



**EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Morinda citrifolia* EN LA REPRODUCCIÓN Y
MOTILIDAD DE *Caenorhabditis elegans* (CEPA N2) MODELO DIABETES
INDUCIDO**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA ACADÉMICO BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2018**



**EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Morinda citrifolia* EN LA REPRODUCCIÓN Y
MOTILIDAD DE *Caenorhabditis elegans* (CEPA N2) MODELO DIABETES
INDUCIDO**

ESTUDIANTES

**CAMILA ANDREA CORTÉS DÍAZ
ALBA JUDITH ESPITIA MARTÍNEZ**

DOCENTES ASESORES

**RUTH MÉLIDA SANCHEZ MORA
MARTHA GOMEZ JIMENEZ**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA ACADÉMICO BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ D.C.
MAYO DE 2018**

Dedicatoria

Dedicamos este logro a nuestra familia quienes han estado a lo largo de nuestra carrera apoyándonos incondicionalmente, brindándonos siempre una palabra de aliento para que lográramos cumplir nuestros sueños, propósitos y metas. A Samuel que desde el cielo me ha dado fuerza para no desfallecer y a todas aquellas personas que de una u otra forma acompañaron nuestro proceso.

Agradecimientos

Agradecemos a nuestra familia por acompañarnos en este proceso académico. A la Dra. Ruth Mélida Sánchez y a la Docente Martha Gómez Jiménez por la confianza y positivismo durante la realización de este trabajo. A la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitirnos el desarrollo del proyecto de investigación y brindarnos las bases académicas necesarias para llevar a cabo nuestro trabajo.

Tabla de contenido

1. Introducción	1
2. Obetivos	2
3. Antecedentes	3
4. Marco teórico	7
3.1. Caenorhabditis elegans	7
3.1.1 Clasificación taxonómica	8
3.1.2 Ciclo de vida	9
3.1.3 Anatomía	10
3.1.3.1 Sistema digestivo	11
3.1.3.2 Sistema epitelial	11
3.1.3.3 Sistema muscular	11
3.1.3.4 Sistema nervioso	12
3.1.3.5 Sistema excretor	12
3.1.4 Reproducción	12
3.1.4.1 Larva 1	13
3.1.4.2 Larva 2	13
3.1.4.3 Larva 3	14
3.1.4.4 Larva 4	14
3.1.4.5 Adulto	15
3.1.4.6 Control de la ovulación	16
3.1.4.7 Control de la fertilización	16
3.2 Vía de señalización de la insulina	16
3.2.1 Receptor de insulina	16
3.2.2 Transducción de la señal	17
3.2.3 Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K): Metabolismo de la glucosa y de los lípidos	18
3.3 Morinda citrifolia (Noni)	18
3.3.1 Principales componentes del noni	19
4. Diseño metodológico	20
4.1 Tipo de diseño	21

4.2 Universo, población y muestra	21
4.3 Hipótesis, variables e indicadores	21
4.4 Materiales y métodos	21
4.4.1 Preparación de placas NGM	21
4.4.2 Sincronización de <i>C. elegans</i>	21
4.4.3 Siembra de <i>E. coli</i> OP50 y <i>C. elegans</i> en placas de NGM	22
4.4.4 Obtención del extracto	22
4.4.5 Preparación de las concentraciones del extracto	23
4.4.6 Evaluación del extracto sobre <i>E. coli</i> OP50	23
4.4.7 Exposición de la cepa N2 al extracto	23
4.4.8 Exposición de la cepa N2 a glucosa	23
4.4.9 Visualización de acúmulos de grasa en <i>C. elegans</i>	24
4.4.10 Evaluación del extracto sobre la cepa N2 modelo diabetes	24
4.4.11 Caracterización fenotípica	24
4.4.11.1 Ensayo de reproducción	24
4.4.11.2 Ensayo de motilidad	24
4.4.12 Análisis estadístico	25
5. Resultados	25
5.1 Obtención del extracto de Noni y evolución frente a <i>E. coli</i> OP50	26
5.2 <i>C. elegans</i> N2 y extracto de noni	27
5.2.1 Morfología de <i>C. elegans</i> con extracto de noni	28
5.2.2 Reproducción de la cepa N2 con extracto de noni	29
5.2.3 Motilidad de la cepa N2 con extracto de noni	30
5.3 Modelo de <i>C. elegans</i> diabetes inducido	31
5.3.1 Morfología de modelo <i>C. elegans</i> diabetes inducido	31
5.3.2 Reproducción modelo <i>C. elegans</i> N2 diabetes inducido	33
5.3.3 Motilidad de modelo <i>C. elegans</i> N2 diabetes inducida	34
5.4 Modelo <i>C. elegans</i> diabetes inducido con extracto de noni	35
5.4.1 Morfología de modelo <i>C. elegans</i> diabetes inducido con extracto de noni ...	35
5.5 Reproducción modelo <i>C. elegans</i> N2 diabetes inducido tratado con extracto de noni	36

5.6 Motilidad modelo <i>C. elegans</i> N2 diabetes inducida tratada con extracto de noni.	38
6. Discusión.....	39
7. Conclusiones.....	43
8. Referencias bibliográficas	44
Anexo 1	52
Anexo 2	52

Índice de figuras

Figura 1: Estructura de <i>Caenorhabditis elegans</i>	8
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
Figura 3: Movimiento de nictación.....	10
Figura 4: Subunidades alfa y beta del receptor de insulina	17
Figura 5: Planta con fruto de <i>Morinda citrifolia</i>	19
Figura 6: Proceso de obtención del extracto etanólico	26
Figura 7: Crecimiento de <i>E. coli</i> OP50 en agar Mueller Hinton.....	27
Figura 8: Morfología de <i>C. elegans</i>	28

Figura 9: Reproducción cepa N2 expuesta a concentraciones del extracto	30
Figura 10: Morfología C. elegans	32
Figura 11: Acúmulos de grasa en C. elegans.....	33
Figura 12: Reproducción C. elegans N2 modelo diabetes inducido	34
Figura 13: Acúmulos de grasa en C. elegans.....	36
Figura 14: Población de larvas de C. elegans	37
Figura 15: Reproducción C. elegans N2 modelo diabetes inducido tratado con extracto de noni.....	37

Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación taxonómica de <i>C. elegans</i>	8
Tabla 2: Principales sustancias de <i>Morinda citrifolia</i> (noni)	19
Tabla 3: Motilidad de <i>C. elegans</i> con extracto	30
Tabla 4: Motilidad modelo diabetes inducido	35
Tabla 5: Motilidad modelo diabetes inducido tratado con extracto.....	38



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

EFFECTO DEL EXTRACTO DE *Morinda citrifolia* EN LA REPRODUCCIÓN Y MOTILIDAD DE *Caenorhabditis elegans* (CEPA N2) MODELO DIABETES INDUCIDO

RESUMEN: La diabetes es una enfermedad degenerativa, problema de salud pública y causante de mortalidad, su tratamiento generalmente está dirigido al control base de la enfermedad, dejando en segundo plano efectos como el deterioro en la reproducción de las personas que padecen la enfermedad, por esta razón actualmente se acude en la búsqueda de tratamientos alternativos con plantas medicinales, como el caso del Noni (*Morinda citrifolia*) para prevenir y controlar efectos de la enfermedad. Con esta investigación se evaluó los efectos del extracto de dicha planta sobre la reproducción en una cepa salvaje N2 de *Caenorhabditis elegans* expuesta a una dieta alta en glucosa. **Objetivo:** Evaluar el efecto del extracto etanólico de Noni sobre cepas de *Caenorhabditis elegans* y las

modificaciones fenotípicas que allí se presenten. Materiales y Métodos: El nematodo fue cultivado en el medio NGM con la cepa de *E coli* OP50. Las cepas fueron sincronizadas para obtener gusanos en el mismo estadio larvario. Utilizando la técnica de tinción Negro Sudan se realizó caracterización fenotípica del nematodo antes y después de la adición de glucosa finalmente con método convencional se realizaron ensayos de reproducción y motilidad. Resultados: La caracterización fenotípica de la cepa salvaje N2 mostro un deterioro después de someterlos a concentraciones altas de glucosa; la cual se demuestra con la tinción Negro Sudan. Al someter la cepa al tratamiento con el extracto de Noni se notaron cambios favorables en la movilidad y reproducción.

PALABRAS CLAVE: *Caenorhabditis elegans*, Diabetes mellitus, reproducción, motilidad, Noni.

Camila Andrea Cortés Díaz
Alba Judith Espitia Martínez

Universidad Colegio Mayor de
Cundinamarca

Ruth Mélida Sánchez Mora
Martha Gómez Jiménez

Marzo del 2018

1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la diabetes mellitus (DM) es una grave enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina (hormona que regula el nivel de azúcar, o glucosa, en la sangre), o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce. La diabetes es un importante problema de salud pública y una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario. En las últimas décadas ha aumentado sin pausa el número de casos.

