



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

KAREN LORENA HIDALGO PULIDO

Trabajo de Grado para optar por el título profesional en Bacteriología y Laboratorio Clínico

Asesora Interna

RUTH MELIDA SANCHEZ MORA MSc.PhD.

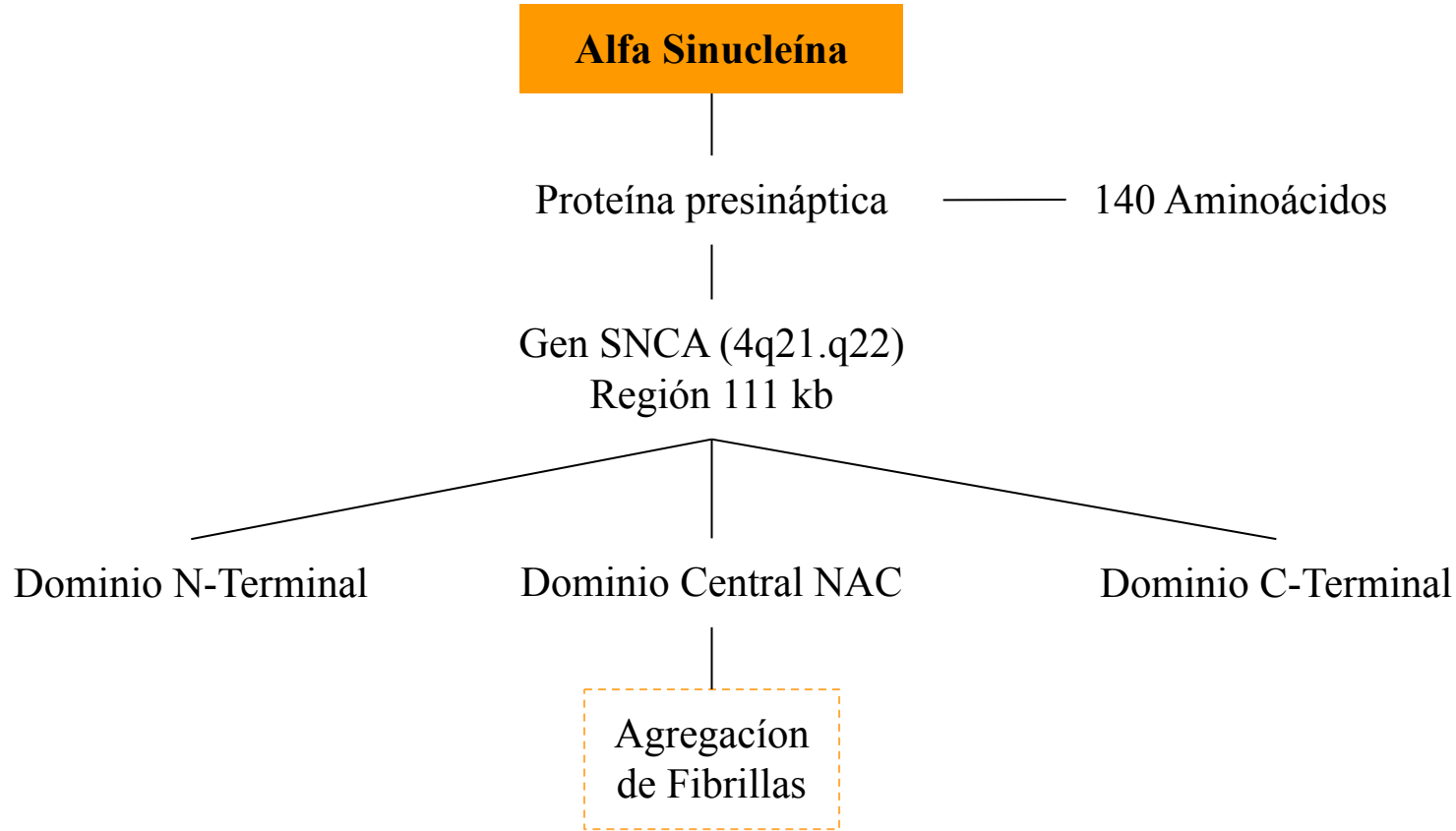
Asesora Externa:

ALEJANDRA MANTILLA GALINDO MSc. Ca. PhD.

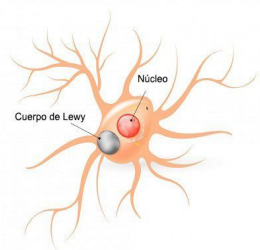
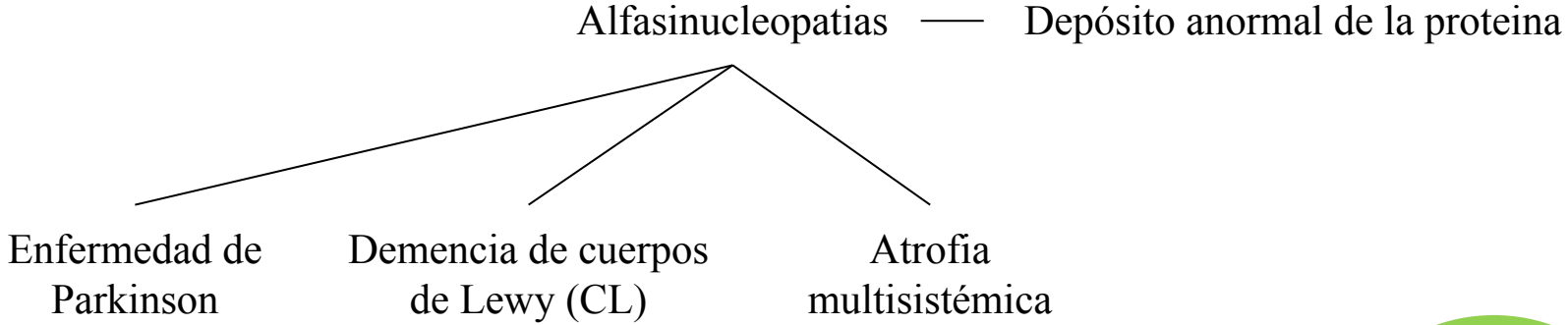
Universidad del Rosario

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

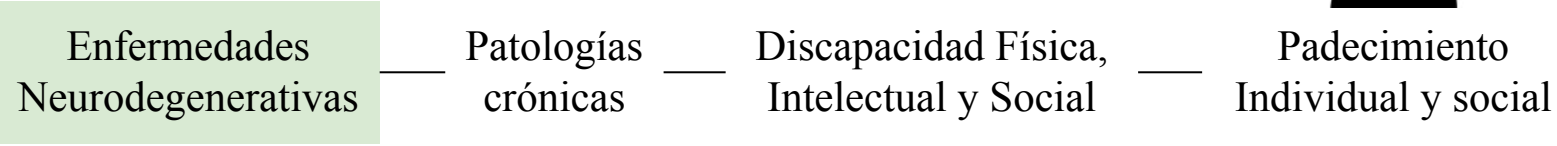
1. Introducción



1. Introducción

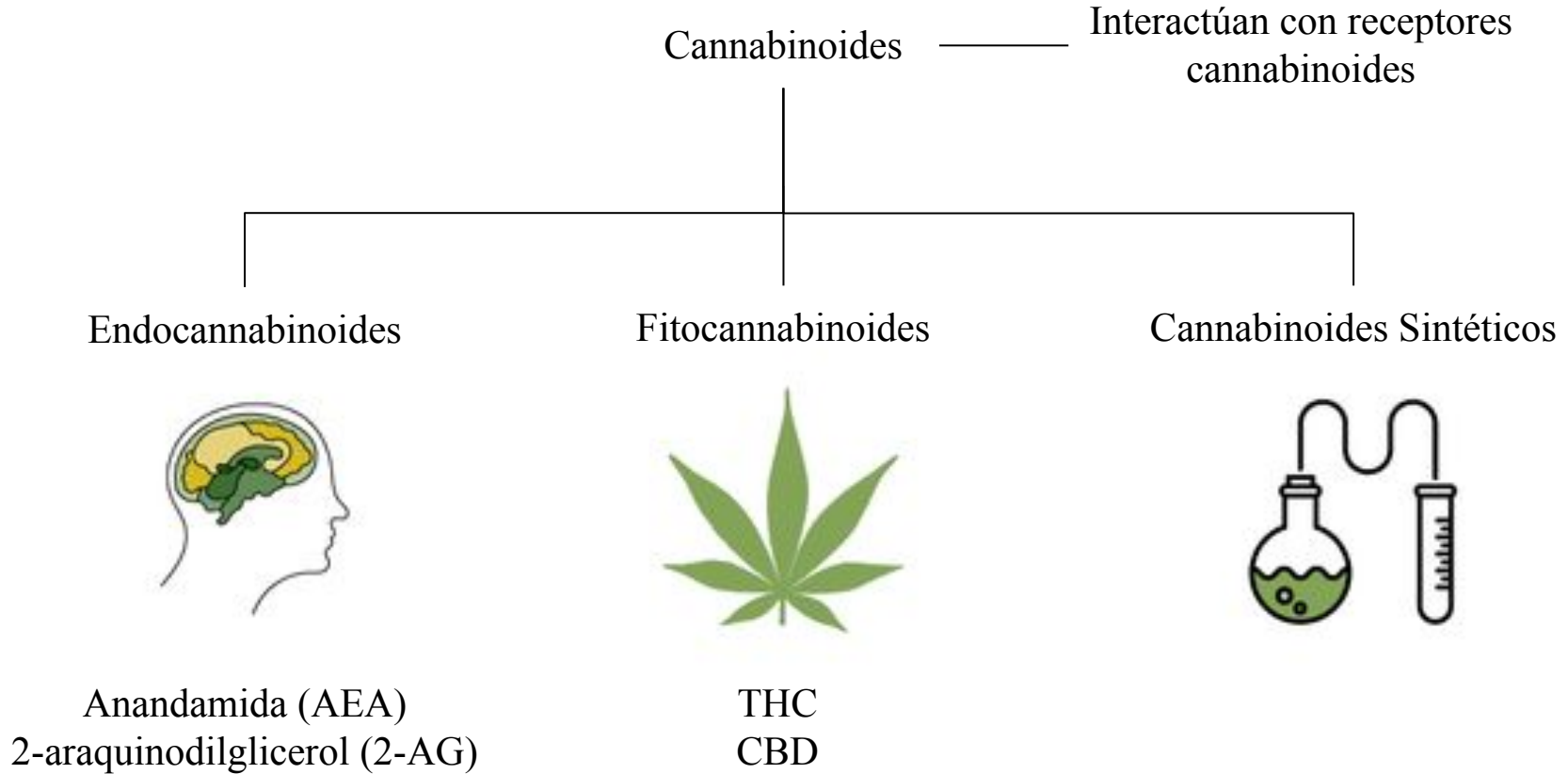


¿Cómo disminuir agregados proteicos?

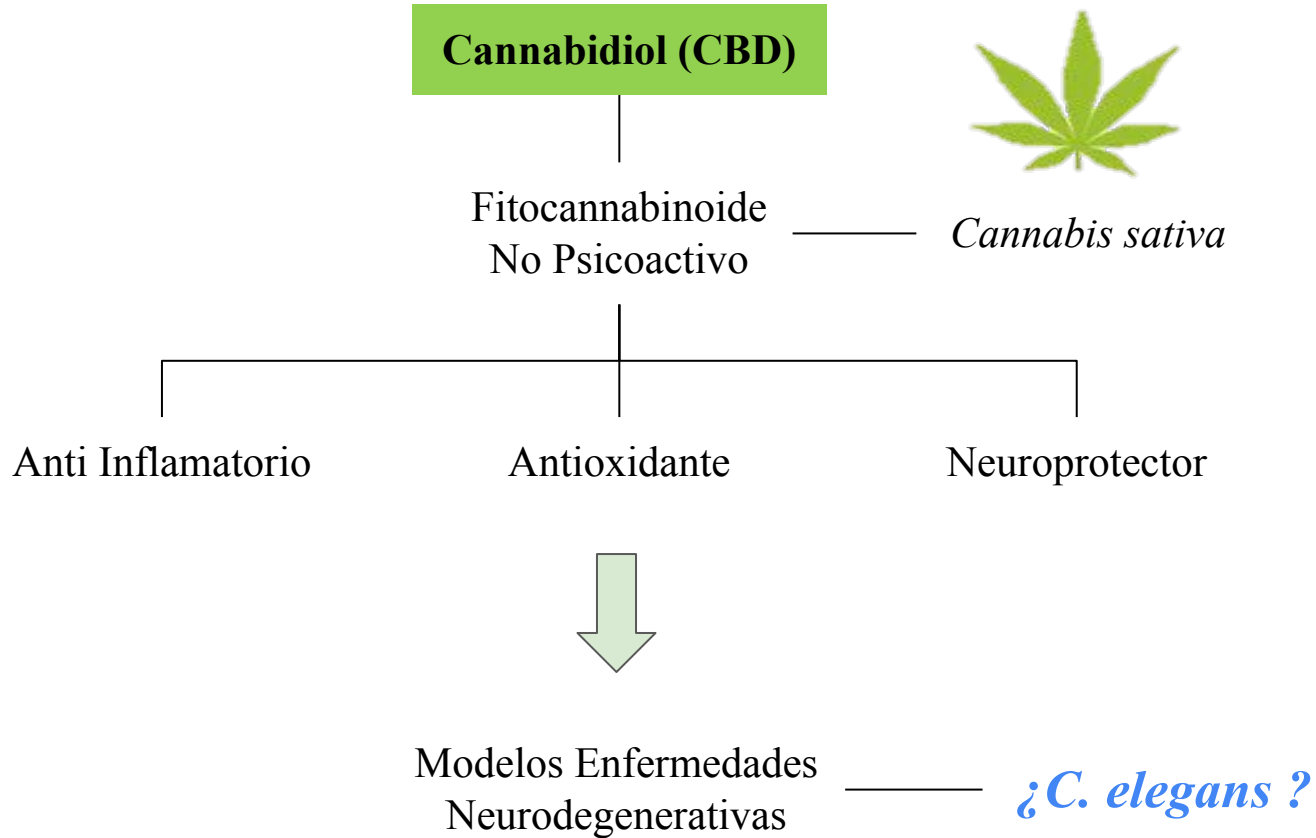


Brunetti G, Di Rosa G, Scuto M, Leri M, Stefani M, Schmitz-Linneweber C, et al. Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson's-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in C. elegans. Int J M 8 de abril de 2020;21(7).
González Devia JL. Evaluación del efecto del extracto etanólico de Witheringia coccoloboides sobre agregados de osinucleína en la cepa NL5901 de Caenorhabditis elegans [Internet]. [Bogotá D.C.]: Universidad Nacional Colombia; 2018. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/68758/Tesis%20de%20Maestr%c3%ad>

