



## El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* en la evaluación de fitoquímicos como antioxidantes

Miguel Antonio Maldonado Rubio<sup>1</sup>, Gabriela Camargo Hernandez<sup>2</sup>, Mario Alberto Ramirez Herrera<sup>3</sup>, Abel Hernandez Chavez<sup>3</sup> y Leonardo Hernandez Hernandez<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Licenciatura de Biología. Universidad Autónoma de Nayarit, [miguelamr\\_7@hotmail.com](mailto:miguelamr_7@hotmail.com).

<sup>2</sup> Departamento de Botánica y Zoología, CUCBA-Universidad de Guadalajara, [gabycamargoh@gmail.com](mailto:gabycamargoh@gmail.com).

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología. CUCS-Universidad de Guadalajara, [amario999@gmail.com](mailto:amario999@gmail.com), [abehercha38@hotmail.com](mailto:abehercha38@hotmail.com), [leohhdez@hotmail.com](mailto:leohhdez@hotmail.com).

### RESUMEN.

**INTRODUCCION;** El Estrés Oxidativo (EO) se ha asociado a toda una serie de patologías de curso crónico e invalidantes, tales como enfermedades neurodegenerativas. Numerosas investigaciones sobre EO se han realizado usando modelos animales, incluyendo al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia como antioxidante de algunos fitoquímicos en *C. elegans* adultos expuestos a daño oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Aquí probamos el Diferuloilmetano (DFM) y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (AECC), que se les han descrito propiedades antioxidantes. **METODOLOGIA:** Se empleó a *C. elegans* de las cepas N2 (Wild type) y TJ375 (*hsp-16.2::GFP*) adultos con edad sincronizada. Se realizó una curva dosis-respuesta para el DFM y AECC. Posteriormente, con animales tratados con DFM o AECC, se realizaron ensayos de la sobrevivencia a la exposición de Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Finalmente se evaluó el grado de fluorescencia producida por la expresión de las proteínas fusionadas HSP-16.2::GFP en gusanos TJ375 tratados con DFM o AECC y expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los datos resultantes se analizaron con la prueba t-student, considerando como significativa una P<0.05. Se reportan valores como media ± error estándar. **RESULTADOS:** Los resultados preliminares mostraron un aumento significativo de la sobrevivencia en los gusanos tratados con DFM en las concentraciones usadas y expuestos por 5 horas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5 mM pero no cambio significativamente la expresión de la proteína HSP-16.2. En relación al AECC, se observó un aumento significativo de la sobrevivencia y una mayor expresión de HSP-16.2. **CONCLUSIONES:** En este trabajo se analizó el efecto antioxidante del DFM y el AECC, utilizando al *C. elegans*, probando ser adecuado para tal fin. Asimismo pudimos inferir dos mecanismo de acción antioxidante en los fitoquímicos probados, el barrido de ERO y la inducción de proteínas de protección contra el EO.

### 1. INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. La luz del sol (rayos UV), el ozono y otros contaminantes del medio ambiente (fotoquímicos, el humo de cigarrillo, herbicidas) son causas de la formación de ERO, pero también se generan como resultado del metabolismo celular. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones no apareados y les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de oxido-reducción (1, 2). Dentro de los ERO, en particular el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), es una molécula moderadamente reactiva, y aunque no es



realmente un radical libre, sus propiedades químicas son similares a las del superóxido, y fácilmente puede formar radicales hidroxilo, los cuales son muy reactivos. El  $H_2O_2$  se genera en altos niveles en respuesta a las señales inflamatorias, aunque su actividad oxidante es relativamente baja en comparación con otras ERO (3).

En los sistemas biológicos, incluido el cuerpo humano, se mantienen un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensas antioxidantes (4). Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran 3 enzimas que son fundamentales; la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPx). Estas enzimas detoxifican los compuestos reactivos Superóxido y  $H_2O_2$ . La pérdida del balance mencionado arriba, lleva a un estado de estrés oxidativo, que se caracteriza por un aumento en los niveles de radicales libres, en especial de las ERO, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante. Durante este proceso se producen reacciones químicas sobre los lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN en el interior de las células, lo que puede desencadenar daños irreversibles y muerte. Esto ocurre en patologías degenerativas (1, 5, 6), particularmente se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, en diabetes y en el envejecimiento (1). Numerosas investigaciones se han realizado en este sentido, algunos de estos se han realizado usando modelos animales, incluyendo al nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). El *C. elegans* es un organismo simple, el hermafrodita adulto tiene 959 células somáticas y el macho adulto tiene 1031. Tanto el número de células como su posición son constantes. Con la ayuda de un microscopio, los animales, pueden ser observados y manipulados de forma individual. Otra ventaja que ofrece el modelo es su fácil mantenimiento en el laboratorio y bajo costo (7). Además, se ha demostrado que las enzimas antioxidantes (CAT, SOD y GPx) se encuentran en el *C. elegans* y forman parte de su sistema de defensa antioxidante, del mismo modo que ocurre en mamíferos. La vía de señalización de la insulina IGF-1, que se ha relacionado con la respuesta al estrés, se encuentra en el *C. elegans* y también se encuentra ampliamente conservado en mamíferos. Adicionalmente, Investigaciones previas han reportado que la administración de  $H_2O_2$  de forma exógena, es capaz de producir estrés oxidativo en el *C. elegans* (8), lo cual se hace evidente tras la reducción de la supervivencia en éste. Por lo anterior, el gusano *C. elegans* nos parece un magnífico modelo para observar estrés oxidativo, pues los efectos observados por su exposición a ERO, y se podrían extrapolar a los seres humanos, por lo menos a un nivel celular y molecular.