Esta enfermedad afecta a una gran cantidad de personas a nivel mundial, y va en aumento; según la OMS para el año 2030 habrá aproximadamente más de 300 millones de casos reportados; cifra que no es exacta, ya que muchas personas padecen la enfermedad y no lo saben.

Aunque hay factores genéticos que influyen para llegar a padecer DM, hay otros factores que son determinantes como el estilo de vida, tipo de alimentos que se consumen a diario, sedentarismo, entre otros. El entendimiento del origen y evolución de la enfermedad, ayudan a realizar avances importantes en pro de encontrar una cura para la diabetes; es por esto que, con fines experimentales, se utilizan organismos modelo, uno de ellos es el nematodo *Caenorhabditis elegans*, debido a su gran homología genética con los mamíferos. Gracias a esto, se ha podido estudiar enfermedades como el Parkinson, Alzheimer, Diabetes Mellitus, entre otras, que a diario cobran nuevas víctimas a nivel mundial, afectando la esperanza de vida, entre otros factores dentro de la población.

Por lo general, en la mayoría de los casos de pacientes con DM, se utilizan tratamientos como inyecciones de insulina o medicamentos de administración oral, con el fin de reducir los niveles de glucosa en sangre. Por otra parte, desde tiempos remotos, el uso de plantas medicinales ha sido y sigue siendo una buena alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades. Utilizamos la fruta *Morinda citrifolia*, conocida comúnmente como noni, para demostrar si es una buena opción para tratar los síntomas provocados por la DM; teniendo en cuenta que en el año 2015 se realizó una investigación con las hojas de la planta *Smilax sonchifolius* (yacón), en la cual determinaron que dicha planta es benéfica para el tratamiento de la diabetes en el gusano, lo único que se vio afectado en el nemátodo al ser expuesto al extracto del yacón fue la reproducción, por esta razón haremos especial énfasis en los efectos que tiene el extracto de noni sobre la reproducción de *Caenorhabditis elegans*.

2. Objetivos

General

Evaluar los efectos del extracto etanólico de hojas de *Morinda citrifolia* (noni) sobre la reproducción y motilidad de *Caenorhabditis elegans* Cepa N2 modelo diabetes inducido

Específicos

- Someter la cepa N2 de *C. elegans* al extracto etanólico de noni.
- Examinar los efectos de una dieta rica en glucosa sobre el nematodo.
- Analizar el efecto del extracto etanólico sobre la reproducción y motilidad del nemátodo sometido a una dieta rica en glucosa.

3. Antecedentes

El estudio de la Diabetes Mellitus (DM) data de los años 1550 A.C, fecha en la que se tienen los primeros registros escritos en el papiro de Ebers, donde se describen los primeros signos asociados a esta enfermedad como la poliuria. Paracelso (1491-1541) escribió que la orina de los diabéticos contenía una sustancia anormal que quedaba como residuo de color blanco al evaporar la orina, creyendo que se trataba de sal y atribuyendo la diabetes a una deposición de ésta sobre los riñones causando la poliuria y la sed de estos enfermos. Los primeros datos que aparecen haciendo referencia a la orina dulce, se conocen en la literatura occidental y fueron descritos por Tomas Willis (1621-1675). A través de los años y gracias a diferentes investigadores se hacen grandes descubrimientos relacionados con este trastorno como en el año 1869 cuando el médico Langerhans, descubre que la diabetes se presenta porque el cuerpo no es capaz de producir insulina, y que ésta es originada en un grupo de células del páncreas, lo que hoy día conocemos como Islotes de Langerhans¹⁻².

Estudios del nuevo siglo demuestran que la Diabetes Mellitus conduce a complicaciones a largo plazo afectando así varios órganos como: ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos. Además de hiperglucemia, los niveles de lípidos séricos están usualmente aumentados en los pacientes diabéticos, lo que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares³. Adicionalmente, en diferentes estudios realizados se ha demostrado que la diabetes mellitus compromete también el sistema reproductor. Investigadores del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEF y BO), del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Buenos Aires (2002), realizaron estudios básicos orientados a la reproducción, estudiando la participación de las prostaglandinas en los procesos reproductivos, la influencia del óxido nítrico (NO) en estos procesos y su interrelación con el camino de síntesis y liberación de prostanoides⁴⁻⁵. Estudios paralelos en diabetes mellitus y reproducción han establecido que la diabetes altera la naturaleza de ovocitos inmaduros, ovulados, fecundados, procesos implantatorios, embrión en desarrollo, placentación, motilidad uterina y parto⁶.

A lo largo de los años, se han realizado diversos estudios en plantas para utilizarlas con fines medicinales. Uno de los frutos más usados desde hace mucho tiempo es *Morinda citrifolia* (Noni) que se originó en el sudeste de Asia y a partir de allí se crearon diferentes teorías respecto a su distribución hacia las polinesias, se habla que las semillas de *M. citrifolia* podrían haber flotado en el océano y probablemente distribuirse por las aves y otros animales. La idea de que las plantas podrían haber sido diseminadas naturalmente en todo el Pacífico, se corrobora por estudios filogenéticos en Nueva Caledonia donde se demostró que *M. citrifolia* se encuentra

anidada dentro de un grupo de las especies endémicas del Pacífico sudoccidental. Otros creen que la planta fue intencionalmente distribuida como medicamento y alimento por los antiguos viajeros que colonizaron Islas del Pacífico⁷⁻⁸. Los polinesios utilizaban todas las partes de la planta para realizar sus remedios, entre éstos la hoja era la parte más usada, y para el alimento, se empleaba tradicionalmente en forma de jugo, como tónico, y como té. Esta fruta aparece también como comida de emergencia en un manual de supervivencia para el ejército norteamericano durante la II Guerra mundial, en 1943.

Entre las enfermedades que combate tradicionalmente *M. citrifolia* se destacan enfermedades respiratorias, articulares y el envejecimiento. También ha sido usado durante mucho tiempo como tónico para mejorar problemas urinarios y musculares. La fruta verde se macera junto con sal y se aplica en las heridas profundas y los huesos rotos, mientras que la madura se utiliza para las manchas faciales o como un remedio para la irritación de la piel, furúnculos o infecciones. En la medicina alternativa actual, el jugo del Noni se ha utilizado para tratar diferentes tipos de enfermedades tales como la diabetes, la hipertensión, problemas menstruales, cefaleas, enfermedad cardíaca, cáncer, úlceras gástricas, problemas digestivos, aterosclerosis, problemas vasculares. También presenta acción antioxidante analgésica, antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, antitumoral, inmunológica, hipotensora, antihelmíntica e insecticida, entre otras, unidas también al desarrollo de una gran industria que comercializa su jugo y vino de esta fruta⁹.

El Dr. Ralph Heinicke en la isla de Hawái, realizó un estudio con el cual descubrió los maravillosos beneficios de la fruta Noni y se propuso encontrar su ingrediente farmacéutico activo, la Xeronina. La xeronina es un alcaloide relativamente pequeño que fisiológicamente es muy activo e importante para la función adecuada de todas las células del cuerpo. En la investigación realizada por el Dr. Heinicke descubrió que el jugo del Noni contiene cantidades apreciables del precursor de la xeronina, el cual él nombró "pro-xeronina" la cual libera xeronina en los intestinos al ponerse en contacto con una enzima particular también encontrada en el jugo de Noni, la proxeroninasa¹⁰.

La fruta del noni, y sus derivados han sido ampliamente comercializados alrededor de varios países del mundo, y con la tendencia actual de la medicina alternativa todos sus beneficios son reclamados por la población, provocando un aumento en su consumo diario. Por esta razón y después de realizarse estudios toxicológicos y de confirmarse su composición, el jugo de Noni ha sido aprobado como Novel Food por la Comisión Europea en el año 2003¹¹. A partir de este hecho se plantean diferentes problemáticas de las cuales se busca encontrar una solución aprovechando los múltiples beneficios de la planta.

En el año 2007 se realizó un estudio con ratas diabéticas para evaluar la cicatrización de heridas recibiendo jugo de *M. citrifolia*, los animales se dividieron

en tres grupos: en el grupo 1, las ratas sirvieron como controles normales, mientras que los animales en los grupos 2 y 3, sirvieron como controles para diabéticos y animales diabéticos experimentales respectivamente. Todos los grupos fueron sometidos a anestesia, posteriormente se realizó una completa escisión de la herida de espesor (área circular de 300mm² y 2mm de profundidad). A los animales del grupo 3 se les administró el jugo de la fruta *M. citrifolia* (100ml/kg de peso corporal) en agua potable durante 10 días. La curación fue evaluada por la tasa de contracción de la herida, el tiempo hasta la epitelización completa, peso de tejido de granulación y contenido de hidroxiprolina. Se tomaron mediciones del área de la herida en los días 1, 5 y 11, al igual que muestras de sangre de forma simultánea para la medición de la glucosa. El tejido de granulación que se había formado sobre la herida fue extirpado en el día 11, y fue procesado para análisis histológico y bioquímico. Los resultados obtenidos del área de la herida del grupo tratado con *M. citrifolia* se redujo en un 73% en comparación con los controles de la diabetes (63%), además observaron aumentos significativos en el peso del tejido de granulación y el contenido de hidroxiprolina. Este estudio demuestra que el jugo de la fruta *M. citrifolia* reduce significativamente los niveles de glucosa en la sangre y acelera la cicatrización de heridas en ratas diabéticas¹².