1. Introducción



1. Introducción



1. Introducción

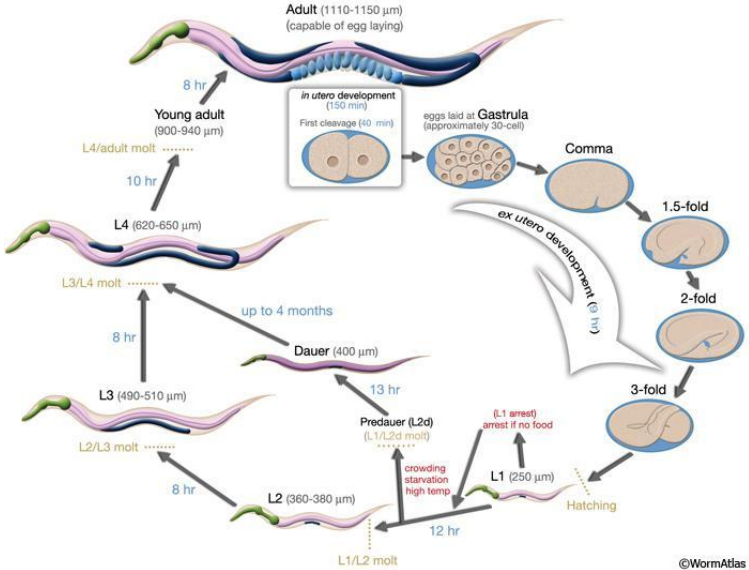
Caenorhabditis elegans

Ciclo de vida Corto

Tamaño pequeño

Bajos costos

Manipulación sencilla



Estudio de enfermedades Neurodegenerativas

Cepa NL5901

Agregados de Alfa sinucleína con YFP

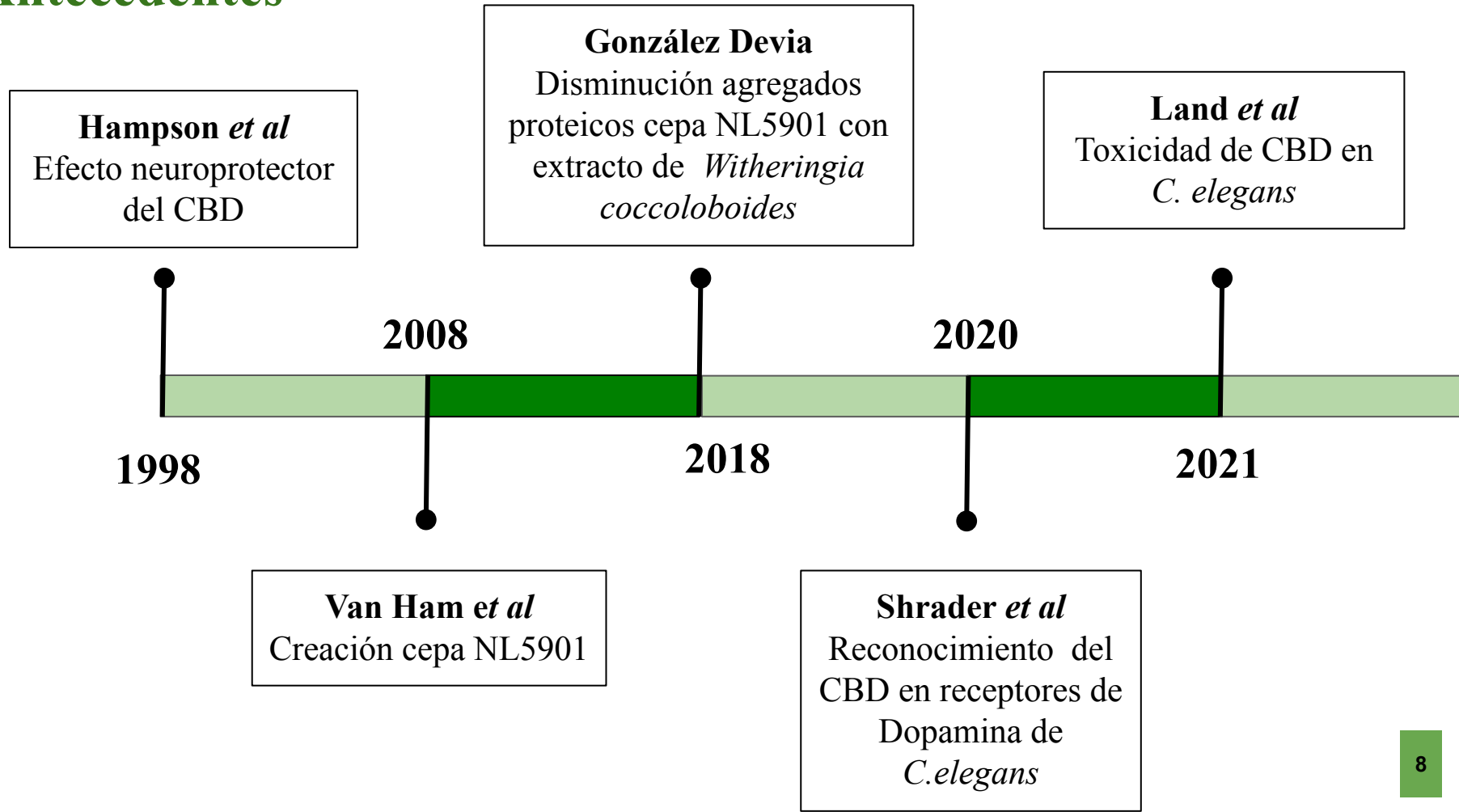


Morales P, Hurst DP, Reggio PH. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Phytocannabinoids*. 25 de enero de 2017;103:103-31.
Shrader SH, Tong Y-G, Duff MB, Freedman JH, Song Z-H. Involvement of dopamine receptor in the actions of non-psychoactive phytocannabinoids. *Biochem Biophys Res Commun*. diciembre de 2020;533(4):1366-70.

2. Objetivo General

Evaluar el efecto del cannabidiol (CBD) de *Cannabis sativa*, en la cepa NL5901 y N2 Bristol de *Caenorhabditis elegans*

3. Antecedentes



4. Metodología

Obtención del CBD



5 mg
CBD



3,97 mL Etanol



4 mM



Obtención cepas



Ceba N2 Bristol



Ceba NL5901



E. coli OP50

Centro de Genética de Caenorhabditis (CGC)

4. Metodología

Mantenimiento y Reactivación



Medio NGM:

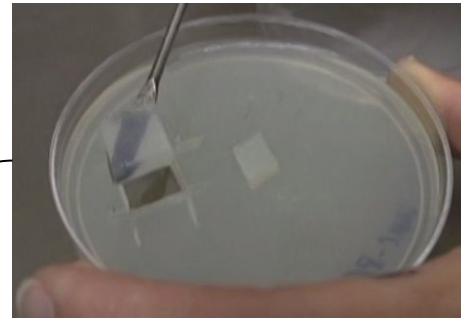
NaCl
Agar
Peptona

} Agua Destilada

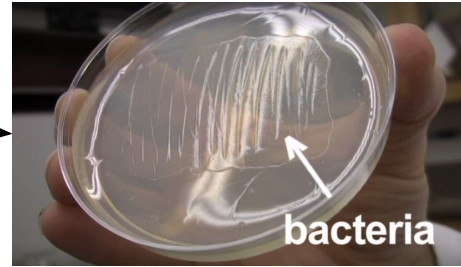
Enriquecimiento:

CaCl₂
Colesterol
Buffer KPO₄

Protocolo Grupo Biotecnología y Genética



Cepa de estudio con presencia de nematodos



E. coli OP50



20 °C
3 a 4 días

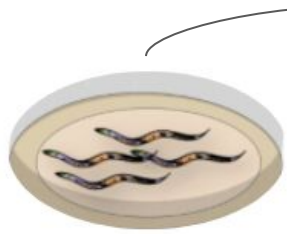
4. Metodología

DL50

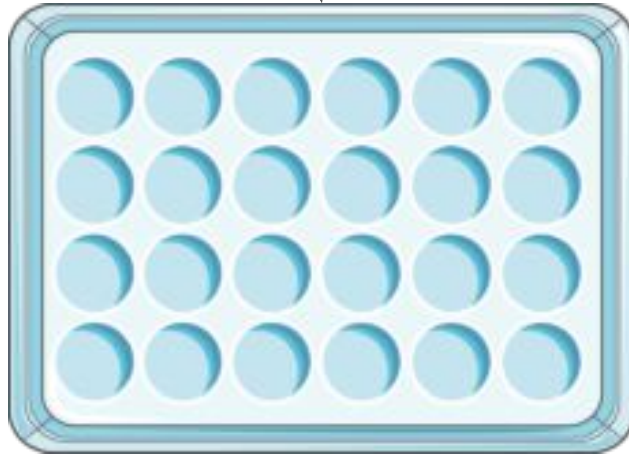
0 Horas
3 Horas
6 Horas



200 uL



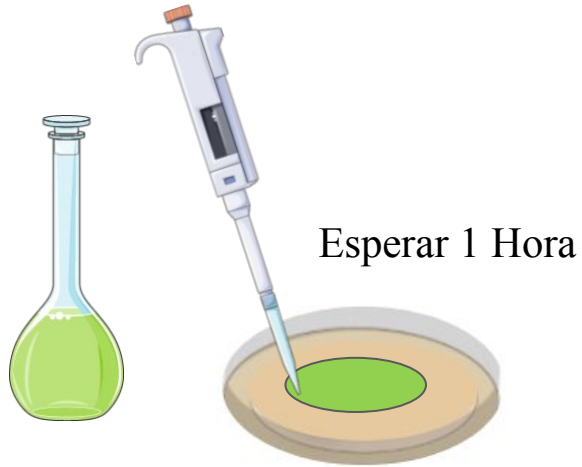
10 a 20 larvas L4



- 1- Control de medio K
- 2- Control de solvente (Etanol 75%)
- 3- Concentración 3000 μM
- 4- Concentración 300 μM
- 5- Concentración 30 μM
- 6- Concentración 3 μM
- 7- Concentración 0.3 μM

