio de 2007;358(1):104-10.
19. Emamzadeh F. Alpha-synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci.* 2016;21(1):29.
20. Lee VMY, Trojanowski JQ. Mechanisms of Parkinson's Disease Linked to Pathological α -Synuclein: New Targets for Drug Discovery. *Neuron.* octubre de 2006;52(1):33-8.
21. Burré J. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Park Dis.* 8 de octubre de 2015;5(4):699-713.
22. Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C. The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev.* junio de 2009;19(3):254-65.
23. Fink AL. The Aggregation and Fibrillation of α -Synuclein. *Acc Chem Res.* 1 de septiembre de 2006;39(9):628-34.
24. Fundación CANNA. El Sistema Endocannabinoide [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide>
25. Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han GW, Wu Y, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell.* octubre de 2016;167(3):750-762.e14.
26. RODRÍGUEZ de FONSECA F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M. THE ENDOCANNABINOID SYSTEM: PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY. *Alcohol Alcohol.* 1 de enero de 2005;40(1):2-14.
27. Oakes M, Law WJ, Komuniecki R. Cannabinoids Stimulate the TRP Channel-Dependent Release of Both Serotonin and Dopamine to Modulate Behavior in *C. elegans*. *J Neurosci.* 22 de mayo de 2019;39(21):4142-52.
28. Guadalupe Esther Ángeles López, Fernando Brindis, Sol Cristina Niizawa, Rosa Ventura Martínez. Cannabis sativa L., una planta singular. *Rev Mex Cienc Farm.* diciembre de 2014;45(4).
29. FUNDACION CANNA. ¿Qué son los cannabinoides? ¿Dónde se encuentran? [Internet]. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/cannabinoides#:~:text=Fitocannabinoides,la%20especie%20Cannabis%20sativa%20L.>
30. Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Phytocannabinoids.* 25 de enero de 2017;103:103-31.

31. Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacol Ther.* julio de 2017;175:133-50.
32. Altun ZF, Hall DH. *WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction.* Herndon LA, editor. *WormAtlas* [Internet]. junio de 2006 [citado 24 de septiembre de 2021]; Disponible en: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
33. Alexander AG, Marfil V, Li C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet* [Internet]. 5 de septiembre de 2014 [citado 24 de septiembre de 2021];5. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00279/abstract>
34. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 1 de junio de 2015;200(2):387-407.
35. Chege PM, McColl G. *Caenorhabditis elegans*: a model to investigate oxidative stress and metal dyshomeostasis in Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 19 de mayo de 2014 [citado 3 de marzo de 2022];6. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2014.00089/abstract>
36. Fox RM, Watson JD, Von Stetina SE, McDermott J, Brodigan TM, Fukushige T, et al. The embryonic muscle transcriptome of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol.* septiembre de 2007;8(9):R188.
37. Trojanowski NF, Raizen DM, Fang-Yen C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Sci Rep.* septiembre de 2016;6(1):22940.
38. Laura Lucia Arias Gomez, Pedreros Sarmiento WL, Rosero Pepinoza MA. Accion de witheringia coccoloboides en la reduccion de agregados proteicos en cepas mutantes nl5901 (parkinson) y cl2006 (alzheimer) del caenorhabditis elegans. [Bogotá D.C.]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2015.
39. Fajardo Rusinque AF. Efecto de la cúrcuma sobre características fenotípicas de la cepa mutante de *Caenorhabditis elegans* NL5901 para la enfermedad de Parkinson. [Bogotá D.C.]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018.
40. Fernagut PO, Chesselet MF. Alpha-synuclein and transgenic mouse models. *Neurobiol Dis.* noviembre de 2004;17(2):123-30.
41. Zhao J, Gao X, Zhao L, Wang Y, Zhang J, Liu S. Effects of Cannabidiol on Parkinson's Disease in a Transgenic Mouse Model by Gut-Brain Metabolic Analysis. Pan W, editor. *Evid Based Complement Alternat Med.* 22 de marzo de 2022;2022:1-10.
42. Ueda J, Uemura N, Sawamura M, Taguchi T, Ikuno M, Kaji S, et al. Perampanel Inhibits α -Synuclein Transmission in Parkinson's Disease Models. *Mov Disord.* julio de 2021;36(7):1554-64.