Un estudio realizado por Hirazumi Et al (2000) demostró que el jugo de *M. citrifolia* es activo como modelo de en carcinomas de pulmón. Hirazumi determinó que el jugo era capaz de estimular la respuesta inmune de los murinos, a través de la liberación de varios mediadores, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (α -TNF), la interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interferón gamma (IFN- γ), y óxido nítrico. Identificando la actividad inmunomoduladora que se produce en la porción rica en polisacáridos extraída del jugo⁸.

Se identificó actividad anti proliferativa a partir de las fracciones del jugo de Noni y butanol contra una línea celular de carcinoma de mama (MCF-7) y una de carcinoma de colon (HCT-116). Además, se aisló un nuevo glicósido demostrando actividad anti proliferativa contra el MCF-7, así como 6 compuestos activos de la fracción de butanol. Morfológicamente se informó que los cambios en las células MCF-7 eran indicativos de muerte celular programada. Finalmente, exploraron la genética para la posible apoptosis: "Un ADNc de matriz específica para la apoptosis reveló que los compuestos en el extracto de jugo parecen afectar los genes de la vía de apoptosis TNF y células del ciclo, y dan lugar a la inhibición del crecimiento de células cancerosas⁸.

Se destacan también los hallazgos de Jonel Saludes y colaboradores en Filipinas, los cuales reportaron que un concentrado de extractos de las hojas del noni eliminó en un 89% las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que fueron evaluadas en un tubo de ensayo, demuestra ser casi tan eficaz como la Rifampicina la cual provoca un 97% de inhibición del crecimiento de este microorganismo a la misma concentración¹³.

En un estudio realizado por la Dra Érida González en la ciudad de la Habana en el año 2002, se desarrollaron 2 modelos de diabetes mellitus experimental por estreptozotocina en ratas: En el primer modelo (Diabetes Mellitus tipo 1), un grupo de hembras adultas fue expuesto a estreptozotocina (60 mg/kg). Entre el segundo y tercer día de la administración, las ratas presentaron glucemias que oscilan entre 300 y 400 mg/dL. Para los estudios de alteraciones en la gesta, los animales fueron apareados con machos sanos dentro de las 2 semanas de inyección. Luego de este período, se altera irreversiblemente el ciclo estral. En el segundo modelo (Diabetes tipo 2) se indujo la hiperglucemia por administración neonatal de estreptozotocina (100 mg/kg) a las 48 h de vida. El páncreas de estos neonatos sufre una destrucción y regeneración parcial, de lo cual resulta un animal adulto con hiperglucemias moderadas, que oscilan en 150-180 mg/dL en ayunas y ascienden hasta los 300 mg/dL en los 60 min posteriores a una sobrecarga de glucosa de 1,5 g/kg. Estas ratas fueron apareadas con machos sanos y sus ciclos fueron regulares durante períodos mayores. Son animales no insulino dependientes, pero presentan alteraciones significativas en sus procesos reproductivos. Los resultados nos indican que en los complejos ovocito-cumulus del primer modelo de rata diabética existe menor producción de prostaglandina (PGE) y hay actividad incrementada de óxido nítrico (NO), frente a los resultados del segundo modelo de rata diabética, de lo cual se infirió que los niveles disminuidos de PGE parecen correlacionarse con una deficiencia del complejo ovocito-cumulus, para responder a la señal activadora de NO sobre la ciclooxigenasa (COX), probablemente por anomalías en el estado de oxidación de los tejidos diabéticos, especialmente de los ovocitos ovulados por el animal. Los embriones provenientes de ratas diabéticas tipo 1 tienen un menor contenido de PGE, la cual resulta ser necesaria para modular el crecimiento y desarrollo embrionario. Estos embriones, sin embargo, producen y liberan 40 veces su contenido de PGE en una hora. Los experimentos cinéticos sugieren que podría existir una anomalía en la permeabilidad de membrana o una alteración en los transportadores de prostaglandinas, demostrando así que a niveles altos de glucosa se ve desmejorada la reproducción de los modelos de estudio⁶.

Por otra parte, en pro de un mayor conocimiento y entendimiento de las diversas enfermedades que afectan a diversos organismos, se han utilizado varios modelos de estudio, como es el caso de las ratas, *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*. Siendo este último de gran utilidad gracias a su homología a nivel genético en enfermedades como la diabetes, así como trastornos neurodegenerativos como Parkinson y Alzheimer. Por esto, *Caenorhabditis elegans* es un buen modelo para estudiar los mecanismos por los cuales la vida útil se ve reducida por los niveles altos de glucosa. En el año 2009 Andreas Schlotterer, y colaboradores evalúan la vida media de *C. elegans* a altas concentraciones de glucosa, para esto mantuvieron el nematodo con dosis que se asemejan a las condiciones de hiperglucemia en pacientes diabéticos, estudiaron los productos finales de glicosilación en la función mitocondrial y la formación de ROS, obteniendo como resultado que la alta concentración de glucosa reduce la vida media del nematodo.

La toxicidad que puede inducir la glucosa es prevenible mediante la mejora funcional de la enzima metilglicoxal glyoxalasa-1, de la cual es dependiente la desintoxicación y prevención de la disfunción mitocondrial¹⁴.

En una tesis de pregrado realizada por Angie Viviana Gómez y Jessika Alexandra Osorio, estudiantes de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, en la cual evaluaron cepas N2 de *Caenorhabditis elegans* y demostraron que la longevidad, la longitud, estrés térmico y reproducción se ven afectadas en este modelo cuando se someten a altas concentraciones de glucosa, pero al someterlas a diferentes concentraciones del extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de *Smallantus sonchifolius*, este modelo presenta mejoría en longitud, longevidad y resistencia al estrés térmico, presentándose como una alternativa para personas con diabetes, tomando en cuenta que el modelo de *Caenorhabditis elegans* presenta una alta homología con las diferentes moléculas involucradas en las diferentes vías de señalización humana, entre estas la vía de la insulina¹⁵.

En los resultados obtenidos en dicho trabajo, la reproducción se ve afectada y no presenta mejoría al someterla al extracto de yacón, el presente estudio se enfocará en el análisis de la reproducción del nematodo frente a otro extracto (Noni), contribuyendo con el desarrollo alternativo de una opción de mejoría para las personas que padecen diabetes mellitus y que se ven afectadas en su reproducción.

4. Marco teórico

3.1. *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (Figura1) es un nemátodo redondo, transparente, de aproximadamente 1mm de longitud, distribuido geográficamente a nivel mundial. Durante mucho tiempo ha sido utilizado como organismo modelo en investigaciones, gracias a que cuenta con una gran homología genética con los mamíferos, haciendo más fácil el proceso de entendimiento de diversas enfermedades que los afectan.



Figura 1: Estructura de *Caenorhabditis elegans*¹⁶

Este nemátodo fue el primer organismo multicelular en ser completamente secuenciado en el año 1998 por Sydney Brenner, a quien se le otorgó el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en el año 2002, junto a John Sulston y Bob Horvitz por sus estudios sobre el desarrollo y la muerte celular programada en el nematodo *Caenorhabditis elegans* ¹⁷.

Está compuesto exactamente de 959 células somáticas en hermafroditas y 1031 en machos adultos, incluyendo 95 células musculares de la pared del cuerpo y 302 neuronas ¹⁸. Cuenta con un ciclo de vida corto: Desde L1, pasando por L2, L3 y L4, hasta llegar a adulto, en menos de 8 días; característica que resulta ser una ventaja para realizar estudios en el laboratorio. Se alimenta de microorganismos, como la bacteria *E. coli* OP50, la cual se siembra en NGM que es el medio utilizado para cultivar este nemátodo en el laboratorio.

3.1.1 Clasificación taxonómica

Taxonómicamente, *Caenorhabditis elegans* pertenece al reino Animalia y al género *Caenorhabditis*, como se muestra en la tabla ¹.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *C. elegans* ¹⁹

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida

Familia	Rhabditidae
Genero	Caenorhabditis
Especie	<i>C. elegans</i>

3.1.2 Ciclo de vida

Como se mencionó anteriormente, el ciclo de vida de *C. elegans* es corto, alcanzando su estadio adulto en menos de una semana (Figura 2). Consiste en una etapa embrionaria, 4 estadios larvarios (L1-L4), y un estadio adulto. Las divisiones embrionarias generan 558 núcleos. Casi todas las divisiones de células embrionarias se completan en la primera mitad de la embriogénesis. Durante los estadios larvarios, 53 blastos se siguen dividiendo hasta generar 959 o 1031 núcleos somáticos, mientras que en el estadio adulto no hay divisiones somáticas²⁰.