4. Metodología

Preparación de las cajas con el tratamiento



Estadio L4

2.4 mL NGM
100 uL CBD

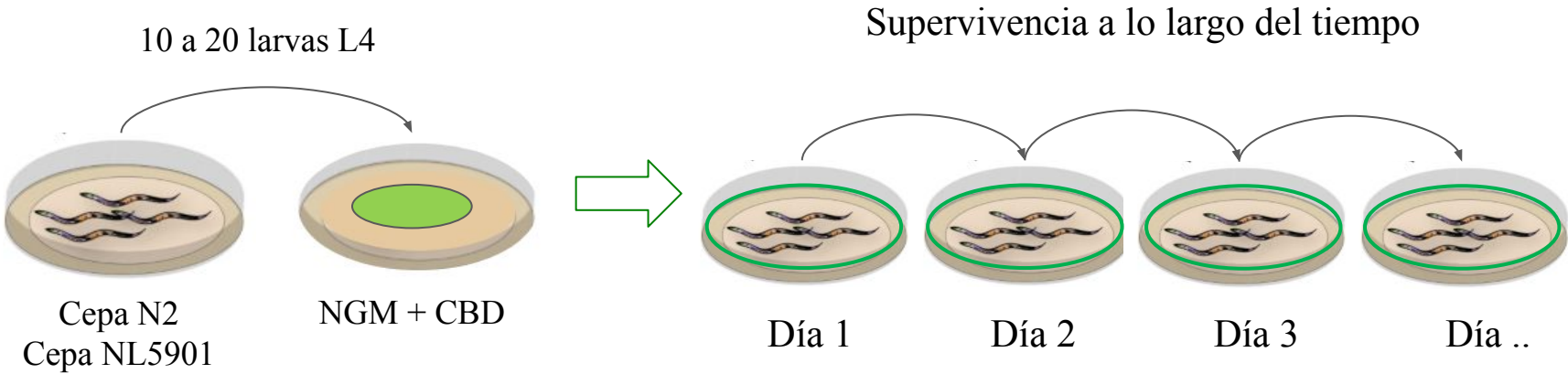
750 uM → 30 uM

75 uM → 3 uM

7.5 uM → 0.3 uM

4. Metodología

Ensayo Longevidad

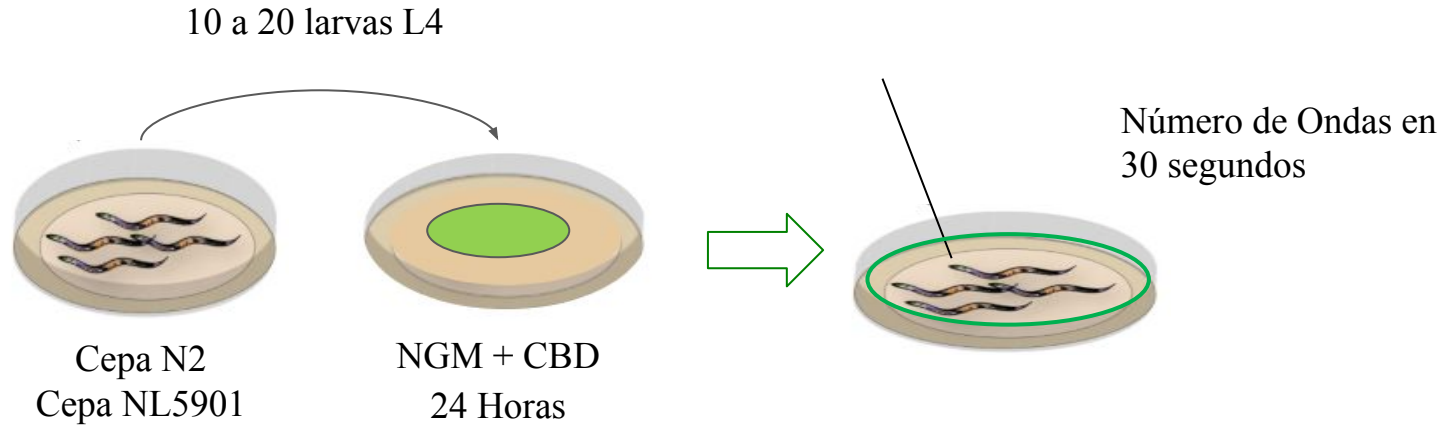


Día 1 a 8: Pases diarios

Día 8 en adelante: Cada 2 o 3 días

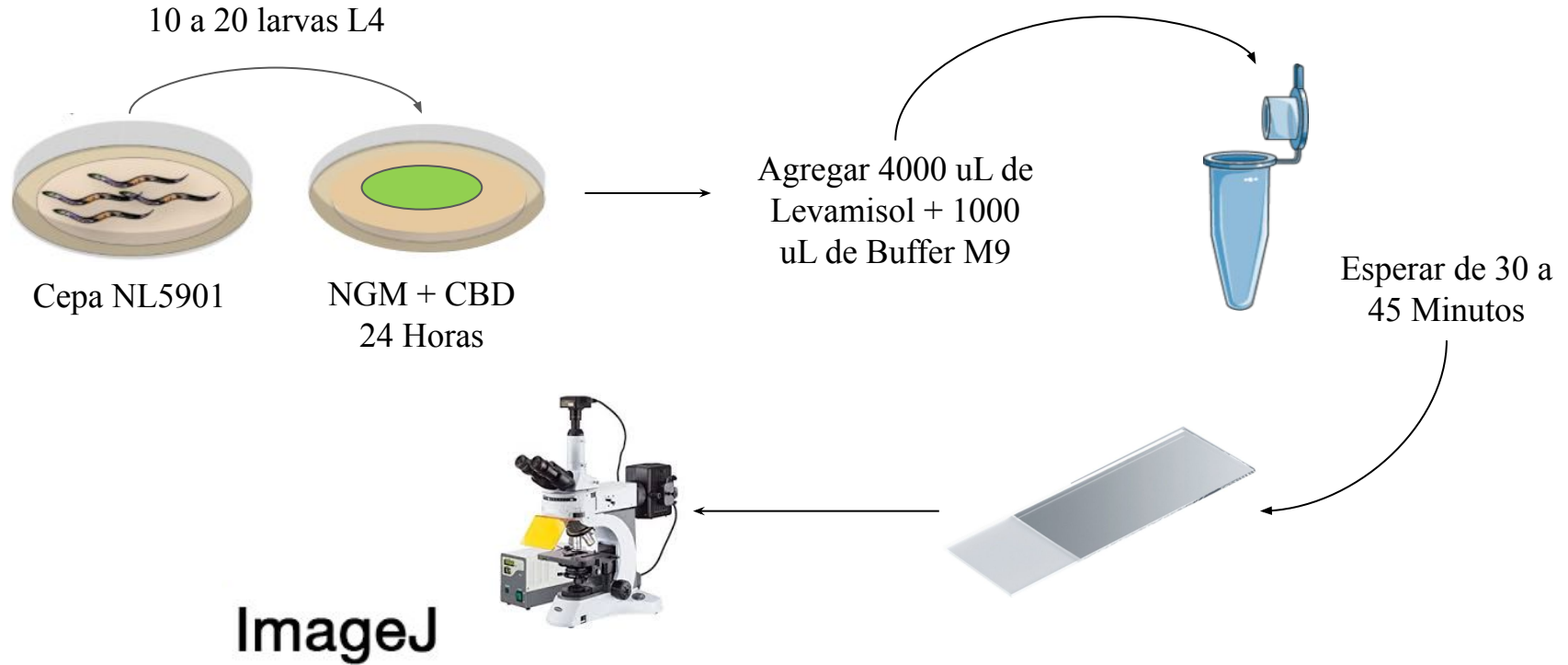
4. Metodología

Ensayo Movilidad



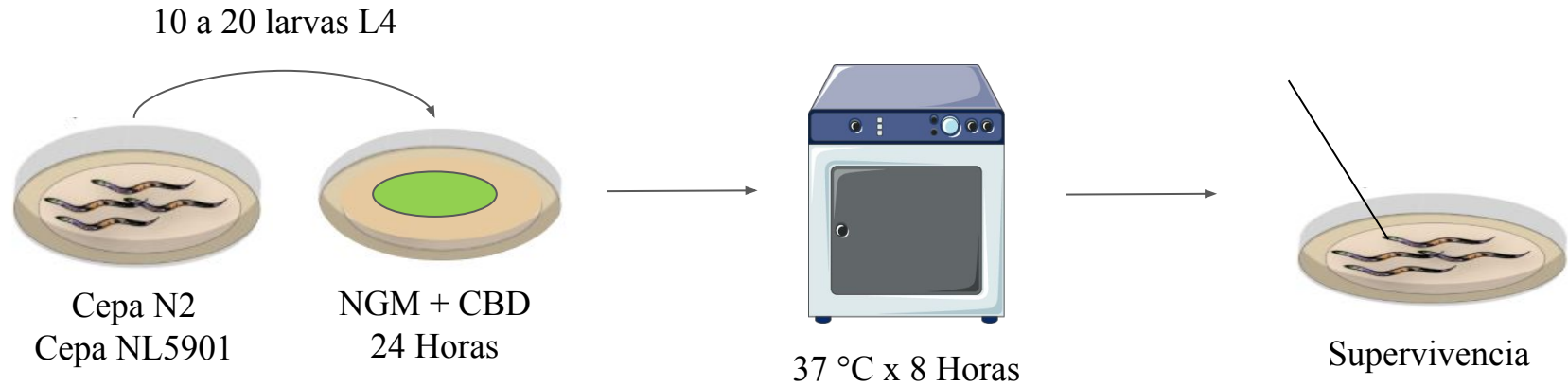
4. Metodología

Determinación
Agregados proteicos

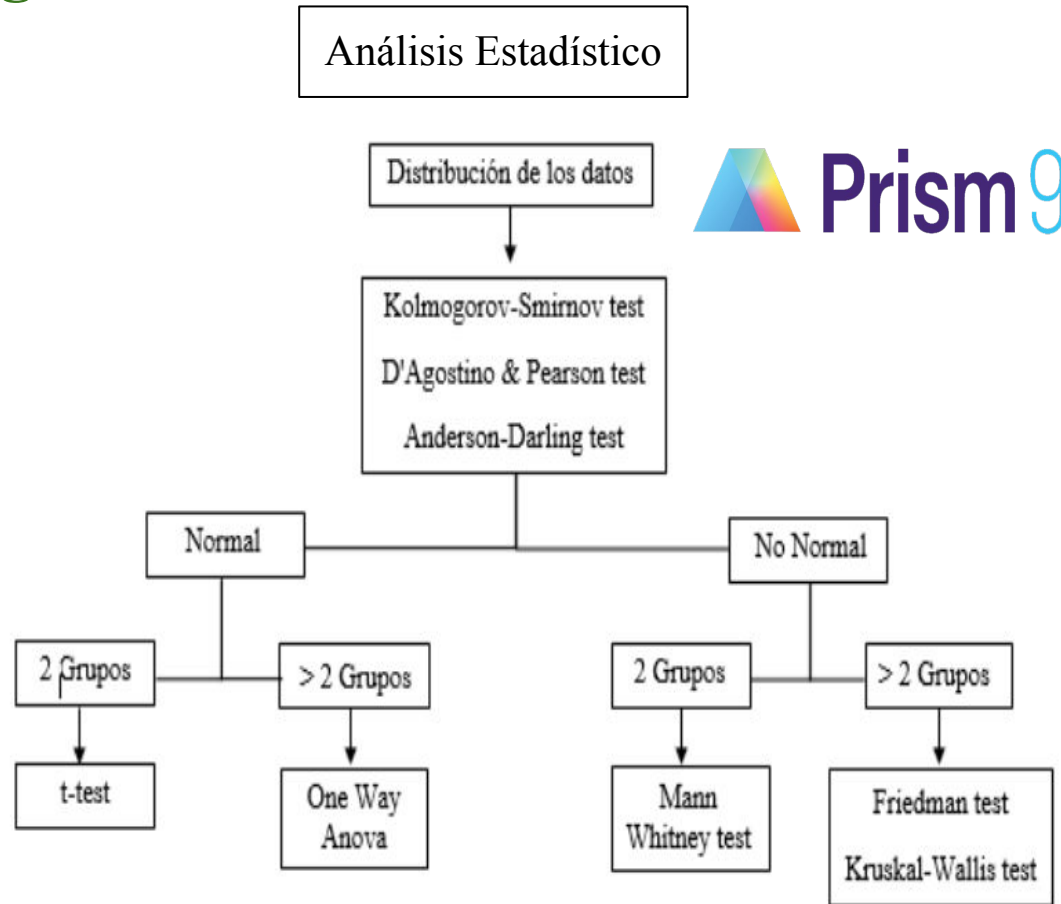


4. Metodología

Tolerancia al
Estrés Térmico



4. Metodología



Valor de $p < 0.05$

5. Resultados y Discusión

Caracterización de las cepas

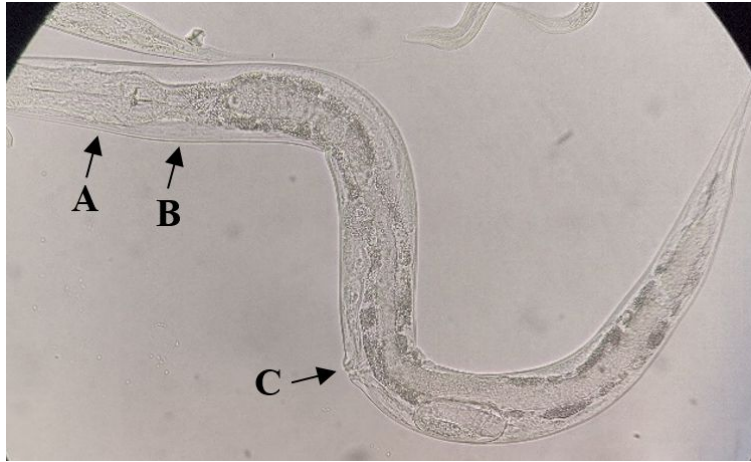


Figura 1. Nematodo en estadio larvario L4. Se observan partes del cuerpo en objetivo de 20X **A.** La faringe, **B.** El esófago y **C.** La vulva.

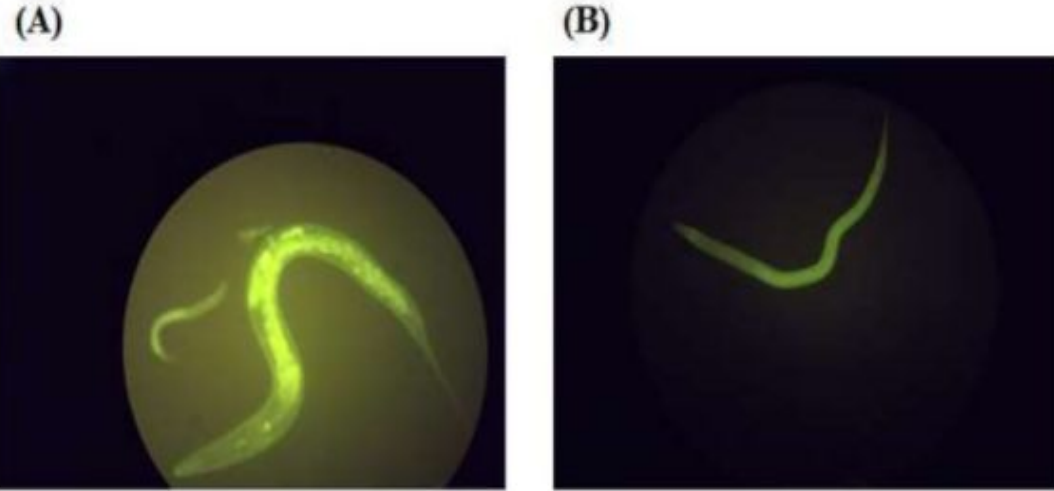


Figura 2. Presencia agregados alfa sinucleína. Se observan nematodos de la cepa NL5901 con presencia de agregados proteicos en microscopio de fluorescencia, (A) Estadio Adulto, en objetivo 20 X. (B) Estadio L3, en objetivo 10 X.

Ciclo de vida, Altun y Hall
Identificación del cuerpo, Cheg y McColl

Caracterización de las cepas

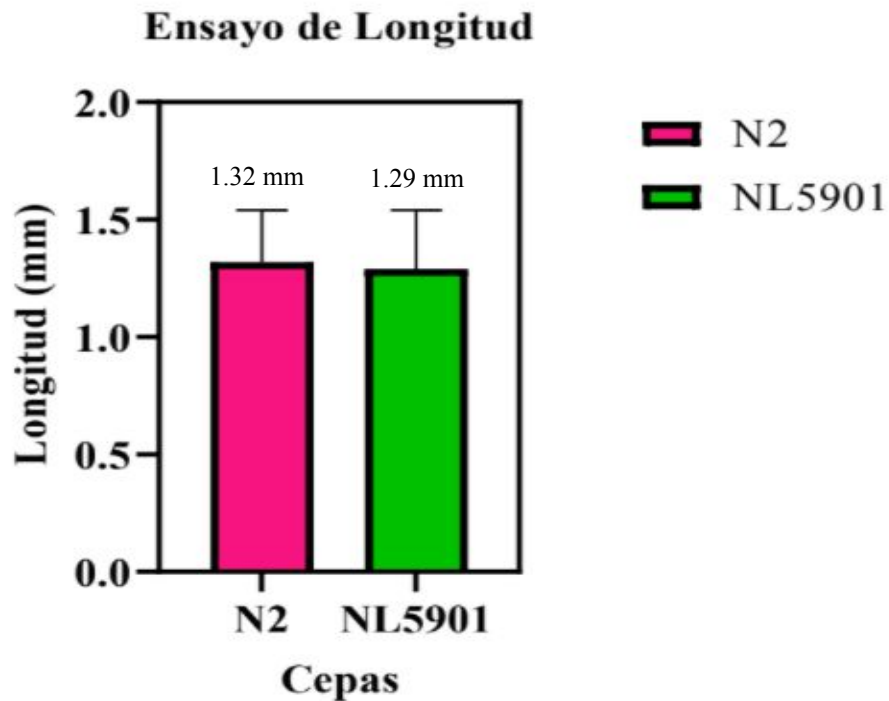


Figura 3. Ensayo de Longitud. Comparación de la longitud entre nematodos de la cepa N2 (color fucsia) y NL5901 (color verde).