43. Wang Z, Zheng P, Chen X, Xie Y, Weston-Green K, Solowij N, et al. Cannabidiol induces autophagy and improves neuronal health associated with SIRT1 mediated longevity. *GeroScience* [Internet]. 20 de abril de 2022 [citado 29 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s11357-022-00559-7>
44. Zhang Y, Li H, Jin S, Lu Y, Peng Y, Zhao L, et al. Cannabidiol protects against Alzheimer's disease in *C. elegans* via ROS scavenging activity of its phenolic hydroxyl groups. *Eur J Pharmacol.* marzo de 2022;919:174829.

8. Anexos

Anexo 1. Preparación Medio NGM

Las cajas de Petri con medio NGM como se mencionó anteriormente se prepararon siguiendo el protocolo estandarizado en el Semillero de Investigación Biotecnología y Genética UCMC.

1. Agregar 3gr de NaCl
2. Pesar 17 gr de Agar-agar
3. Adicionar 2,5 gr de peptona de un total de 975 mL de agua destilada.
4. Se autoclavó por 1 hora y se dejó enfriar.
5. Para el enriquecimiento del medio se utilizó: 1 mL de CaCl₂, 1 mL de colesterol, 1 mL de MgSO₄ 1M, 25 mL de buffer KPO₄ 1M pH 6.0.
6. La solución de NGM se sirvió en placas de Petri en condiciones de esterilidad, llenando las cajas con 20 mL de medio aproximadamente.

- Enriquecimiento

CaCl₂: 110.93 g/mol

Colesterol: 386.66 g/mol

MgSO₄: 120.366 g/mol

Buffer KPO₄: 108,3 gr de KH₂PO₄ y 35,6 gr de K₂HPO₄ en 1L de agua

Anexo 2. Sincronización

Para realizar el procedimiento de sincronización en los nematodos, se deben preparar las siguientes soluciones:

- Buffer M9

Para 1L de agua destilada se agregan 3 gr de KH_2PO_4 , 6 gr de Na_2HPO_4 , 5g NaCl , se esteriliza en autoclave por una hora y se enriquece con 1 mL de MgSO_4 1M

- Solución blanqueadora

Para 20 ml se agregan 7.6 ml de cloro 5%, 10 ml de NaOH 2M y 2.4 ml de H_2O . (Se prepara el día que se realiza la sincronización)

NaOH : 40g/mol

Anexo 3. Preparación Levamisol

1. Agregar 2.042 g de levamisol en 10 mL de buffer M9 en un tubo falcon de 15 mL
2. En un tubo falcon de 50 mL agregar 50 mL de buffer M9 y con la ayuda de una pipeta sacar 50 uL de buffer y descartar
3. Alicuotar 50 uL de la solución inicial (Levamisol+Buffer M9) y adicionar al tubo falcon de 50 mL que contiene el buffer
4. La solución final en el tubo falcon de 50mL es de una concentración de 1mM
5. La solución final en el tubo falcon de 15mL es de una concentración de 1M
6. Adicionar a la caja de petri de la que se va a realizar el ensayo 4000 uL de Levamisol 1mM + 1000 uL de buffer M9 y realizar lavados por aproximadamente 4 minutos.
7. Agregar en un tubo eppendorf y esperar de 30 a 45 minutos
8. Sacar una gota de muestras, después de dejarla sedimentar, (tomar del fondo del tubo) en una lámina y colocar laminilla, leer al microscopio.

Anexo 4. Dosis letal 50

Preparación de las soluciones a evaluar DL50

Preparación de CBD:

1. Agregar 3.97 ml de etanol al frasco que contiene 5 mg de CBD, agregando primero 1 ml y disolviendo muy bien, luego pasar este mililitro a un tubo falcón de 15 ml, nuevamente agregar 1 ml al frasco del CBD, disolver y pasar al mismo tubo falcón, así sucesivamente hasta completar 3.97 ml. La concentración final obtenida es de 4 mM
2. A partir del tubo falcón que contiene los 3.97 ml alicuotar en 4 crioviales 1 ml en cada uno.
3. Se toma un criovial y se realiza una alícuota de 750 ul en un tubo eppendorf, allí mismo agregar 250 ul de medio K al tubo (Solución 1)
4. A partir de la solución 1 realizar diluciones seriadas agregando 100 ul de la solución más 900 ul de medio K

Ensayo determinación DL50 Aguda

1. Para realizar el ensayo se debe usar una caja de cultivo celular de 24 pozos fondo plano (200ul cada uno) colocando 10 larvas en estadio L4 en cada pozo a usar.
2. Control medio K: Colocar 150 ul de medio K sin suplementar y sin comida
3. Control solvente: Inicialmente poner en un pozo 112 ul de etanol y agregar 38 ul de medio K, para llegar a un volumen de 150 ul y concentración de 75% de etanol
4. Muestras: colocar 150 ul de cada solución a evaluar, ejemplo: solución 1, 2, 3, 4, 5.
5. Si se tienen las cantidades necesarias de gusanos se realiza el ensayo por triplicado
6. Incubar y evaluar movilidad a las 0,3,6 horas de incubación a 20°C, en oscuridad.
7. Evaluar la supervivencia de los gusanos (respuesta positiva al movimiento y a la estimulación con el asa de pick de planito) a las 0, 3 y 6 horas después de iniciado el primer pozo, leer en el mismo orden que se montó el ensayo.