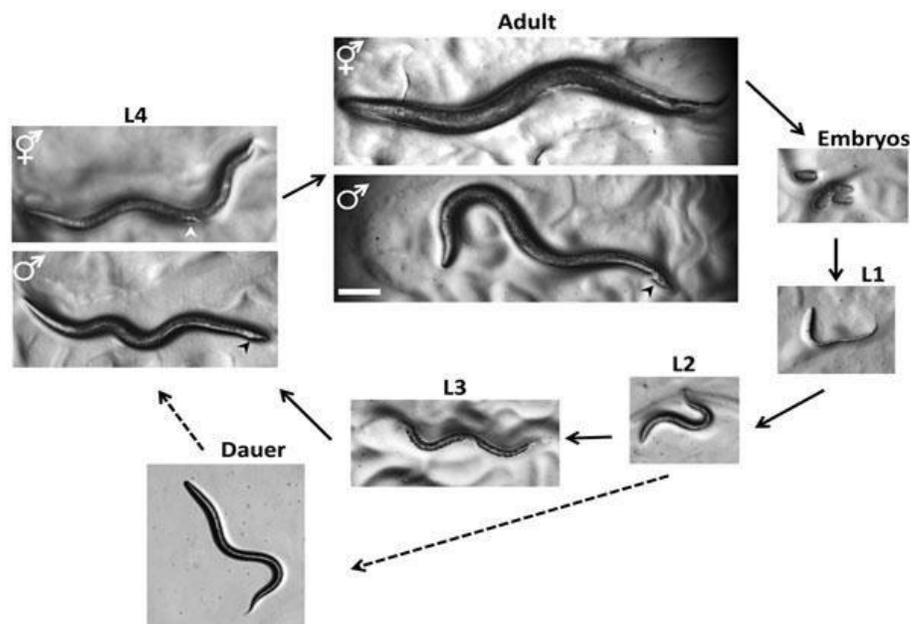


Figura 2: Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*²¹

El nemátodo aumenta su tamaño durante los 4 estadios larvarios, pero los sexos individuales no se distinguen fácilmente hasta el estadio L4. En dicha etapa los hermafroditas tienen una cola que termina en punta y la vulva en desarrollo se puede ver como un semicírculo claro en el centro del lado ventral. Los machos tienen una cola más ancha, pero no tienen abanico visible en esta etapa. En los adultos, ambos sexos pueden ser distinguidos por la circunferencia más ancha y la cola afilada del hermafrodita y la circunferencia más delgada y la cola en forma de

abanico del macho. Los ovocitos pueden ser fertilizados por el espermatozoides obtenidos de machos a través del apareamiento²¹.

Cuando las larvas tempranas de *C. elegans* experimentan una condición ambiental desfavorable, desarrollan una etapa alternativa llamada dauer, en la cual muestran nictación (Figura 3), un comportamiento de ondulación específico de esta etapa. La nictación permite que los nemátodos que están en dauer se adhieran a otros animales, lo que les ayuda a dispersarse a otros hábitats ²². El nemátodo puede permanecer en etapa dauer durante varios meses hasta que las condiciones ambientales sean las apropiadas para que su ciclo de vida siga con normalidad a L4 y luego alcance el estadio adulto.

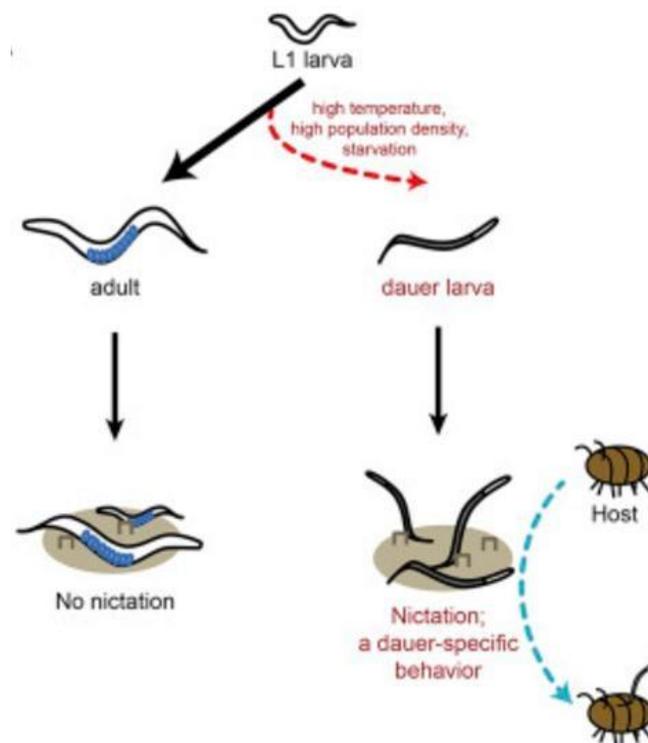


Figura 3: Movimiento de nictación ²²

3.1.3 Anatomía

Caenorhabditis elegans posee un cuerpo cilíndrico, terminado en punta en el caso de los hermafroditas y en abanico en el caso de los machos, transparente, de 1mm de longitud, compuesto por un tubo interno y uno externo separados por un espacio pseudocoelómico. El tubo externo (pared corporal) está formado por la cutícula,

hipodermis, sistema excretor, neuronas y músculos, y el tubo interno está compuesto por la faringe, intestino y gónadas ²³.

3.1.3.1 Sistema digestivo

Este nemátodo tiene tres formas de alimentación: Ingestión directa, en cuestión de minutos; mediante terminaciones neuronales expuestas, útiles para escoger la fuente de alimento, de esta forma, se evitan los compuestos de olor y sabor desagradable; o también pueden captar nutrientes a través de su piel. De una u otra forma, el nematodo escoge su alimento con base a sus necesidades y a la disponibilidad del mismo²⁴.

3.1.3.2 Sistema epitelial

A nivel del tejido epitelial, la hipodermis, la cual secreta cutícula, está compuesta por el sincitio del cuerpo principal (hyp7), una serie de anillos concéntricos de cinco células sincitiales más pequeñas en la cabeza, tres células mononucleadas y una célula sincitial en la cola ²³. Los microtúbulos del citoesqueleto celular de *C. elegans* tienen una doble contribución en la organización de las células. Primero, los microtúbulos ayudan al desplazamiento y proporcionan una trayectoria para el transporte de organelos. Segundo, la rigidez de los microtúbulos confiere propiedades mecánicas específicas a las células, que son cruciales en los cilios o estructuras mecanosensoriales ²⁵.

3.1.3.3 Sistema muscular

Bajo la epidermis, las células musculares de la pared del cuerpo tienen una forma romboide y están organizadas en 4 bandas longitudinales; cada banda tiene 2 células anchas. Existen 24 músculos celulares en cada banda, salvo la banda ventral izquierda que tiene 23. La contracción coordinada del bloque de músculos subventrales contra los bloques de músculos subdorsales genera las ondas que permiten el desplazamiento del gusano. En la región de la cabeza son posibles movimientos ligeramente más elaborados, para la conducta alimentaria, y también en la región de cola del macho para el apareamiento ²⁶.

Las neuronas y la hipodermis están separadas de la musculatura por una delgada lámina basal. Los músculos reciben la entrada de las neuronas enviando brazos musculares para los procesos neuronales motores que funcionan a lo largo de los

nervios o residen en el anillo del nervio. Los músculos de la pared del cuerpo son estriados y están dispuestos en tiras en cuatro cuadrantes, dos dorsales y dos ventrales, a lo largo de toda la longitud del animal. Los músculos más pequeños, no estriados se encuentran en la faringe y alrededor de la vulva, intestino y recto²³.

3.1.3.4 Sistema nervioso

El sistema nervioso de *C. elegans* está compuesto de 302 neuronas. Cada una posee una única combinación de propiedades, como morfología, conectividad y posición, de modo que cada neurona puede tener una clasificación única. Grupos de neuronas que difieren entre sí solo en posición han sido asignadas a distintas clases. Hay 118 clases que se han hecho siguiendo este criterio, el tamaño de las clases varían entre 1 y 13 neuronas²⁷. Los principales ganglios de la cabeza y de la cola del sistema nervioso de *C. elegans* exhiben una simetría bilateral a nivel anatómico en el que la mayoría de las neuronas de los principales ganglios cerebrales se encuentran como pares de neuronas bilateralmente simétricas²⁸.

3.1.3.5 Sistema excretor

El sistema excretor de este nemátodo es un magnífico modelo de organogénesis tubular involucrando un mínimo de células. El sistema consiste en tres tubos (canal, ducto y poro), una glándula secretora, y dos neuronas asociadas. Así como en órganos más complejos, las células del sistema excretor primero deben adoptar identidades específicas y luego coordinar diversos procesos para formar tubos de topología, forma, conectividad y función fisiológica apropiada. Sus variadas y a veces complejas formas, y la reprogramación dinámica de la identidad celular y la remodelación de la conectividad tubular que ocurre durante el desarrollo larvario son características peculiarmente fascinantes en este órgano²⁹.