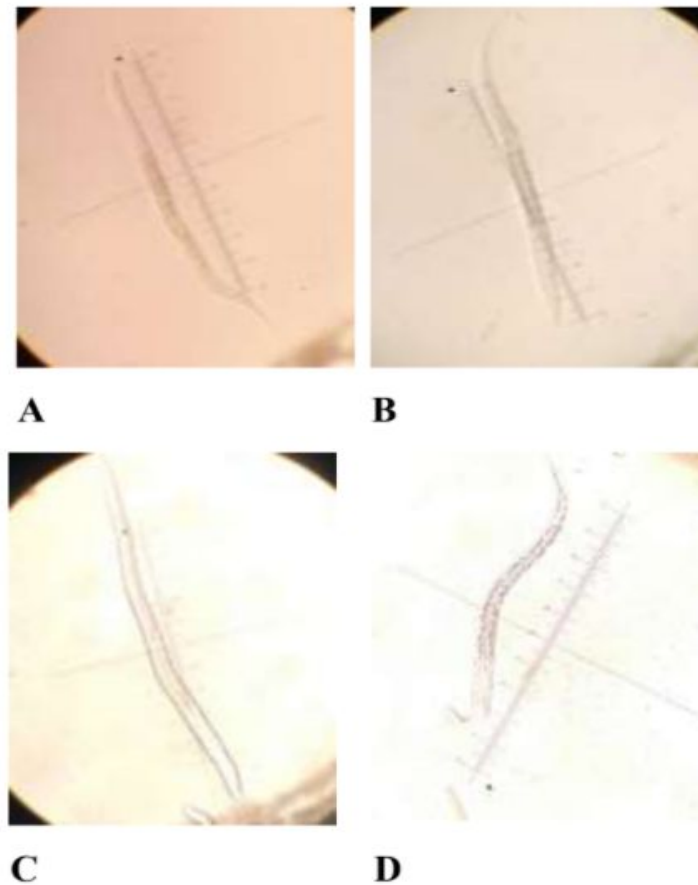


Figura 4. Nematodos observados al microscopio con reglilla. Se observan nematodos inmovilizados con levamisol 1mM en microscopio con reglilla con objetivo de 100X (A, B) Cepa N2 Bristol. (C, D) Cepa NL5901.

Identificación soluciones de trabajo de CBD

Dosis Letal 50 N2 Bristol

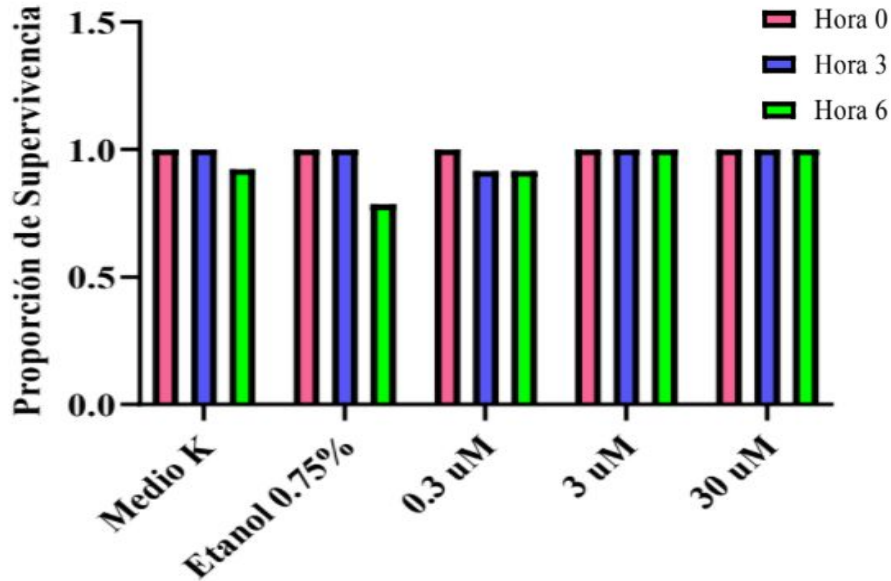


Figura 7. Ensayo de Dosis Letal 50 N2 Bristol. Se observa la proporción de supervivencia en nematodos de la cepa N2 Bristol tratados con Medio K, Etanol 0.75% y concentraciones de CBD a 0.3, 3 y 30 uM

3000 y 300 uM = Parálisis: Interacción con los receptores de la dopamina

Dosis Letal 50 NL5901

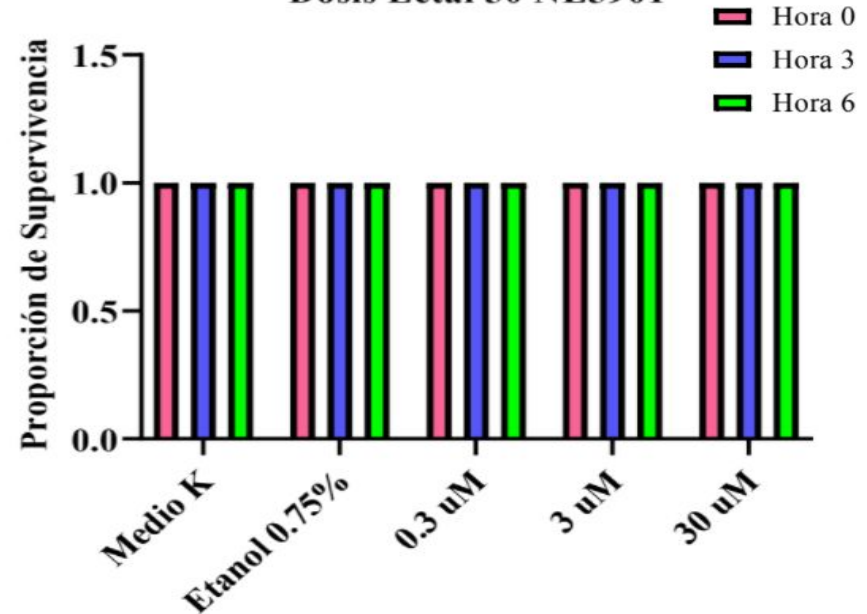


Figura 8. Ensayo de Dosis Letal 50 NL5901. Se observa la proporción de supervivencia en nematodos de la cepa NL5901 tratados con Medio K, Etanol 0.75% y concentraciones de CBD a 0.3, 3 y 30 uM.

Medio K, Shrader *et al* y Windy *et al*
No Hubo parálisis, Land *et al* (4000 y 400 uM)

1. Describir la esperanza de vida y movilidad en las cepas de *C. elegans*.

Ensayo de Longevidad

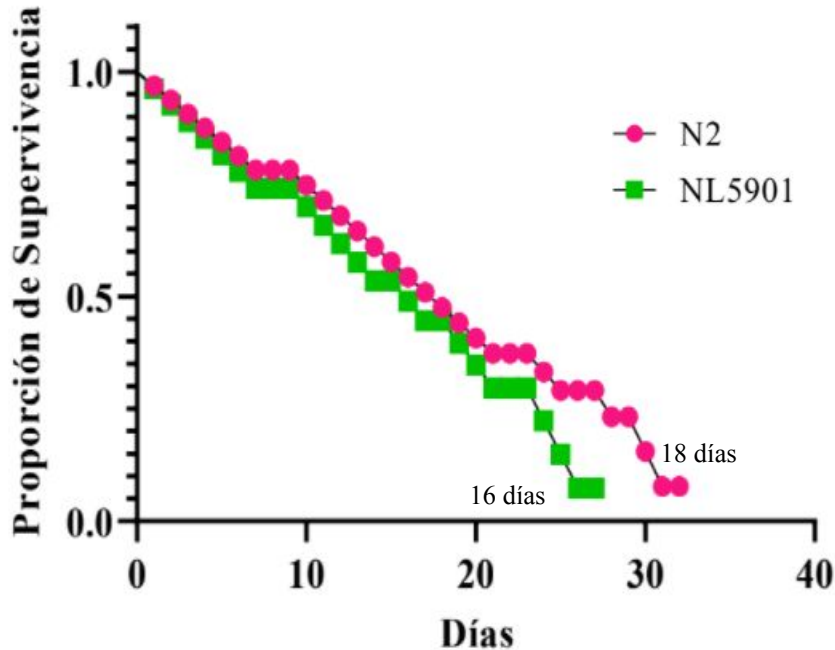
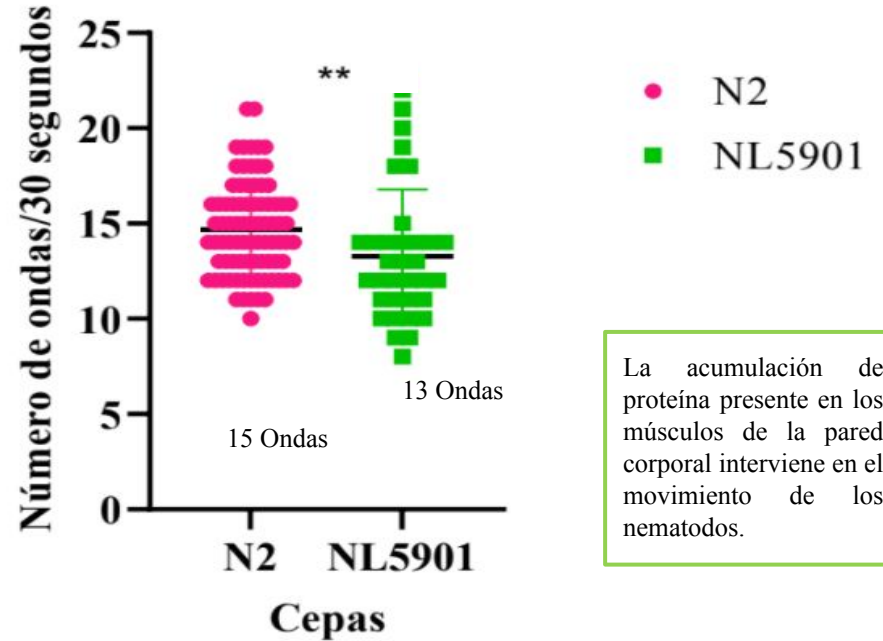


Figura 5. Ensayo de Longevidad. Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa N2 Bristol (color fucsia) y NL5901 (color verde)

Ensayo de Movilidad



La acumulación de proteína presente en los músculos de la pared corporal interviene en el movimiento de los nematodos.

Figura 6. Ensayo de Movilidad. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa N2 (color fucsia) y NL5901 (color verde)

2. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre la esperanza de vida y movilidad de la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.

Aumento en la esperanza de vida: Efecto Antioxidante

Aumento de la vida útil, Land *et al*

Efecto del CBD sobre la Longevidad, Cepa N2 Bristol

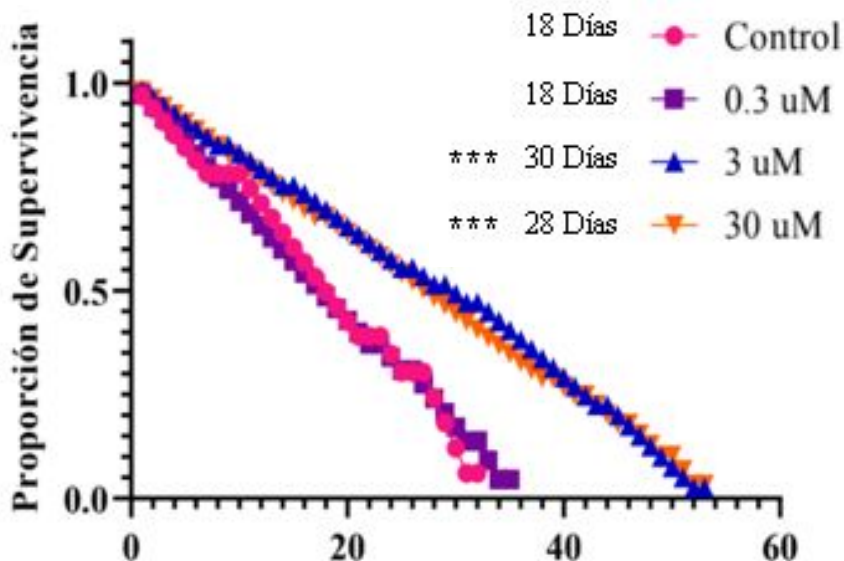


Figura 9. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa N2 Bristol.

Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa N2 Bristol

Efecto del CBD sobre la Longevidad, Cepa NL5901

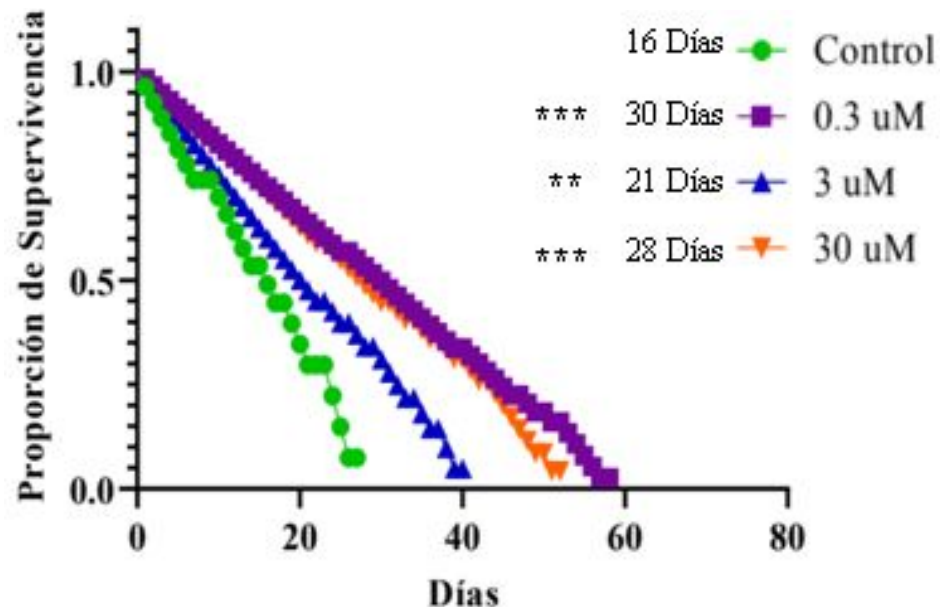
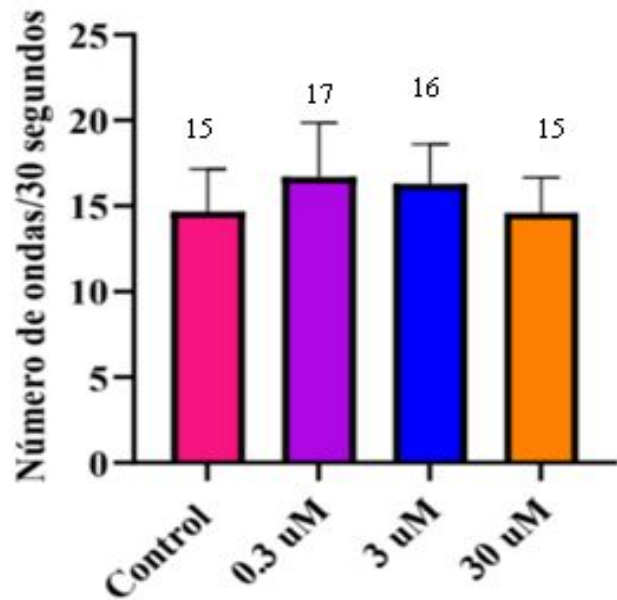


Figura 10. Efecto del CBD sobre la longevidad, Cepa NL5901.