Anexo 5. Preparación suspensión de *E.coli* OP50

1. Sembrar una colonia de *E.coli OP50* cultivada en agar LB en 30 mL de caldo LB, dejar en shaker por 24 horas.
2. Sacar 1mL en un tubo eppendorf con 500uL de agua destilada estéril y realizar gram, confirmar la morfología de bacilos gram negativos.
3. Distribuir el cultivo en 4 tubos falcon de 15 mL.
4. Centrifugar 3 minutos por 4.000 rpm.
5. Lavar el sobrenadante con agua destilada
6. Centrifugar 3 minutos por 4.000 rpm.
7. En 2 tubos de vidrio colocar el sobrenadante de los tubos de falcon de 15 mL. (Aproximadamente 8 mL en cada tubo).
8. Esterilizar 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos.
9. En dos tubos de vidrio estériles igualar a escala de MacFarland 1, partiendo de los tubos que contienen el sobrenadante y mezclando con agua destilada estéril, siempre con ayuda del vortex.

Anexo 6. Dosis letal crónica

1. El Cannabidiol (CBD), en presentación de 5 mg se disuelve en 3.97 ml de etanol para obtener una solución madre de 4000 uM.
2. Se toman 468.75 uL de la solución madre junto con 2031.25 uL de medio K, partiendo de la formula $V1 * C1 = V2 * C2$, llegando a una concentración de 750 uM. (Solución 1)
3. Se toman 250 uL de la solución 1 con 2250 uL medio K para llegar a una concentración de 75 uM. (solución 2)
4. Se toman 250 uL de la solución 2 con 2250 uL medio K para llegar a una concentración de 7.5 uM. (solución 3)
5. Poner 100 uL de cada concentración en 2.400 uL de medio NGM, con el fin de llegar a concentraciones de 30, 3 y 0.3 uM.

Anexo 7. Congelación

1. Cultivar E.coli sembrado en agar Mac Conkey en caldo LB a 37°C por 36 horas en shaker (la cantidad depende del número de crio viales necesarios) (200ml, se obtienen 5-8 crio viales).
2. Una vez terminado del tiempo de incubación, colocar en refrigeración el día que se van a realizar la crio conservación.
3. Preparar una solución de glicerol al 30% (v / v) mezclando 30 ml de glicerol con 70 ml de agua. Transferir la solución a una botella de vidrio con tapón de rosca y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 min. Afloje la tapa durante la esterilización en autoclave. Y mantener en la nevera.
4. Centrifugar el cultivo en tubos falcon de 15 mL (el número de tubos falcon dependerá del volumen del cultivo de E. coli) en centrífuga refrigerada a 6000 rpm por 20 minutos y re suspender en 2 ml de medio LB.
5. ANTES DE CONGELAR: Confirmar morfología mediante tinción de Gram, CONFIRMAR PUREZA DEL CULTIVO.
6. En cabina de flujo laminar agregar alícuotas de 600 µl de cultivo bacteriano en tubos eppendorf de 2mL.
7. Inmediatamente agregar alícuotas de 600 uL de glicerol estéril al 30% (previamente refrigerado a 4°C), cerrando cuidadosamente los tubos.
8. Colocar los crio viales en una nevera de icopor con hielo, para conservar los crio viales a 4°C.
9. Rotular los tubos (NOMBRE DE LA CEPA, FECHA, NOMBRE DEL QUIEN REALIZA LOS CRIOVIALES) sin tocar la parte inferior, manteniéndolos en el frío.
10. Llevar de inmediato al CONGELADOR de -70°C, usando una nevera portátil, con hielos en su interior.
11. Colocar en una crio caja los viales obtenidos y recordar el lugar donde se dejan ubicados los tubos.
12. Recuperar un crio vial, un mes después de realizar la conservación, como control de calidad de las cepas conservadas.

Anexo 8. Certificado Ponencia RedColsi Regional