3.1.4 Reproducción

Caenorhabditis elegans cuenta con dos formas sexuales: macho y hermafrodita, gracias a esta característica, este modelo es uno de los más utilizados para llevar a cabo diversas investigaciones, siendo los hermafroditas los más estudiados. Aunque hay cierta similitud en las características entre un sexo y el otro, a medida que el nemátodo se desarrolla, las diferencias entre ambos sexos crecen. A nivel

genético, los hermafroditas poseen dos cromosomas X mientras que los machos sólo tienen un cromosoma X, ya que *C. elegans* no cuenta con cromosoma Y, como es el caso de otras especies; así para referirnos a un hermafrodita decimos que es XX, en cambio, para referirnos a un macho decimos que es XO. En cuanto a la cantidad de progenie producida por cada sexo, con menos del 1% de la población siendo machos, este nemátodo prolifera predominantemente como un clon a través de los hermafroditas ¹⁸.

Los hermafroditas producen aproximadamente 300 auto-espermatozoides y luego producen huevos; utilizan eficientemente esos auto-espermatozoides y depositan alrededor de 250 progenies auto-fecundadas³⁰. El sistema reproductivo del hermafrodita produce gametos maduros y proporciona el entorno de fertilización y puesta de huevos. El sistema reproductor consta de tres partes: la gónada somática, la línea germinal y el aparato de la puesta de huevos conformado por: útero, vulva, músculos uterinos y de la vulva y neuronas¹⁻⁶. Después de la fertilización del ovocito, el embrión pasa de la espermateca al útero a través de una válvula espermateca-uterina. Aproximadamente un hermafrodita sentará varios por hora, esta puesta de huevos se lleva a cabo por la contracción de los músculos bulbares, los cuales se unen a los labios de la vulva y a los uterinos³¹.

3.1.4.1 Larva 1

Durante la segunda mitad del estadio L1, los precursores somáticos de las gónadas Z1 y Z4 producen 12 células en el hermafrodita. Los precursores de líneas germinales Z2 y Z3 también comienzan a dividirse, dichas divisiones de Z2-Z3 ocurren de forma continua desde L1 hasta el estadio adulto³². En los machos, Z1 y Z4 se dividen, produciendo 10 células precursoras de gónadas somáticas²³.

3.1.4.2 Larva 2

Durante esta etapa, en el hermafrodita, continúa la división de la célula germinal (descendientes de Z2 y Z3) casi cuadruplicando el número de células. Sin embargo, no se producen divisiones en los linajes de Z1 y Z4 (gónadas somáticas primordiales). Las células somáticas y germinales se entremezclan hasta la muda L2/L3 con la que se reorganizan para establecer la organización general de la futura

gónada: Las células de la punta distal situadas en los extremos anterior y posterior, una población de la línea germinal del brazo anterior y posterior, y un primordio somático gonadal en el centro³².

Por otra parte, en el macho, las células también se reorganizan para parecerse a la forma adulta, con las células gonadales somáticas hacia la parte posterior y las células germinales desplazadas hacia la parte anterior. Cerca de la muda L1/L2, la gónada se extiende, pero sólo hacia uno de los extremos y es conducida por una célula enlazadora³³. Aproximadamente en la mitad de la etapa L2, dicha célula se detiene y se reorienta para moverse dorsalmente.

3.1.4.3 Larva 3

En cuanto al hermafrodita, durante esta etapa, así como al inicio de la etapa L4, los precursores somáticos de las gónadas proporcionan un total de 143 células que forman las envolturas gonadales anterior y posterior, la espermateca y el útero³². La extensión de los brazos gonadales continúa en direcciones opuestas hasta la mitad de la etapa L3, cuando las células de la punta distal se detienen y luego lentamente comienzan a reorientarse en dirección dorsal³³. Se especifican los destinos de los precursores vulvares, y las células involucradas se dividen para generar células terminales vulvares al inicio de L4. Los dos mioblastos sexuales, formados en L3, se dividen para generar 16 células musculares sexuales²³.

En el macho, los blastos de las células somáticas de las gónadas se dividen para generar 53 células gonadales somáticas que formarán el conducto deferente y la vesícula seminal. La célula enlazadora masculina de la gónada somática se reorienta y migra hacia la parte posterior hasta la mitad del estadio L3 extendiendo la gónada proximal. En la segunda mitad de la etapa L3, la célula enlazadora migra oblicuamente hacia la línea ventral media³³. Se generan seis mioblastos masculinos. A medida que los blastos posteriores se dividen, la cola se expande visiblemente cuando se observa al microscopio. Posteriormente, las células se dividen para agregar 16 células al ganglio preanal. Los linajes anteriores contribuyen a las células del cordón nervioso ventral. Los linajes rectales producen células proctodeales y varias de la cola^{34, 35}. En la línea germinal masculina, que produce sólo espermatozoides, la meiosis comienza durante el estadio L3²³.

3.1.4.4 Larva 4

Durante esta etapa en el hermafrodita, los brazos de las gónadas distales continúan su migración centripeta a lo largo de los músculos de la pared del cuerpo dorsal, y por la muda L4/adulto, completan su trayectoria cerca de la línea media³³. La meiosis en la línea germinal comienza en la muda L3/L4 en los brazos proximales

de la gónada, y las células germinales se diferencian en esperma madura. En la muda L4/adulto, se detiene la producción de esperma y las células germinales restantes se siguen dividiendo por meiosis y se diferencian para generar exclusivamente ovocitos. La generación de células terminales vulvares y uterinas es seguida por la morfogénesis del tejido. Las neuronas de ovoposición (VCs y HSNs) y los músculos sexuales, generados a partir de mioblastos sexuales, se asocian con estas estructuras para formar el aparato de ovoposición³⁶.

En los machos durante esta etapa, se forman 41 músculos sexuales masculinos y un coelomocito a partir del linaje M mesoblasto³⁴. Las células alrededor del recto forman el proctodeo. Este epitelio se expande para rodear la cámara cloacal, que contiene las espículas. Posteriormente, la gónada continúa creciendo a lo largo de la línea media ventral, y el conducto deferente y la vesícula seminal se diferencian. La célula enlazadora alcanza la cloaca en desarrollo a mitad de L4 donde muere y luego es absorbida por dos células del proctodeo, abriendo así el conducto deferente al exterior^{33, 35}. Las células hipodérmicas de la punta de la cola se remodelan, generando la cola redondeada del adulto³⁷. Se forma la sutura de la cola (SET). Finalmente, un movimiento general hacia delante de los tejidos posteriores y el colapso de la cutícula remodelan la cola masculina y generan la bolsa copuladora con rayos y abanico, así como el gancho ventral³⁸.

3.1.4.5 Adulto

Aproximadamente 45-50 horas después de la eclosión a 22-25°C, un hermafrodita recién madurado coloca sus primeros huevos, completando así su ciclo de vida reproductiva de 3 días³⁹. El hermafrodita adulto produce ovocitos durante aproximadamente cuatro días, después de este periodo fértil de 3-4 días, el adulto maduro vive durante 10-15 días más. Un hermafrodita que se auto-fecunda puede producir cerca de 300 progenies por la cantidad limitada de esperma, en cambio cuando ocurre un apareo con un macho, el número de la progenie incrementa a 1200-1400. Un macho puede aparearse con éxito con un hermafrodita durante 6 días después de su última muda larval y pueden tener cerca de 3000 descendientes⁴⁰.

De las 1090 células somáticas generadas durante el desarrollo del hermafrodita, 131 sufren muerte celular programada en momentos característicos. Por lo tanto, el hermafrodita adulto de *C. elegans* tiene 959 núcleos somáticos, 302 de los cuales con neuronas y 95 son células musculares de la pared corporal. Por otra parte, el macho adulto, tiene 1033 núcleos somáticos y 385 de éstos son neuronas (las neuronas extra se dedican en mayor medida al comportamiento de la reproducción masculina)⁴¹. Aunque tiene más células, el macho adulto de *C. elegans* es más

delgado y ligeramente más corto (aproximadamente 0.8 micras) que el hermafrodita²³.

3.1.4.6 Control de la ovulación

La ovulación involucra la función coordinada de las células de la vaina gonadal, células especializadas similares a músculo liso que recubren los ovocitos. Durante la ovulación, las células proximales de la vaina gonadal se contraen rápidamente, la contracción distal de la espermateca se dilata, y las células de la vaina halan la espermateca distal sobre el ovocito maduro. El ovocito indica su propia ovulación de dos maneras: modula las contracciones de la vaina gonadal, lo que incluye un aumento en la velocidad de contracción y la intensidad en la ovulación; e induce la dilatación espermática durante la ovulación. Las mutaciones que conducen a una ovulación defectuosa causan un fenotipo de ovocito endomitótico (Emo). Cuando los ovocitos son retenidos en el brazo de la gónada debido a una ovulación defectuosa, se someten a múltiples rondas de ruptura de la envoltura nuclear (Entrada de la fase M) y fase S, y se vuelven altamente poliploides⁴².