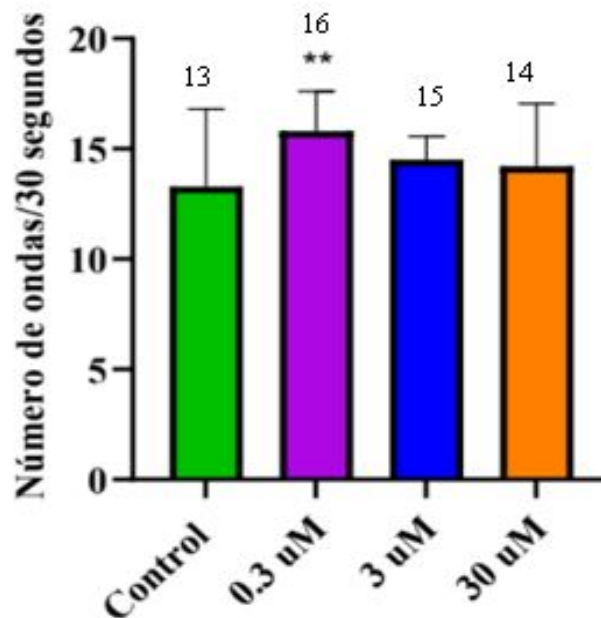
Se observan las curvas de proporción de supervivencia para nematodos de la cepa NL5901..

2. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre la esperanza de vida y movilidad de la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.

Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa N2 Bristol



Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa NL5901



Aumento de la movilidad se relaciona con disminución en la agregados de alfa sinucleína sobre 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.

Figura 11. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa N2 Bristol. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa N2

Figura 12. Efecto del CBD sobre la Movilidad, Cepa NL5901. Comparación del número de ondas entre nematodos de la cepa NL5901

Extracto etanólico de
Witheringia coccoloboides,
González Devia

3. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre los agregados de α sinucleína en la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.

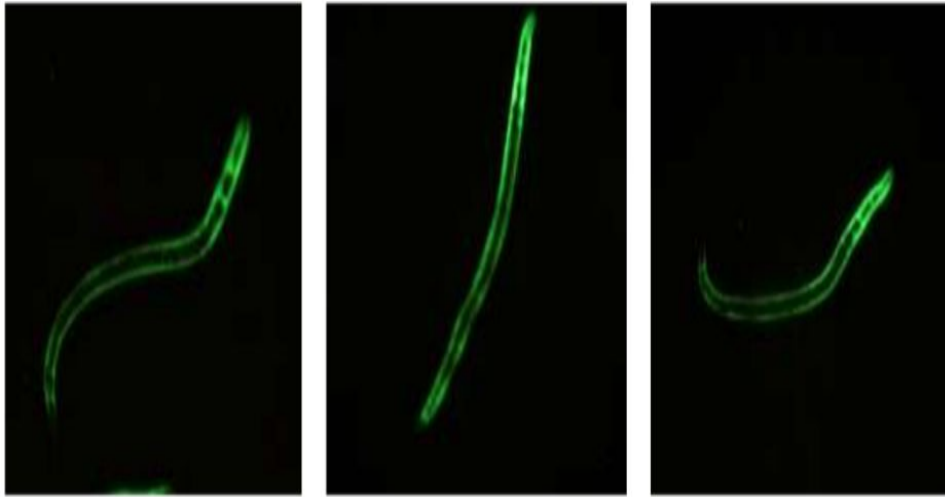


Figura 13. Nematodos tratados con CBD. Se observan nematodos de la cepa NL5901 tratados con concentraciones de CBD 0.3 μ M, 3 μ M y 30 μ M, inmovilizados con levamisol 1mM en microscopio de fluorescencia con objetivo 10X.

**Reducción de agregados proteicos:
Extracto de witheringia coccoloboides, Arias *et al*
Cúrcuma, Fajardo**

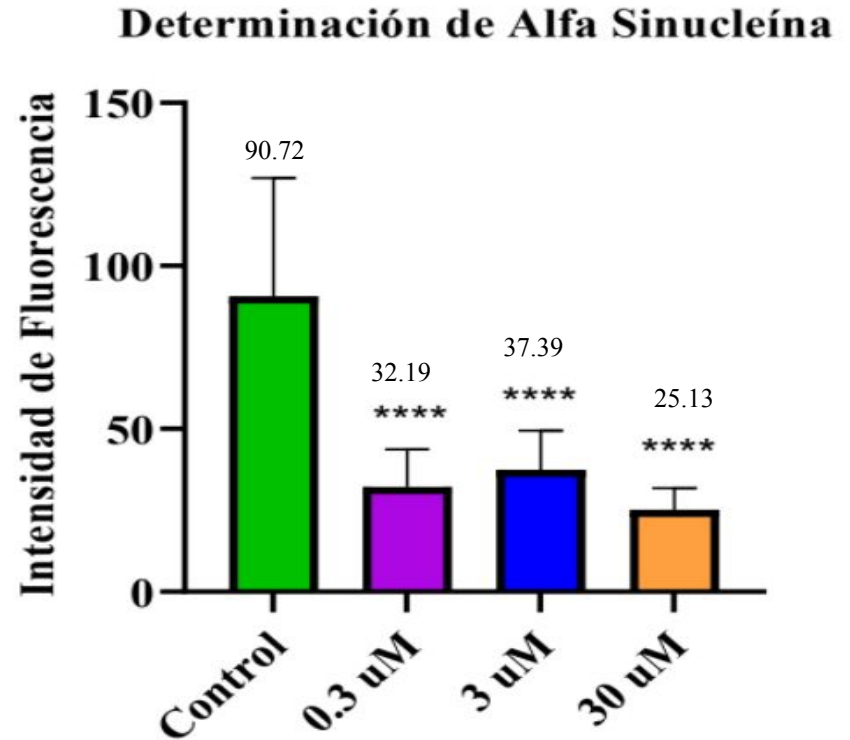


Figura 14. Determinación de alfa sinucleína. Comparación de la intensidad de fluorescencia entre nematodos de la cepa NL5901 sin tratamiento (color verde) tratados con concentraciones de CBD

3. Determinar el efecto del CBD de *C. sativa* sobre los agregados de α sinucleína en la cepa transgénica NL5901 de *C. elegans*.

Primer reporte del efecto del CBD sobre la agregación de alfa sinucleína *in vivo*, en un modelo de *C. elegans*

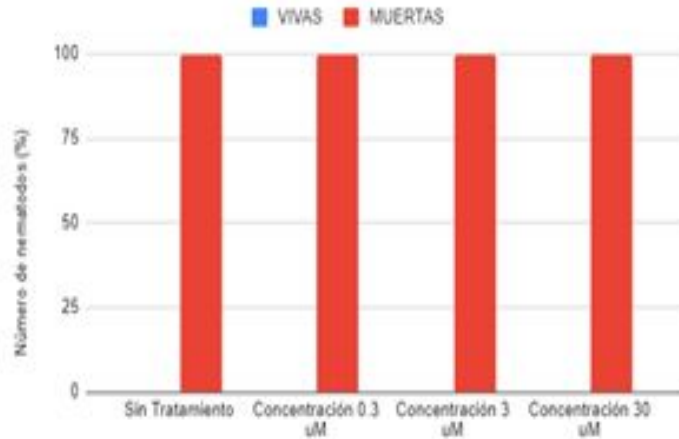
Fernagut y Chesselet, Modelos transgénicos que sobreexpresan alfa sinucleína - α Syn A53T

Zhao *et al*, efecto neuroprotector del CBD por medio de microfotografías histopatológicas - Presencia o ausencia de cuerpos de Lewy



4. Evaluar el efecto del CBD sobre el estrés térmico en las cepas de *C. elegans*.

Tolerancia el estrés térmico cepa N2




Tolerancia el estrés térmico cepa NL5901





Se sugiere evaluar el posible efecto protector del CBD frente al estrés térmico por menor tiempo de incubación a 35° C.


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


6. Conclusiones

 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.

 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. Ponencias



XIX ENCUENTRO REGIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN 2021
"LOS SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN EN PANDEMIA
RETOS PARA LOS PROCESOS DE FORMACIÓN"

La Fundación Red Colombiana de Semilleros de Investigación RedColSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca

Otorga certificado a:

Karen Lorena Hidalgo Pulido

Con cedula de ciudadanía: 1.000.833.588
en calidad de: **Ponente**

En el XIX Encuentro Regional de Semilleros de Investigación,
Nodo - Bogotá - Cundinamarca Modalidad Virtual, durante los días 10 al 14 de Mayo de 2021.

Carlos Carranza
Carlos Edwin Carranza Gutiérrez
Coordinador RedColSI
Nodo Bogotá - Cundinamarca

German Eduardo Vargas Zapata
German Eduardo Vargas Zapata
Nodo Bogotá - Cundinamarca



FUCS

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD - FUCS

Certifica que el trabajo titulado:

Evaluación del efecto del fitocannabinoide CBD en la cepa NL5901 de *Caenorhabditis elegans*.

Realizado por los siguientes autores:

Karen Lorena Hidalgo Pulido, Alejandra Mantilla Galindo.

Fue presentado en la modalidad: **Presentación oral**

En el VI Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación en Ciencias de la Salud - Virtual

Realizado en Bogotá, D.C., Colombia, 25, 26 y 27 de agosto de 2021

En constancia firman:

Dr. Sergio Parra Duarte
Rector

Dr. Edgar Muñoz
Vicerrector Académico

AR3656-1432

VEREDICCIÓN | Resolución 10917 de 1976 MEN. Estatuto vigente - Resolución 021948 de 2020 MEN. Acreditación de Alta Calidad - Resolución 013801 de 2019 MEN Vigencia 4 años



COLNE
Colegio Colombiano de Neurociencias

XII CONGRESO NACIONAL
XIII SEMINARIO INTERNACIONAL
DE NEUROCIENCIAS

IBRO
INTERNATIONAL BRAIN
RESEARCH ORGANIZATION

CERTIFICADO

EL COLEGIO COLOMBIANO DE NEUROCIENCIAS CERTIFICA
QUE SE PRESENTO EN FORMATO PÓSTER EL TRABAJO TITULADO:

"Evaluación del efecto del fitocannabinoide CBD sobre
la agregación de α sinucleína en la cepa transgénica
NL5901 de *C. Elegans*"

AUTORES: Alejandra Mantilla Galindo, Karen Lorena Hidalgo
Pulido, Johanna Lizeth González Devia, Ruth Mélida Sánchez Mora

Bogotá D.C. Junio 18-19 | 25-26 de 2021

Zulma Duhalde Lic. Biol. MSc., PhD
Presidenta COLNE

Mauricio Naranjo MSc., PhD
Director Ejecutivo COLNE

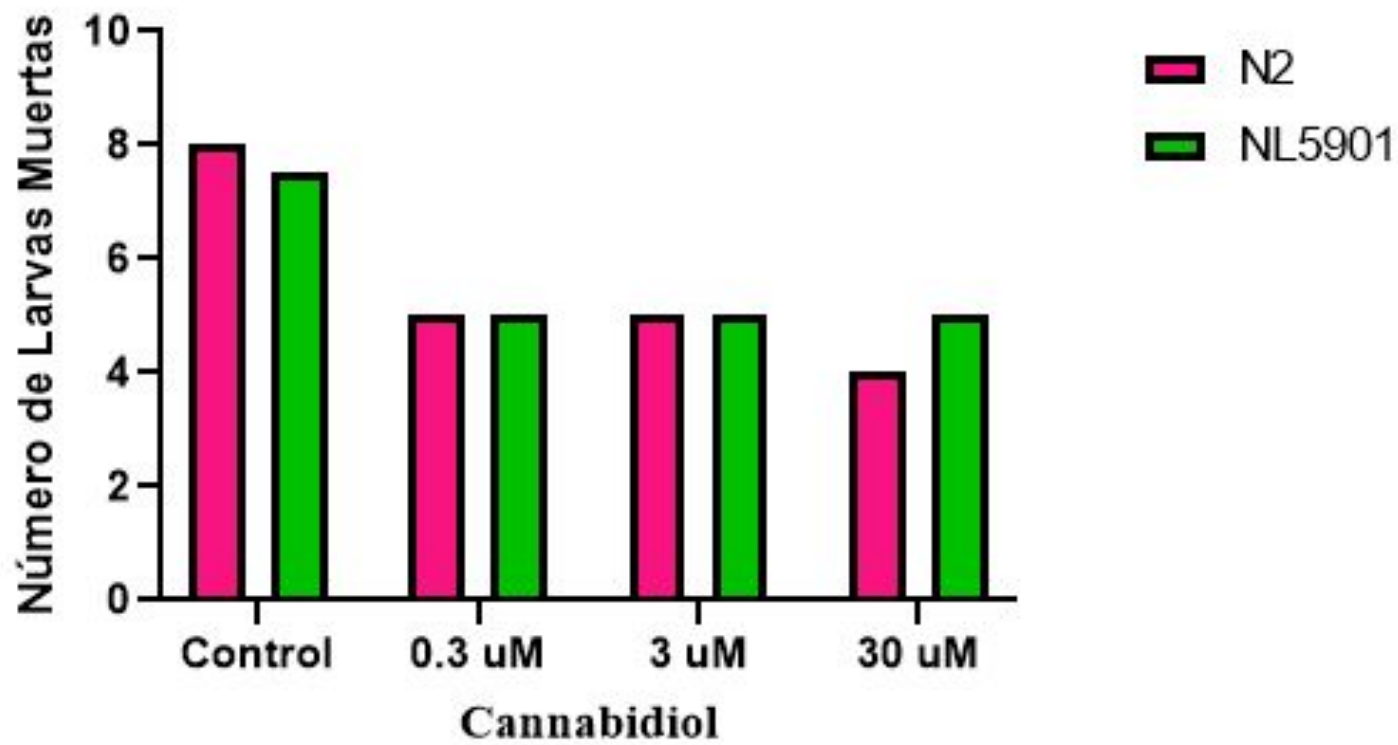
**¡GRACIAS POR SU
ATENCIÓN!**

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%20c3%ad a%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. 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.
5. Shrader SH, Tong Y-G, Duff MB, Freedman JH, Song Z-H. Involvement of dopamine receptor in the actions of non-psychoactive phytocannabinoids. *Biochem Biophys Res Commun*. diciembre de 2020;533(4):1366-70.
6. Maupas E. Modes et formes de reproduce des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale*. 1900;8:463-624.
7. S. BRENNER. THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS. *Genetics*. mayo de 1974;77:71-94.