Se ha propuesto que el daño asociado con las ERO, podría ser mejorado por intervenciones que aumenten la resistencia al estrés oxidativo. Dentro de las posibles intervenciones, el uso de sustancias de origen natural podría resultar una opción económica y efectiva, como vitaminas, fenoles y aceites esenciales. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia como antioxidante de algunos de estos productos naturales sobre el *C. elegans* en la edad adulta expuestos a daño oxidativo por  $H_2O_2$ . Particularmente probamos el compuesto polifenol Diferuloilmetano (DFM), y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (AECC). A éstas sustancias se les ha descrito como antioxidantes contra algunas especies reactivas de oxígeno, como grupos hidroxilos, peróxidos y radicales superóxidos (9).

## 2. METODOLOGÍA

Se utilizaron *C. elegans* de la cepas N2 (Wild type) y TJ375 (hsp-16.2::GFP) adultos con edad sincronizada, cultivados en placas de agar-NGM a 19°C, de acuerdo a los protocolos estándar de uso y mantenimiento de este nematodo (7). Primero se realizó una curva dosis-respuesta para la DFM y AECC para encontrar las dosis más adecuadas para los tratamientos. Posteriormente, con animales previamente tratados con DFM (10 y 100  $\mu M$ ) o AECC (10ng/ml), se realizaron ensayos de la sobrevivencia a la exposición de Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ , 10 y 0.5 mM) como oxidante. Los ensayos fueron hechos en medio líquidos, en placas de 24 pocillos de fondo plano con un



volumen final de 1 ml con 30 animales por pocillo. Brevemente, Los gusanos sujetos a tratamiento con  $H_2O_2$ , se dejaron en reposo a  $19^\circ C$ . Después cada hora durante 5 horas, la sobrevivencia fue determinada mediante el toque al cuerpo de cada gusano, usando un alambre de platino estéril. Finalmente utilizando la cepa TJ375 se evaluó el grado de fluorescencia producida por la expresión de las proteínas fusionadas HSP-16.2::GFP, de los animales tratados con DFM o AECC y posteriormente expuestos a  $H_2O_2$ , esto mediante un microscopio de fluorescencia. Para analizar los datos resultantes se utilizó la prueba t-student, considerando como diferencia significativa una  $P < 0.05$ . Los valores se reportan como media  $\pm$  error estándar.

### 3. RESULTADOS

Los resultados preliminares mostraron un aumento significativo de la sobrevivencia en los gusanos tratados con DFM en las concentraciones usadas y expuestos por 5 horas a  $H_2O_2$  0.5 mM (Sobrevivencia de 72% y 80% con DFM 10 y 100  $\mu M$  respectivamente,) pero no cambio significativamente la expresión de la proteína HSP-16.2, indicadora de estrés oxidativo de los nematodos sometidos a estrés oxidativo. Esto sugiere un efecto protector de la DFM contra los efectos oxidantes del  $H_2O_2$ , posiblemente mediante un mecanismo de barrido de ERO. En relación al AECC, los resultados preliminares mostraron un aumento significativo de la sobrevivencia del grupo de gusanos tratados con AECC (55%) con respecto al grupo control después de 5 horas de exposición a  $H_2O_2$  0.5 mM. Los experimentos de fluorescencia en este caso mostraron que existe una mayor expresión de hsp-16.2 (referido como una disminución de fluorescencia por GFP) tanto en los grupos expuestos y no expuesto al  $H_2O_2$  tratado con AECC. Estos resultados preliminares sugieren que el AECC ofrece protección contra el estresor  $H_2O_2$  a través de un mecanismo que involucra el aumento de la expresión de proteínas de respuesta al estrés HSP-16.2.

### 4. CONCLUSIONES

A partir de la realización de este trabajo pudimos analizar el efecto antioxidante de dos fitoquímicos, la DFM y el AECC, utilizando al *C. elegans*, el cual probó ser un organismo modelo adecuado para tal fin. Asimismo pudimos inferir dos mecanismo de acción antioxidante en los fitoquímicos probados, uno de barrido de ERO y el otro de la inducción de proteínas de protección contra el estrés oxidativo.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Rev Cubana Cardiol. 2000;14(1):55-60.
2. Justo VG. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev Cubana Med Milit. 2002;31(2):126-334.
3. Milton NG. Role of hydrogen peroxide in the aetiology of Alzheimer's disease: implications for treatment. Drugs & aging. 2004;21(2):81-100.
4. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Revista Cubana de Medicina Militar. 2002;31:126-33.
5. Dorado C, Rugerio C, S. R. Estrés oxidativo y neurodegeneración. Rev Fac Med UNAM. 2003;46(6):229-35.
6. Zorrilla A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev Cubana Invest Biomed. 2002;21(3):178-85.
7. Hope IA. *C. elegans*: A Practical Approach. 1 ed. Press OU, editor. USA, New York 2000.



8. Lee SS, Lee RY, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J, Ruvkun G. A systematic RNAi screen identifies a critical role for mitochondria in *C. elegans* longevity. *Nature genetics*. 2003 Jan;33(1):40-8.
9. Aiello A, Fattorusso E, Luciano P, Macho A, Menna M, Munoz E. Antitumor effects of two novel naturally occurring terpene quinones isolated from the Mediterranean ascidian *Aplidium conicum*. *Journal of medicinal chemistry*. 2005 May 5;48(9):3410-6.