3.1.4.7 Control de la fertilización

La fertilización depende de una serie de interacciones en las que los espermatozoides y los ovocitos se reconocen, se unen y fusionan. La activación del ovocito (el proceso en el que el ovocito completa las divisiones meióticas), el bloqueo de la polispermia, y la activación del programa embrionario son dependientes de la fertilización. Singson y colaboradores lograron caracterizar y clonar el gen *spe-9* el cual cumple un papel importante en los espermatozoides para el proceso de fertilización. Las mutaciones de este gen no afectan la espermatogénesis y los espermatozoides tienen una morfología normal. El gen *spe-9* codifica una proteína transmembrana que contiene un dominio extracelular con 10 repeticiones de tipo EGF, por lo cual, Singson y colaboradores propusieron que este gen puede funcionar como ligando para un receptor de ovocitos⁴².

3.2 Vía de señalización de la insulina

3.2.1 Receptor de insulina

Se encuentra formado por 2 subunidades alfa y 2 beta, codificadas por un gen ubicado en el cromosoma 19. Las dos subunidades beta son transmembrana mientras que las subunidades alfa se encuentran en la parte externa de la membrana. Las subunidades alfa se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro, y estas a su vez se unen a las subunidades beta por enlaces disulfuro.

Al interior de la célula ocurre una transferencia de grupos fosfatos provenientes del ATP gracias a la acción del receptor de insulina, como resultado de esta actividad ocurre un incremento en el transporte de moléculas de glucosa generando una acumulación al dentro de las células musculares y adipocitos.

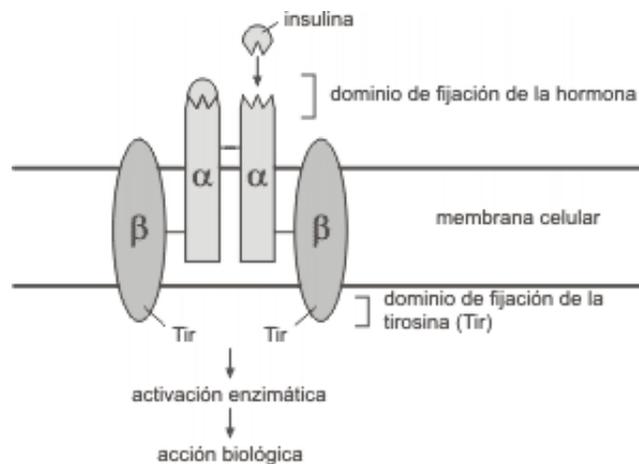


Figura 4: Subunidades alfa y beta del receptor de insulina⁴³

3.2.2 Transducción de la señal

La insulina que ha sido producida en los Islotes de Langerhans entra al torrente sanguíneo hasta unirse al extremo N-terminal de los receptores de insulina, ubicados en el tejido muscular, adiposo y hepático. Una vez la insulina interactúa con su receptor, una molécula de fosfato se combina con la tirosina dando inicio a la señalización. En el modelo de investigación *C. elegans*, se conoce una ruta homóloga a una de las vías de la señalización de la insulina en humanos, siendo ésta la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)⁴³.

3.2.3 Vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K): Metabolismo de la glucosa y de los lípidos

El receptor fosforilado hace que se incorpore el fosfato a otra molécula denominada IRS-1 (Sustrato I del receptor de insulina), el cual se fosforila uniéndose a proteínas SH2; una de estas proteínas SH2 es la Fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K), a la cual fosforila y se forma el complejo IRS1-PI3K⁴³.

Cuando la insulina llega a los hepatocitos y se une a su receptor, se activa la vía de la PI3K, produciendo la translocación del transportador GLUT2, lo cual permite el paso de la glucosa al interior de la célula, ésta entra en la vía de la glucólisis siendo fosforilada por la glucoquinasa, dando como producto glucosa-1-fosfato. Mediante la activación por UTP, la glucosa-1-fosfato puede unirse al extremo de una cadena de glucógeno gracias a la glucógeno sintetasa. De este modo se produce la glucogenogénesis, es decir, el almacenamiento de la glucosa en exceso en forma de glucógeno en el interior de las células hepáticas.

Por otra parte, cuando la insulina llega al tejido muscular y adiposo, se promueve la translocación del transportador GLUT4 desde compartimientos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K y de la quinasa Akt, la cual controla la supervivencia celular a través de la fosforilación de las moléculas que dependan de ella (BAD y Caspasa 9), dando como resultado, el incremento en la supervivencia celular, proliferación, crecimiento y metabolismo.

Dado que en el hígado se da principalmente la gluconeogénesis, existe una pequeña vía de activación de la glucólisis e inhibición de la gluconeogénesis ya que ambos procesos no se pueden dar al mismo tiempo. La glucosa que entra a la célula llega al segundo punto de control de la glucólisis convertida en glucosa-6-fosfato, donde es catalizada por la fosfofructoquinasa fosfatasa, quedando como fructosa-2-6-bifosfato. Esta molécula activa la enzima fosfofructoquinasa-1 produciendo fructosa-1-6-bifosfato, ésta inhibe a la fructosa-1-6-bifosfatasa, dando como resultado la inhibición de la gluconeogénesis y activación de la glucólisis⁴³.

3.3 *Morinda citrifolia* (Noni)

Morinda citrifolia es un arbusto de alrededor de 6 m de altura, de hojas opuestas, de la familia Rubiaceae, que, por lo general, se desarrolla en climas húmedos y

templados. Su fruto, se produce durante todo el año y ha sido ampliamente utilizado en la medicina por sus poderes curativos; se considera la “fruta sagrada que regenera el cuerpo”. Actúa como antiinflamatorio, analgésico, mejora el sistema inmunológico, la circulación, etc. Se consume el jugo, extraído del fruto. Aún no se conocen los mecanismos según los que funciona, pero se sabe que contiene compuestos como Escopoletina, Damnacanthal y la Norepinefrina, los cuales se cree son los que le confieren algunas de sus propiedades curativas⁴⁴.



Figura 5: Planta con fruto de *Morinda citrifolia* ⁴⁵

3.3.1 Principales componentes del noni

En la tabla 2 se hace una breve descripción de las sustancias más relevantes del fruto noni y su importancia.

Tabla 2: Principales sustancias de *Morinda citrifolia* (noni)⁴⁶

Sustancia	Importancia
Xeronina	Alcaloide que cataliza proteínas, una de sus principales funciones es la regulación de la conformación espacial de las proteínas así como de su mantenimiento.
Norepinefrina	Es una catecolamina con múltiples funciones fisiológicas y homeostáticas que puede actuar como hormona y como neurotransmisor. Neutraliza reacciones alérgicas.
Damnacanthal	Inhibe la acción de células cancerígenas (carcinoma hepatocelular Hep G2). A medida que el damnacanthal impide el crecimiento de los tejidos malignos, contiene un

	derivado de la antraquinona, la antralina es un irritante utilizado en dermatología para combatir la psoriasis.
Oligosacáridos	Es un tipo de azúcar que estimula la producción de serotonina, antidepresivo, analgésico, somnífero, combate la migraña.
Flavonoides	Sustancias de la pigmentación de las frutas y los vegetales. Ayudan en la reparación de los capilares, son antiinflamatorios y antivirales. Tienen efecto antioxidante gracias a que reducen la cantidad de radicales libres.
Enzimas	El Noni es fuente de la enzima broncalina que retarda el envejecimiento. Ayuda a la digestión y absorción de nutrientes.
Adaptógeno	Neutralizador del pH mejorando la función del páncreas, hígado, riñones, vejiga, sistema reproductor. Por lo tanto, mejora condiciones como la diabetes o hipoglucemia, colesterol calambres menstruales y presión sanguínea.

Ralph Heinicke 1985

4. Diseño metodológico

4.1 Tipo de diseño

Descriptivo experimental

4.2 Universo, población y muestra

Universo: Nemátodos *Caenorhabditis elegans*

Población: Cepa N2

Muestra: Cepa adquirida de CGC Genetics *Caenorhabditis elegans* Cepa N2.

4.3 Hipótesis, variables e indicadores

Hipótesis: El extracto etanólico obtenido a partir de hojas de noni (*Morinda citrifolia*) ejerce un efecto positivo sobre la reproducción y la motilidad de *Caenorhabditis elegans* cepa N2 expuesta a una dieta rica en glucosa.