DIAPPOSITIVAS DE APOYO

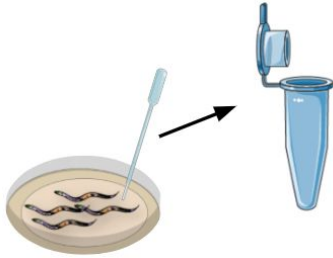
Tolerancia al estrés térmico



4. Metodología

Sincronización

Lavar con 3 mL Buffer M9 durante 5 minutos



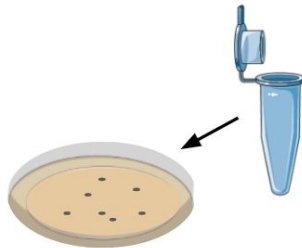
Centrifugar 4000 rpm x 3Min



Agregar 1 mL solución de Bleaching y centrifugar

Realizar tres lavados con Buffer M9

Los huevos se colocan en Medio NGM/*E.coli* OP50



Soluciones DL50

750 uL +
250 uL Medio K

100 uL + 900 uL Medio K



CBD

3000 uM

300 uM

30 uM

3 uM

0.3 uM

5 mg +

3.97 mL Etanol

4mM

Soluciones Ensayos

468.75 uL +
2031.25 uL Medio K



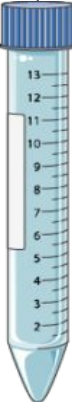
CBD

5 mg +

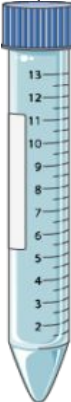
3.97 mL Etanol

4mM

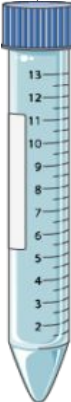
250 uL + 2250 uL Medio K



750 uM



75 uM



7.5 uM

Longitud

10 a 15 nematodos en L4

Se transfieren a NGM/*E.coli* OP50

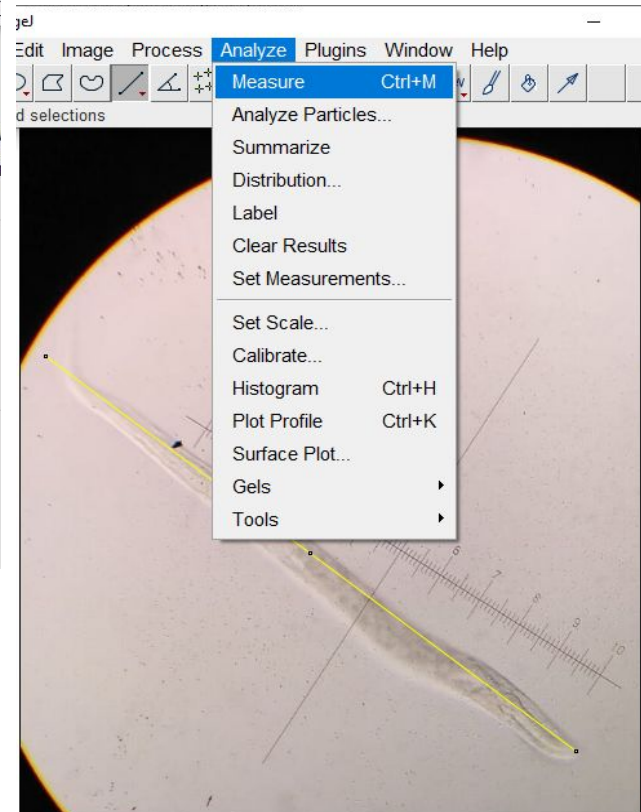
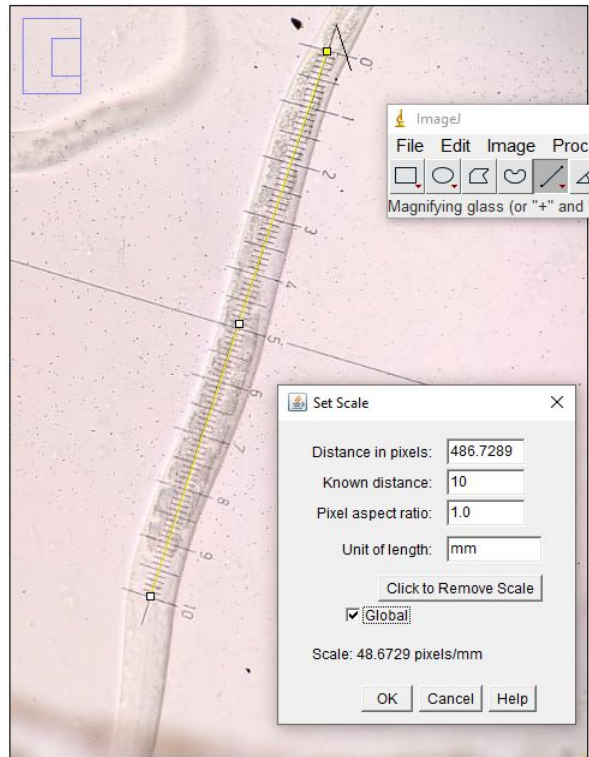
Lavar con 4000 uL de Levamisol 1mM +
1000 uL de buffer M9 durante 4 minutos

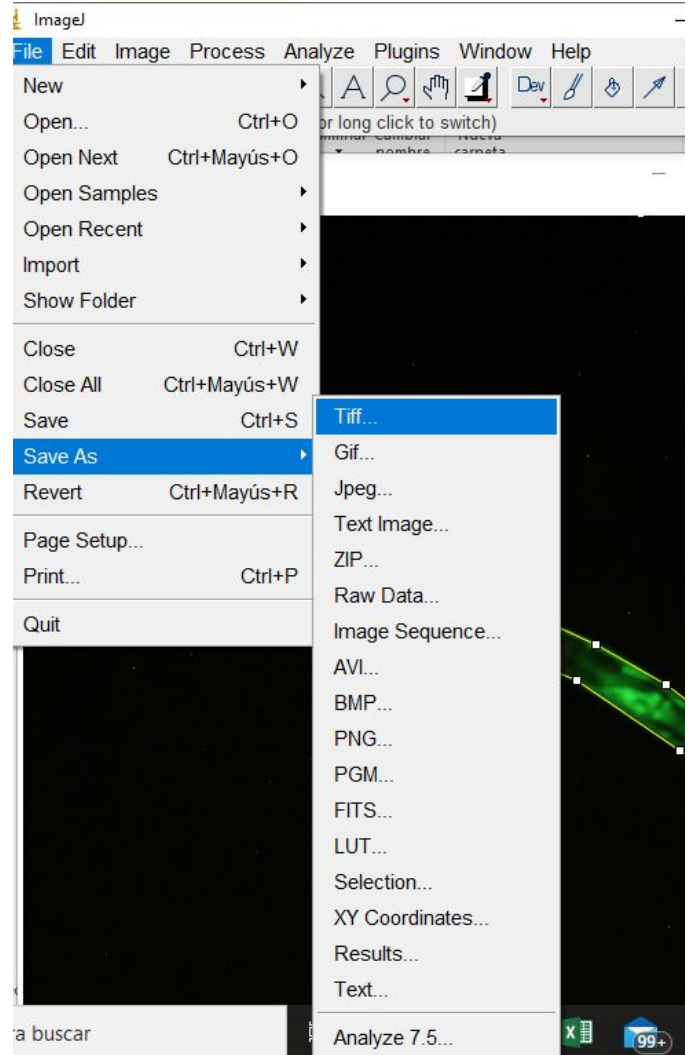
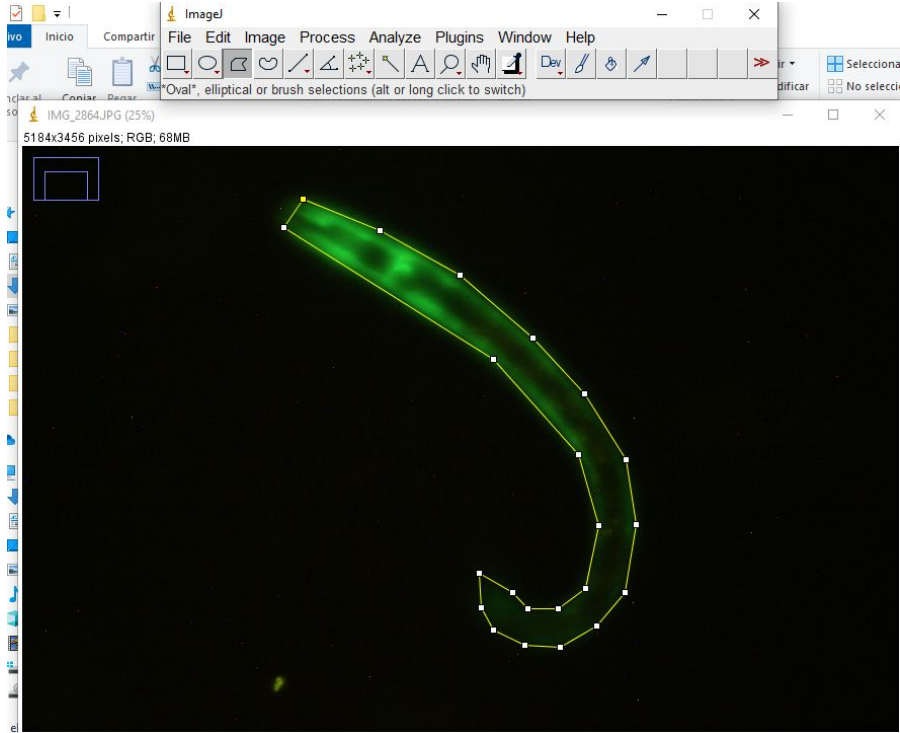
Poner en un tubo eppendorf
y esperar de 30 a 45 minutos

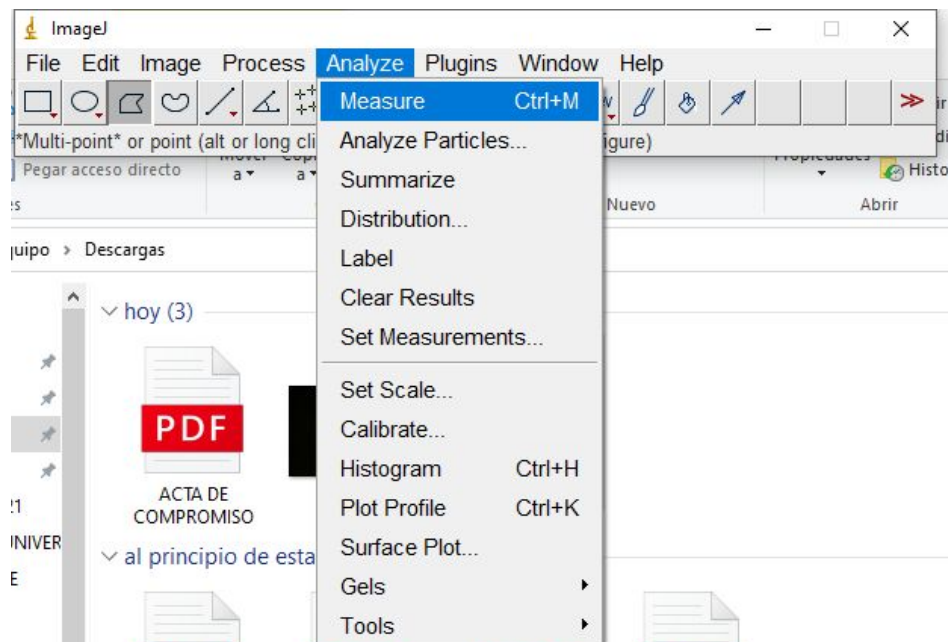
Sacar una gota y poner en
lámina, colocar laminilla

Observar en microscopio con reglilla

Tomar fotos y analizarlas en ImageJ







The screenshot shows the 'Results' window in ImageJ, which displays a table of measurement data. The table has three columns: 'Area', 'Mean', and an unlabeled column. There are four rows of data, numbered 1 through 4.

	Area	Mean	
1	197106	73.118	
2	448458	29.081	
3	258158	23.167	
4	204706	27.757	

CEPA NL5901

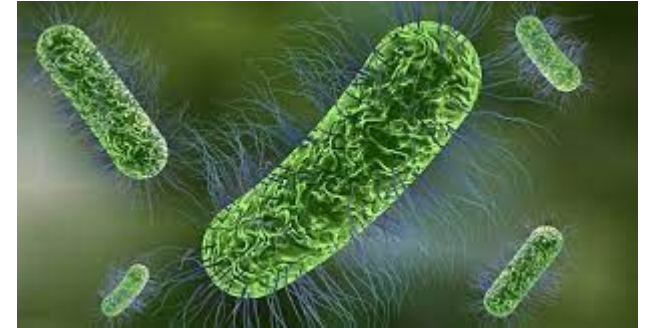
Gen humano mutado

Vector de Clonación

Vector de Transformación

Promotor

YFP



E. coli

UNC 119

UNC 54P

Campana de Gauss

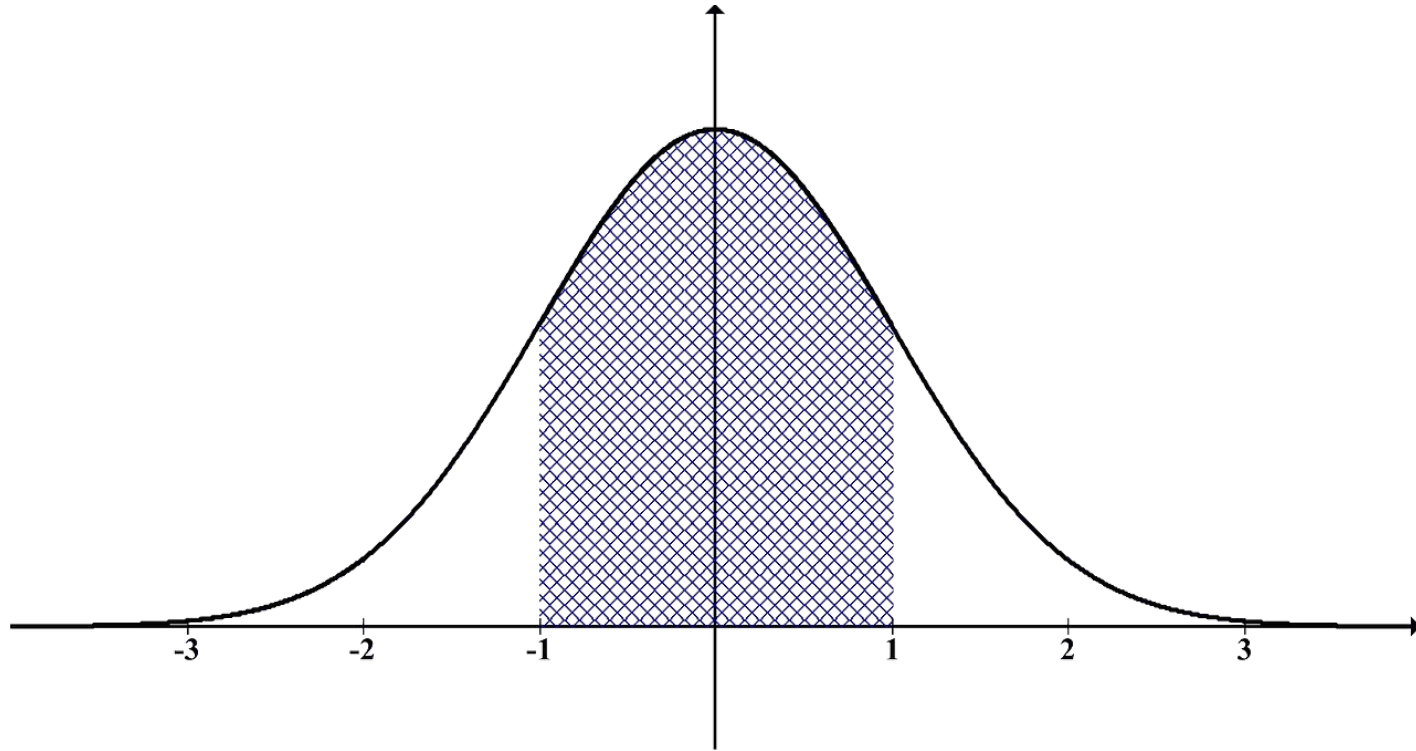


Tabla 2. Análisis Dosis Letal 50

Test de Normalidad						
<u>Kolmogorov-Smirnov test</u>	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			>0,9999		
Las medias son diferentes significativamente ($p < 0.05$)	No			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.