Variable independiente: Extracto de Noni

Variable dependiente: *Caenorhabditis elegans*,

Indicadores: Reproducción y motilidad

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Preparación de placas NGM

Para la preparación de 500 mL del medio NGM (Nematode Growth Medium) se pesaron 1.5 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 8.5 g de agar, 1.3 g de peptona, y se diluyeron en 487 mL de agua destilada. Se calentó la mezcla en plancha hasta alcanzar la ebullición. Luego, se esterilizó en autoclave durante 20 minutos, y se enriqueció con 0.5 mL de cloruro de calcio (CaCl₂) 1M, 0.5 mL de colesterol, 0.5 mL de sulfato de magnesio (MgSO₄) 1M, y 13 mL de buffer KPO₄ 1M. Finalmente, se sirvió el medio en placas de Petri estériles, aproximadamente 20 mL de agar en cada una, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

4.4.2 Sincronización de *C. elegans*

Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de tener los nematodos en el mismo estadio, y poder tener un control sobre la cepa. Se inició con un lavado de las cajas con aproximadamente 200 nematodos en estadio larva L4 y adulto, con 3 mL de Buffer M9 y se traspasó a un tubo Falcon con hielo. Enseguida se llevó a centrifugación por 3 minutos a 2500 rpm, se descartó el sobrenadante; se repitió el lavado dos veces. Luego, se agregó 2 mL de solución de lavado o “bleaching” (agua con hipoclorito de sodio al 4%) y se agitó en vortex por 8 minutos a una velocidad media- alta alternando en el hielo, hasta no observar larvas. Posteriormente, se centrifugó de nuevo por 5 minutos a 3000 rpm, si aún se observaban larvas, se repetía el lavado hasta que no se observaran larvas, se descartó el sobrenadante y se adicionó 2 mL de Buffer M9 para cortar la reacción. Se centrifugaron por 3 minutos a 2500 rpm, y se descartó el sobrenadante, se realizó el lavado 2 veces más, con el fin de obtener los huevos libres de contaminantes. Se agregaron 0.2 mL de Buffer M9 y se agitó vigorosamente. Se dejaron toda la noche a 20° C, y se lavaron con 1 mL de buffer M9, finalmente este producto se transfirió a medio NGM fresco con *E. coli* OP50 y se observó con estereoscopio los huevos de *C. elegans*.

4.4.3 Siembra de *E. coli* OP50 y *C. elegans* en placas de NGM

A partir de una alícuota de la bacteria *E. coli* OP50, se sembró un botón en el medio NGM, la cual se confirmó con tinción de Gram. Se procedió a hacer repiques individuales de los nemátodos cerca del botón de *E. coli* con el fin de observar si el nematodo presentaba un desarrollo normal de sus thrashings (movimiento del gusano). Otro método utilizado para siembra de *C. elegans*, fue mediante sacabocado, que consiste en transferir un trozo del medio, en lugar de transferir los nemátodos de forma individual; dicha parte del medio se deposita boca abajo en el nuevo agar, igualmente a una distancia prudencial de la bacteria, de este modo, los nemátodos se pueden movilizar libremente.

4.4.4 Obtención del extracto

Para la obtención del extracto se sometieron las hojas de noni (*Morinda citrifolia*) a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 10 días, luego se maceraron 10 g de las hojas en 250 ml de etanol absoluto durante dos semanas. Luego de este tiempo la solución se filtró y se llevó a rota evaporación; el alcohol fue separado por destilación y el producto obtenido se dejó en frasco ámbar destapado con el fin de dejar evaporar los residuos de disolvente⁴⁷.

4.4.5 Preparación de las concentraciones del extracto

Se preparó la solución madre disolviendo los 462 mg de peso inicial del extracto en 4 ml de agua destilada, siendo la concentración inicial de 115,5 mg/ml. Luego se adicionó al medio cada una de las concentraciones (0.01, 0.1 y 1 mg/ml), empleando la siguiente fórmula:

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

4.4.6 Evaluación del extracto sobre *E. coli* OP50

Luego de obtener las diferentes concentraciones del extracto de hojas de noni, se impregnaron discos de papel filtro con cada concentración. Se llevó la cepa de *E. coli* OP50 a escala 0.5 de Mc Farland, se realizó siembra masiva en agar Mueller Hinton, y se colocaron los discos de papel filtro impregnados con el extracto. Esto se llevó a incubación a 37 °C durante 48 horas, con el fin de observar si el extracto ejercía algún tipo de inhibición en el crecimiento de la *E. coli* OP50. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.4.7 Exposición de la cepa N2 al extracto

Se preparó medio NGM como está descrito en el ítem 4.4.1, agregando las diferentes concentraciones del extracto (0.01, 0.1 y 1 mg/ml). Posteriormente, se realizó sincronización de la cepa N2 como está estipulado en el ítem 4.4.2, dejando los huevos obtenidos en las cajas con las diferentes concentraciones del extracto, con el fin de observar el efecto de las concentraciones del extracto sobre la cepa silvestre N2. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.4.8 Exposición de la cepa N2 a glucosa

El medio NGM se preparó como se describe en el numeral 4.4.1. Adicionalmente se agregó una cantidad de 7,2 g de glucosa para lograr una concentración de 14 mmol/L por gusano como se encuentra descrito en la metodología utilizada por Schlotterer y colaboradores¹⁴. Posteriormente, se realizó sincronización a partir de una caja con cepa N2, dejando los huevos en el medio con glucosa. Se permitió el desarrollo de los nemátodos y se observaron los efectos sobre la motilidad y la reproducción de la cepa N2 ante la dieta rica en glucosa.

4.4.9 Visualización de acúmulos de grasa en *C. elegans*

Caenorhabditis elegans almacena la grasa en forma de gotas en sus células intestinales e hipodérmicas. Gracias a que el cuerpo del gusano es transparente, es posible visualizar estas gotas de grasa. La acumulación de grasa se evidenció en la cepa N2 con y sin glucosa, empleando Negro Sudán B según lo descrito por Kaveh Ashrafi y colaboradores⁴⁸. Este ensayo fue realizado por triplicado.

4.4.10 Evaluación del extracto sobre la cepa N2 modelo diabetes

Cuando se observaron los cambios morfológicos en la cepa N2 sometida a altas concentraciones de glucosa, se transfirieron nemátodos adultos a cajas preparadas con extracto etanólico de hojas de noni, con el fin de observar el efecto de dicho extracto sobre la cepa N2 sometida a altas concentraciones de glucosa. Adicionalmente, se verificó con Negro Sudán B. Ensayo realizado por triplicado.

4.4.11 Caracterización fenotípica

Se observaron las características morfológicas, reproductivas y motoras en la cepa N2 antes, durante y después de cada uno de los ensayos, como se describe a continuación.

4.4.11.1 Ensayo de reproducción

Los nematodos sincronizados se cultivaron en placas con agar NGM con y sin extracto. Se permitió el desarrollo de los gusanos hasta el estado larvario L4, se hizo una transferencia a placas nuevas en cada una de las cuales se depositó un gusano hasta el final de su periodo reproductivo, al cabo del cual las placas con los huevos puestos por los gusanos se dejaron a temperatura ambiente durante 36 horas, para que los huevos eclosionaran y pasaran hasta el estado larvario L1 y L2. Finalmente se realizó conteo de larvas haciendo un recorrido total de la placa a través del estereoscopio.

4.4.11.2 Ensayo de motilidad

El ensayo de motilidad se realizó mediante el conteo del número de thrashings (movimiento del nemátodo) durante 30 segundos, luego de un estímulo en gusanos adultos. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado tanto en los nemátodos expuestos al extracto como en los nemátodos con dieta rica en glucosa, al igual que en la cepa control (N2 sin tratamiento).

4.4.12 Análisis estadístico

La elaboración de las gráficas en el presente informe y el análisis estadístico de cada una se realizó mediante el programa GraphPad Prism 7.0 (One-way ANOVA).

5. Resultados

En este estudio se analizó el efecto del noni en cepas de *C. elegans* N2 sometidas a diferentes concentraciones de extracto etanólico de las hojas, los nematodos fueron sometidos a concentraciones ricas en glucosa con el fin de inducirles diabetes y una vez confirmado el modelo se realizaron ensayos de motilidad y reproducción para observar los efectos del extracto sobre el modelo.

5.1 Obtención del extracto de Noni y evolución frente a *E. coli* OP50

A partir de hojas de noni secas, maceradas y en contacto con etanol absoluto, se llevó a cabo la obtención del extracto etanólico en un roto evaporador. El proceso de evaporación se llevó a cabo durante dos horas, obteniendo un total de 462 mg de extracto puro de hojas de noni con el cual se realizaron las diferentes diluciones (Figura 6).



Figura 6: Proceso de obtención del extracto etanólico. A) Hojas secas de noni. B) Hojas de noni maceradas con mortero. C) Rotoevaporador. D) Hojas de noni en etanol absoluto, almacenado en frasco ámbar. Tomada por Camila Cortes y Judith Espitia. Laboratorio de investigación 1 UCMC.

A partir de la solución madre con una concentración de 115,5 mg/ml del extracto, se realizaron los cálculos para determinar el volumen de cada concentración a agregar en el medio usando la fórmula anteriormente mencionada. Para lograr una concentración de 0,01 mg/ml del extracto, se disolvió 17 μ l de la solución madre en 199,9 ml de medio NGM; para la concentración de 0,1 mg/ml, se disolvió 173 μ l en

199,8 ml de medio; y por último para lograr una concentración de 1 mg/ml, se tomaron 1,73 ml de la solución madre y se disolvieron en 198,2 ml de medio en fase líquida. Posteriormente se sirvió el medio NGM con cada una de las concentraciones en placas de Petri, se sembró botón de *E. coli* OP50 y se dejó en incubación por 48 horas a 37 °C.