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

	N2			NL5901		
Control vs	0.3 uM	3 uM	30 uM	0.3 uM	3 Um	30 uM
Valor de <i>p</i>	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.](#)

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.](#)

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	<u>ns</u>	*
Test de Mann Whitney		
Valor de p	0,0034	
Resumen del valor p	**	
¿Significativamente diferente ($P < 0.05$)	Yes	

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 <i>p</i>	0,2098	0,8973	0,2480	0,4448
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	Si	Si	Si	Si
Resumen del valor <i>p</i>	<u>ns</u>	<u>Ns</u>	<u>ns</u>	<u>ns</u>
ANOVA Una-vía				
Valor de <i>p</i>	0,0345			
Resumen del valor <i>p</i>	*			
¿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 <i>p</i>	0,0469	0,9777	0,7332	0,4424
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	No	Si	Si	Si
Resumen del valor <i>p</i>	*	<u>ns</u>	<u>Ns</u>	<u>ns</u>
Test de <u>Kruskal-Wallis</u>				
Valor de <i>p</i>	0,0147			
Resumen del valor <i>p</i>	*			
Las medias son diferentes significativamente ($p < 0.05$)	Si			

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

	Control	0.3 μ M	3 μ M	30 μ M
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 p	0,1728	0,1478	0,2326	0,9751
¿Pasa el test? (alfa=0.05)?	Si	Si	Si	Si
Resumen del valor p	ns	Ns	ns	Ns
ANOVA Una-vía				
Valor de p	<0,0001			
Resumen del valor p	****			
Las medias son diferentes				
significativamente ($p < 0.05$)	Si			

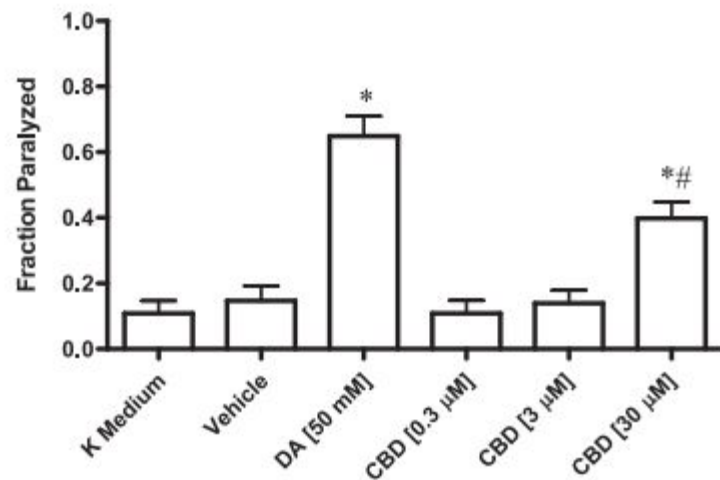
Estadística Descriptiva, test de normalidad y prueba paramétrica de ANOVA Una-vía para la cepa NL5901 en el ensayo de determinación de alfa sinucleína. Los datos fueron analizados por el programa GraphPad Prism 9.3.1.

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

	Control vs 0.3 μ M	Control vs 3 μ M	Control vs 30 μ M
Valor de p	<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.

A



B

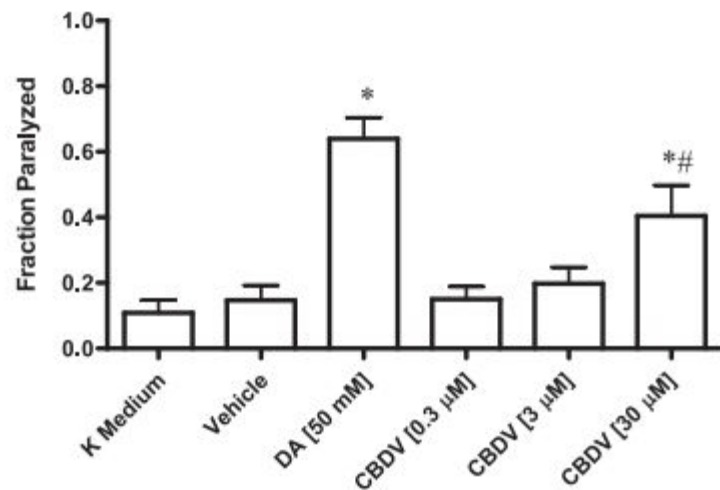
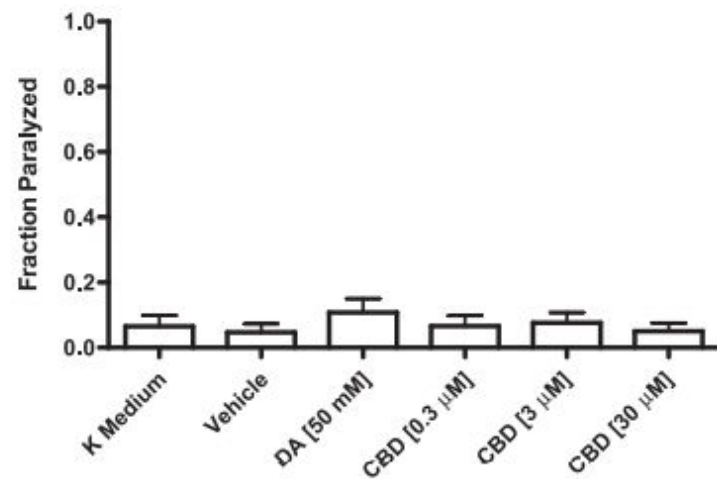


Fig. 1. Phytocannabinoid-induced paralysis in N2 wild type nematodes. Extent of

A



B

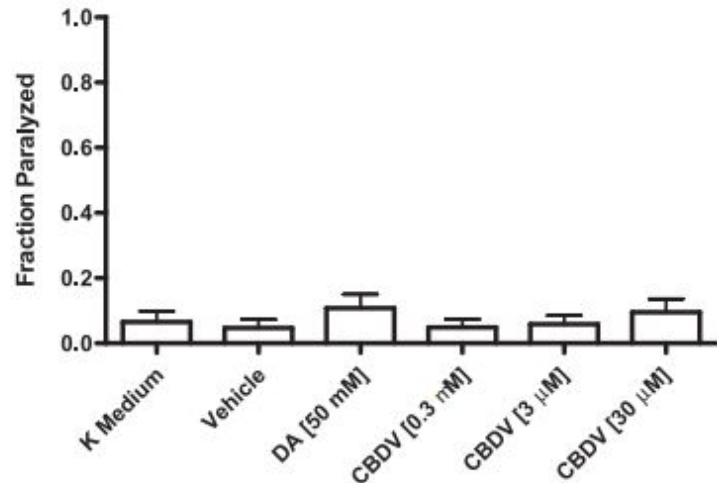


Fig. 2. Lack of paralysis in phytocannabinoid-treated *dop-3* mutants. CBD (Fig. 2A)

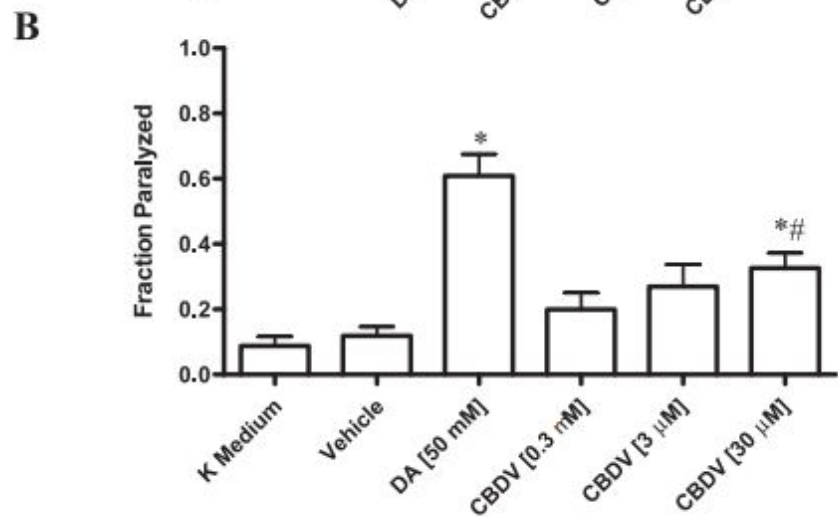
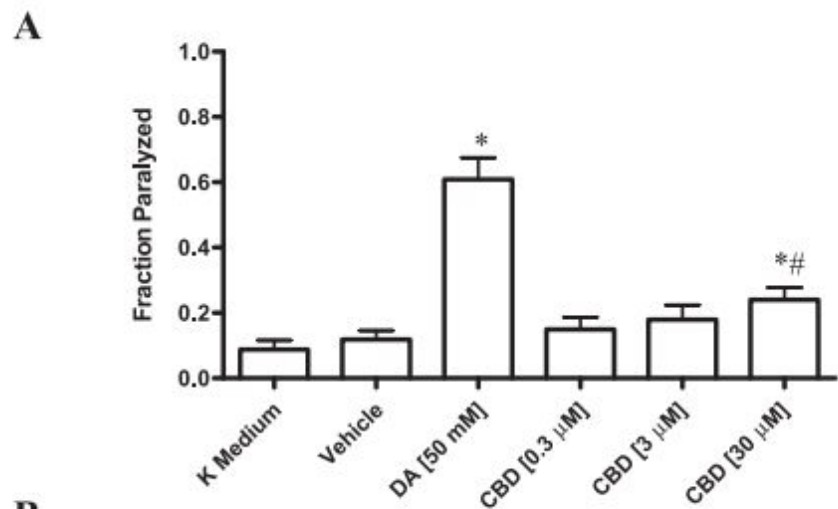


Fig. 3. Phytocannabinoids-induced paralysis in *cat-2* mutants. Extent of paralysis

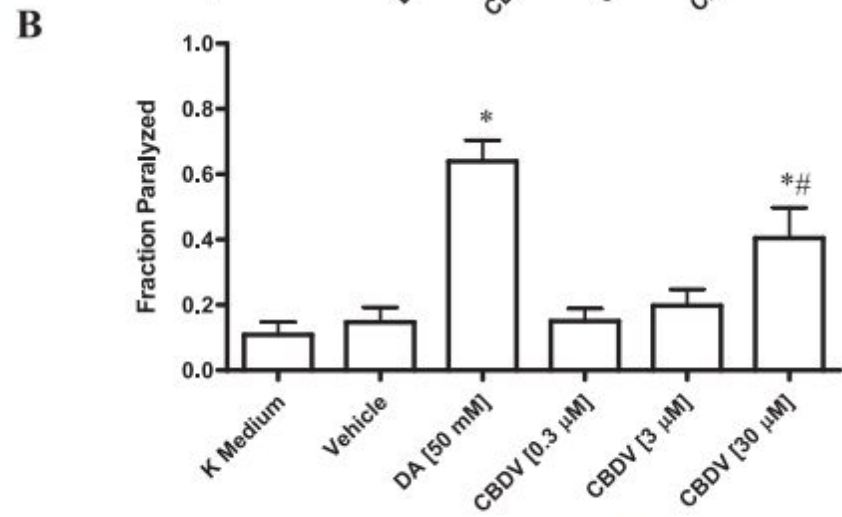
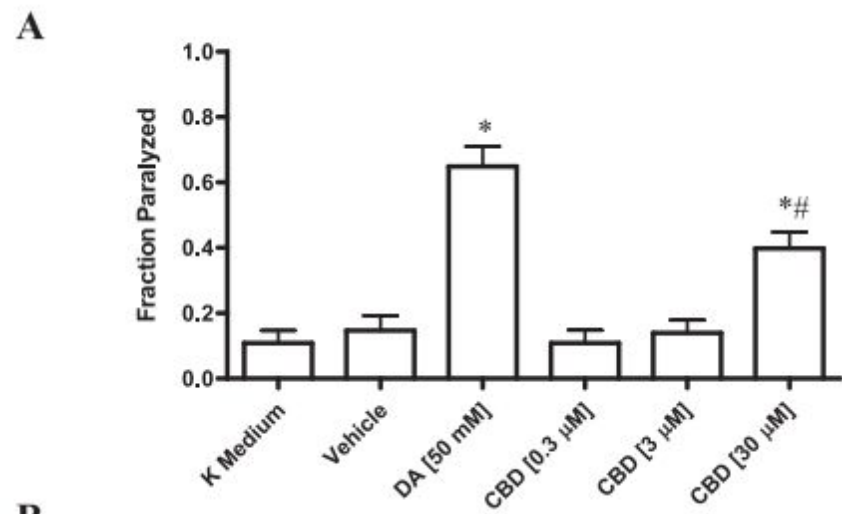
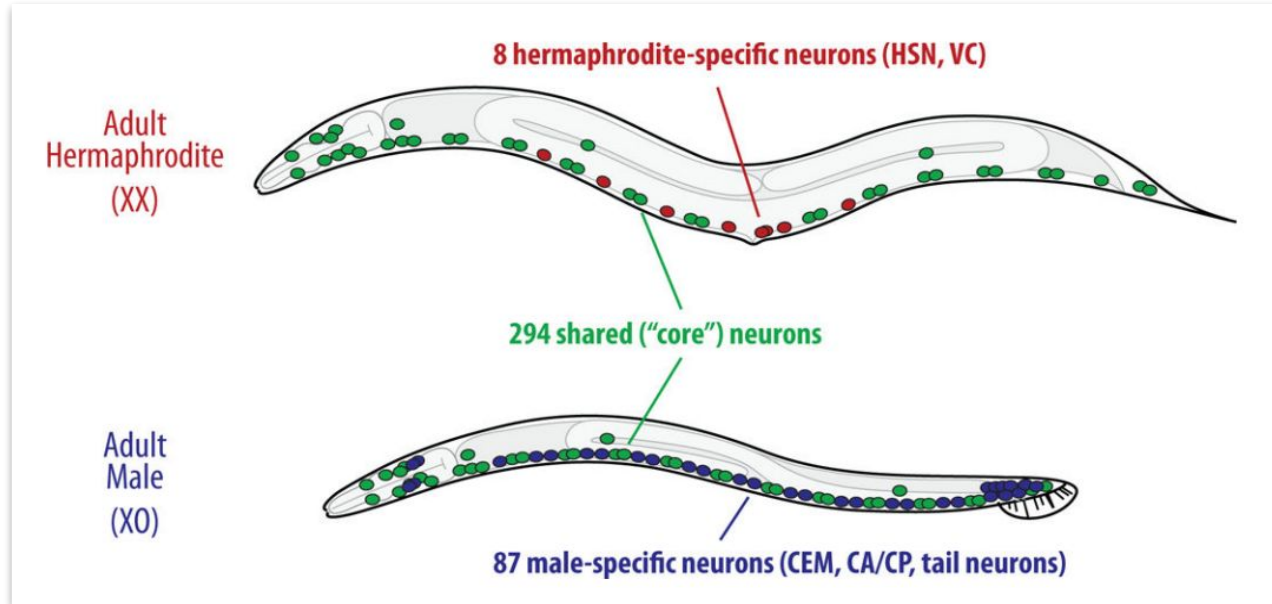


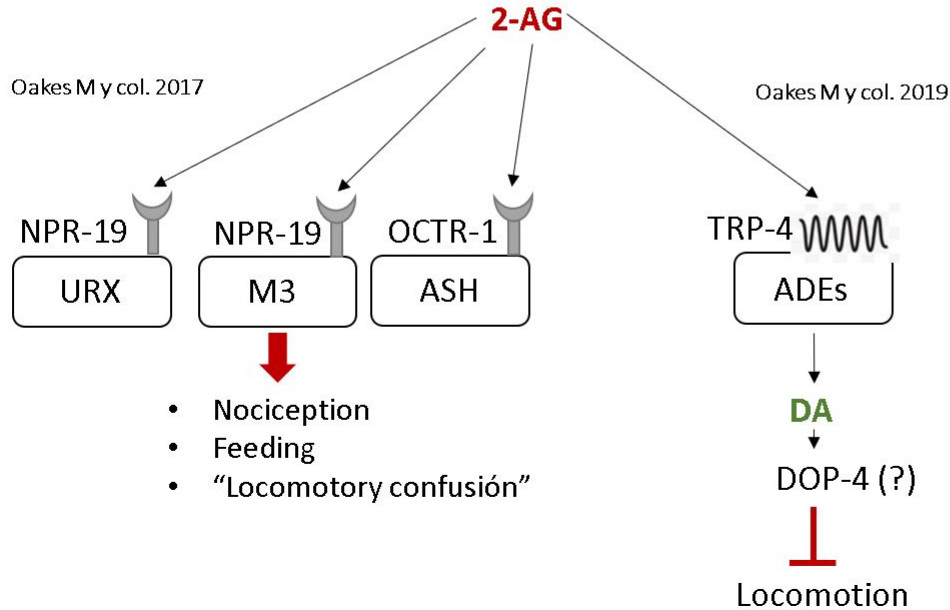
Fig. 4. Co-treatment of phytocannabinoids and dopamine induced paralysis in N2

Sistema Nervioso *C. elegans*

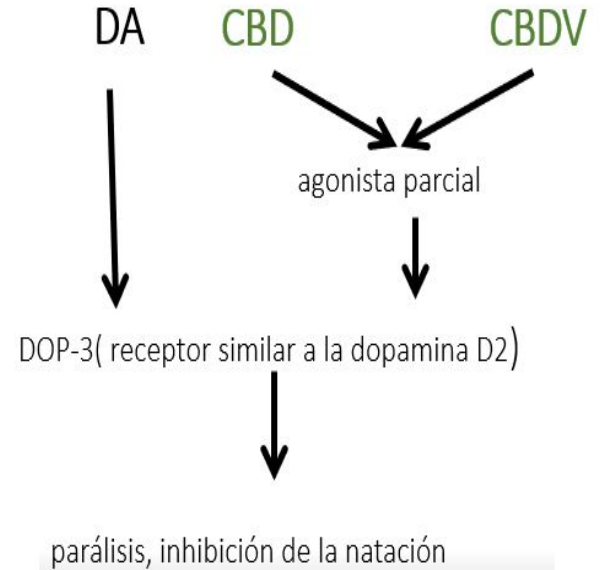


- 50 células de la glía de origen neuroepitelial
- 6 células gliales de origen mesodérmico

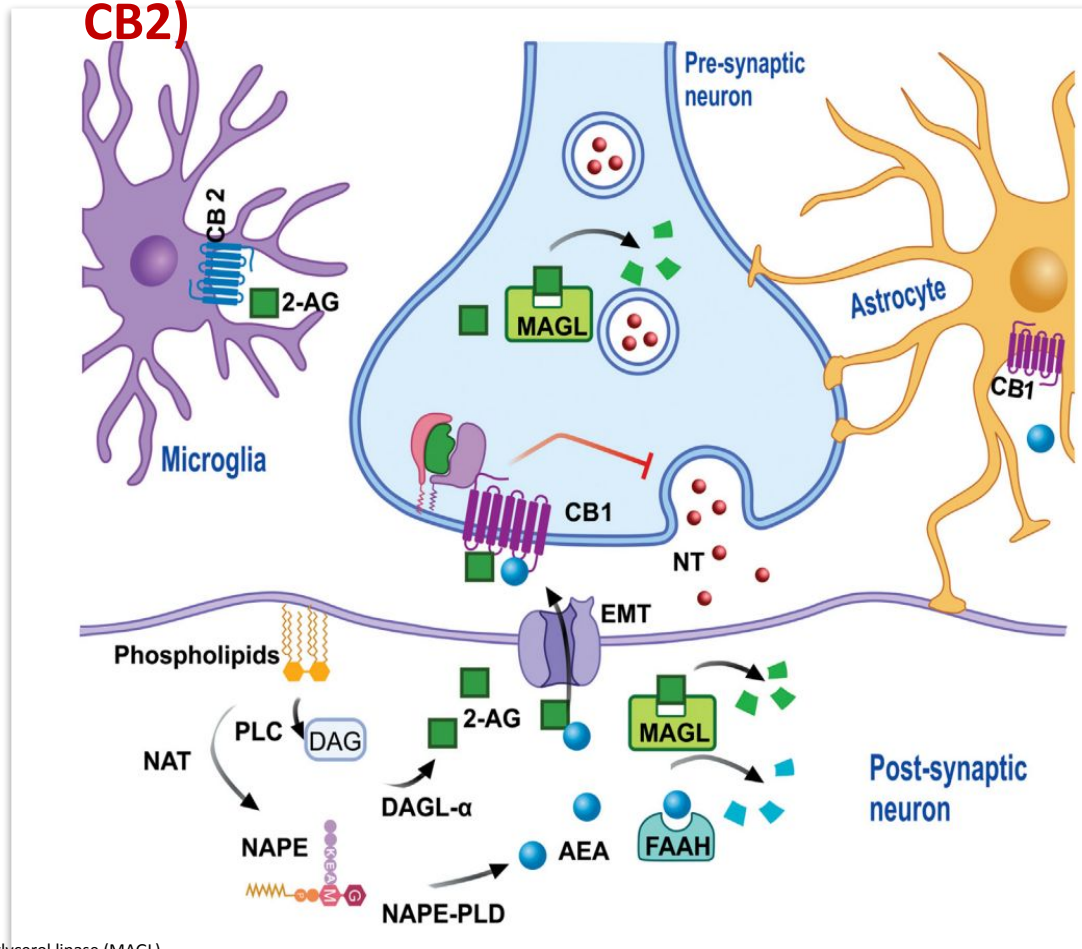
Caenorhabditis elegans y señalización de cannabinoides y fitocannabinoides



Shrader SH, y col. 2020



Receptores cannabinoides (CB1 y CB2)



amida hidrolasa de ácido grasos (FAAH) , monoacylglycerol lipase (MAGL)

Tabla N°1. Características de los receptores dopaminérgicos.

	Familia D1		Familia D2		
	D1	D5	D2	D3	D4
Secuencia	446 a.a	477 a.a.	D2a 443 a.a. D2b 444 a.a.	400 a.a.	387 a.a.
Intrones	No	No	Si	Si	Si
Localización cromosomica	5q 35.1	4p 15.1-16.1	11q 22-23	3q 13.3	11p 15.5
Regiones de alta densidad	Neostriado SNr	Hipótalamo Hipocampo	Neostriado	Palcoestriado	Corteza Frontal
Adenil ciclasa	Estimulación	Estimulación	Inhibición	Inhibición ?	Inhibición ?
Efecto	G α s	G α s	G α i/o	G α i/o	G α i/o

Tabla 1. Tomado y modificado de: Bahena-Trujillo Ricardo, Flores Gonzalo, Arias-Montaña José A. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. Rev Biomed. marzo de 2000;Vol. 11,(Núm. 1):39-60 (43).a.a. aminoácidos, G α s, proteína G estimuladora, G α i, proteína inhibidora, G α o, proteína tipo O.

Tabla N°2. Receptores dopaminérgicos en *C. elegans*

Homólogo/Orthólogo	<i>C. elegans</i> gen	Tipo de receptor	Ligando	Patrón de expresión	Propiedades
D1-like	dop-1	7TMGPCR (Go)	Dopamina	ALM, ALN, AUA, AVM, PHC, PLM, PLN, PVQ, PVD, RIB, RIM, RIQ, algunas neuronas no identificadas en la cabeza, neuronas motoras CNV colinérgicas, interneuronas, células de las glándulas excretoras, músculos de la cabeza y células de apoyo neuronal sensorial	DOP-1 es necesario de forma autónoma en las neuronas táctiles para la modulación de comportamientos mecanosensoriales como la habituación al toque. Es necesario para la regulación de la locomoción a través del antagonismo de la DOP-3 en las neuronas colinérgicas. El ARNi conduce a un movimiento anterior más lento, inversiones de deficientes y una respuesta táctil deficiente.
D2-like	dop-2 [do p-2]l	7TMGPCR (Go)	Dopamina	ADE, CEP, FDA, FDE, RIA, RID, SIA, SIB, neuronas no identificadas en la cabeza	
D2-like	dop-3	7TMGPCR	Dopamina	ASE, PVD, RIC, SIA, otras neuronas de la cabeza y la cola, neuronas motoras VNC colinérgicas (débiles) y GABAérgicas (fuertes), músculos de la pared corporal	Requerido para la ralentización normal de la locomoción de animales bien alimentados que se mueven sobre un hosped bacteriano ("ralentización basal"), pero no para la ralentización mejorada de animales hambrientos ("respuesta de ralentización mejorada"); La DOP-3 también se requiere para la parálisis de animales por exceso de dopamina, DOP-3 es antagonizado por DOP-1 [ya que una mutación dop-1 suprime los fenotipos mutantes de parálisis y desaceleración de dop-3]. DOP-3 y DOP-1 se coexpresan en neuronas motoras colinérgicas y neuronas mecanosensoriales PVD, y ejercen sus efectos antagonistas en las primeras.
Human TRAR vs D1-like	dop-4	7TMGPCR (Go)	Dopamina	ASG, AVI, CAN, IL, I2, PQR, otras neuronas de la cabeza [expresión débil y variable], ASH, células vulvares, intestino, glándula rectal, epitelio rectal	aumenta la respuesta aensiva a alimentos como cobro o glicérol mediada por ASH, vía de señalización dopaminérgica. Las bacterias son sensadas por las neuronas mecanosensoriales CEP y liberan dopamina, aumenta la liberación de Ca en las neuronas ASH via receptor Dop4, aumentar el comportamiento de evitación impulsado por las neuronas ASH
Homólogo de los receptores de melatonina tipo 1b humanos y, más generalmente, de los receptores de dopamina y serotonina (5-HT) de	dop-5	7TMGPCR (Go)	Dopamina? Ser	ASE, otras neuronas de la cabeza y la cola	Requerido para una sensibilidad total a 5-HT, tamaños de cría normales y bombeo faríngeo, en parte requerido para el rizado de la cola de los machos
Receptores de dopamina D2 o D3 [homólogo de mamífero]	dop-6	7TMGPCR (Go)	Dopamina	Neuronas de la cabeza, células no identificadas en la cola	DOP-6 podría actuar de forma redundante con DOP-2 para promover la respuesta de ralentización basal a la alimentación bacteriana, el receptor DOP-6 no tiene una función obvia en los ensayos de ARNi de tamaño de cría,

Tabla N°2. Tomado y modificado de: Altun, ZF. Neurotransmitter Receptors in *C. elegans*. [Internet]. In WormAtlas 2011. Disponible en: <https://www.wormatlas.org/NTRmainframe.htm#IX-D> (65).

Figura N°22. Movimiento sinusoidal de *C. elegans*

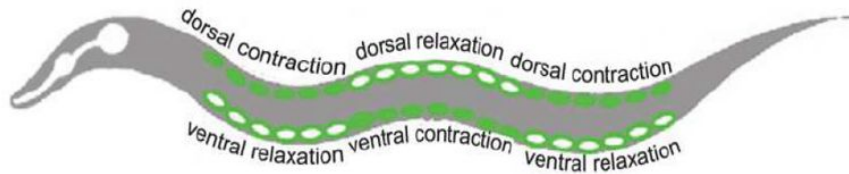


Figura 22. Tomado y modificado de: Wen Q, Po MD, Hulme E, Chen S, Liu X, Kwok SW, et al. Proprioceptive coupling within motor neurons drives *C. elegans* forward locomotion. *Neuron*. 21 de noviembre de 2012;76(4):750-61 (70). El movimiento sinusoidal se genera al alternar la contracción y relajación de la musculatura ventral y dorsal. De esta manera, la curvatura ventral se produce cuando las células musculares ventrales se contraen, mientras que las células musculares dorsales se relajan. En el caso de la curvatura dorsal se produce a la inversa, contrayéndose los músculos dorsales y relajándose los ventrales.

Figura N°23. Mecanismo neuronal de la respuesta lenta basal o BSR.

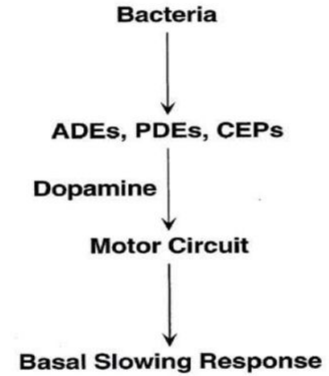


Figura 23. Tomado y modificado de: Sawin ER, Ranganathan R, Horvitz HR. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*. junio de 2000;26(3):619-31 (73).