Después de obtener el extracto en sus diferentes concentraciones (0.01, 0.1 y 1 mg/ml), y colocar los discos de papel filtro impregnados con dichas concentraciones en el agar Mueller Hinton con *E. coli* OP50, se pudo observar luego de 48 horas de incubación a 37°C que el extracto permitió el desarrollo normal de la *E. coli* OP50, ya que en todas las concentraciones se observó crecimiento de dicha bacteria (Figura 7).



Figura 7: Crecimiento de *E. coli* OP50 en agar Mueller Hinton. Se observa desarrollo normal frente a cada una de las concentraciones del extracto de noni, luego de 48 horas de incubación a 37°C. Tomada por Camila Cortes. Laboratorio de investigación semillero Biotecnología y Genética UCMC.

5.2 *C. elegans* N2 y extracto de noni

Inicialmente cada uno de los estados larvarios fueron observados y caracterizados en la cepa N2 sin someter a glucosa (Figura 8). Los huevos obtenidos a partir de la sincronización fueron transferidos a medio NGM nuevo, donde permanecieron entre 14 y 16 horas. Al cabo de este tiempo, ocurre la eclosión y el nemátodo pasa al estado larvario L1, en el cual no es posible diferenciar los órganos del gusano. Luego de aproximadamente 12 horas, el nemátodo pasó al estado larvario L2, en el que se observó una mayor complejidad a nivel interno, y un mayor tamaño con

respecto al estado larvario L1. Aproximadamente 8 horas después el nematodo alcanzó el estado larvario L3, en el cual fue posible observar una mayor diferenciación en la estructura interna y un aumento de tamaño considerable. Pasadas 8 horas, el gusano alcanzó el estado L4, donde fue posible observar la estructura interna más definida y un aumento en el tamaño del mismo. Cerca de 10 horas después de alcanzar la etapa L4, el gusano llegó al estado adulto joven y luego de 8 horas, la etapa de adulto maduro, mostrando estructura interna bien definida y mayor tamaño con respecto a la larva L4.

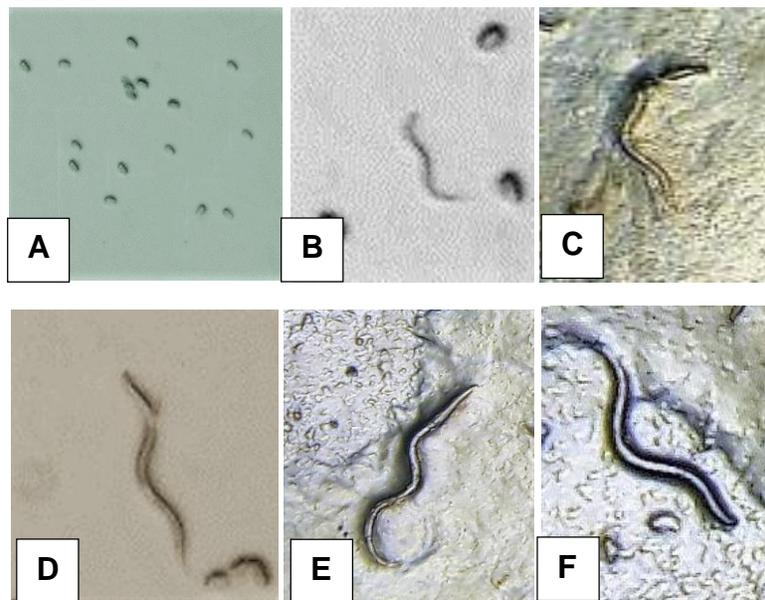


Figura 8: Morfología de *C. elegans*. A) Huevos post sincronización. B) Etapa larva 1, 14 – 16 horas post sincronización. C) Estado larvario L2, 26-28 horas post sincronización. D) Etapa larva 3, 36 horas luego de la sincronización. E) Estado larvario L4, 44 horas post sincronización. F) N2 adulto 48 – 52 horas post sincronización.

5.2.1 Morfología de *C. elegans* con extracto de noni

Al someter la cepa N2 sin glucosa a las diferentes concentraciones del extracto, se pudo observar que el extracto no ejerce ningún tipo de efecto negativo sobre el nematodo, ya que no se evidenciaron cambios significativos en la morfología del gusano y tuvo un desarrollo normal en cada uno de sus estados larvarios y en su estado adulto. En cuanto al diámetro no se observó diferencia entre la cepa control (N2 sin glucosa) y la cepa sometida al extracto. Con respecto a la longitud del gusano, al someterse al extracto, se observó un leve alargamiento con la

concentración de 1 mg/ml del extracto, mientras que con las otras dos concentraciones (0,01 y 0,1 mg/ml) no hubo cambios en la longitud del nematodo.

5.2.2 Reproducción de la cepa N2 con extracto de noni

En una cepa N2 silvestre, sin ningún tipo de tratamiento, el hermafrodita adulto produce ovocitos durante aproximadamente cuatro días, después de este periodo fértil de 3-4 días, el adulto maduro vive durante 10-15 días más. Un hermafrodita que se auto-fecunda puede producir cerca de 300 progenies por la cantidad limitada de esperma, en cambio cuando ocurre un apareo con un macho, el número de la progenie incrementa a 1200-1400²³.

Al someter la cepa N2 a las diferentes concentraciones del extracto de hojas de noni, se pudo observar que el extracto no ejerce ningún efecto inhibitorio en la reproducción del nemátodo en ninguna de sus concentraciones. Esto se pudo evidenciar en el conteo de larvas en etapa L1 y L2, donde no se obtuvo diferencia significativa en la cantidad de larvas con las concentraciones del extracto con respecto al grupo control (cepa N2 sin tratamiento) (Figura 9). Al final del ciclo reproductivo del nemátodo, se obtuvo en promedio un total de 232 larvas en el grupo control, 222 larvas en los nematodos expuestos a concentración 0,01 mg/ml, 223 larvas en la cepa expuesta a concentración 0,1 mg/ml, y 229 larvas en la cepa expuesta a concentración de 1 mg/ml del extracto (Anexo 1).

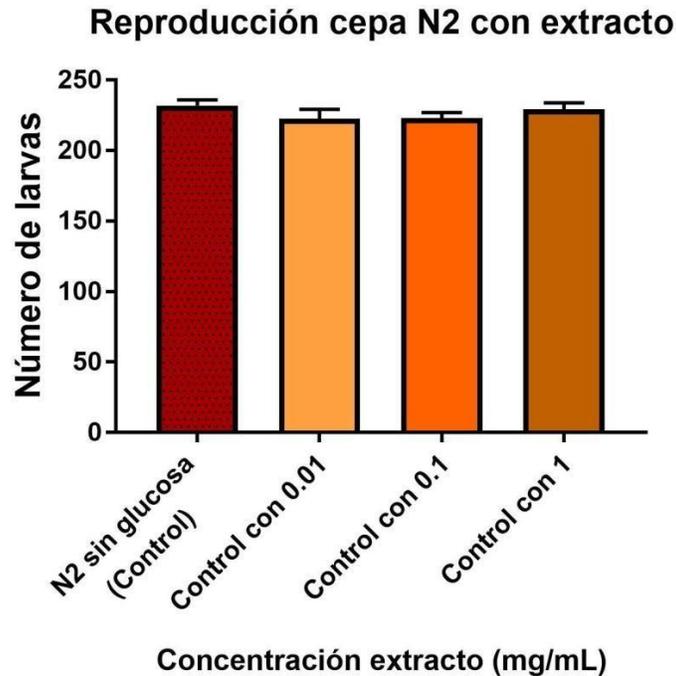


Figura 9: Reproducción cepa N2 expuesta a concentraciones del extracto. Se observa el comportamiento reproductivo de *Caenorhabditis elegans* sin ningún tratamiento (N2), y tratado con concentraciones de 0.01, 0.1 y 1 mg/ml del extracto etanólico de noni. Se observa gran similitud en la capacidad reproductiva del nemátodo tanto con tratamiento como sin tratamiento. Análisis estadístico: GraphPad Prism (One-way ANOVA), P = 0.1171.

5.2.3 Motilidad de la cepa N2 con extracto de noni

La evaluación de la motilidad del nemátodo se realizó teniendo en cuenta el número de thrashings realizado por cada gusano ante un estímulo durante 30 segundos. En la cepa N2 silvestre el número de thrashings en promedio es de 1 por segundo, al someter la cepa N2 sin glucosa a cada una de las concentraciones del extracto, no se obtuvo gran diferencia en el número de thrashings con respecto a la cepa control (N2 sin glucosa). En la tabla 3 se muestra el número de thrashings obtenidos en cada uno de los ensayos en la cepa control y en la cepa sometida a las concentraciones del extracto.

Tabla 3: Motilidad de *C. elegans* con extracto. Se observa el número de thrashings realizados por el nemátodo sin tratamiento (N2 sin glucosa) y tratado con las concentraciones del extracto.

Ensayo de motilidad					
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Thrashings por 30 segundos	N2 sin glucosa	29	31	30	30
	N2 con 0,01 mg/ml	28	29	29	28,67
	N2 con 0,1 mg/ml	29	27	29	28,33
	N2 con 1 mg/ml	29	28	30	29

5.3 Modelo de *C. elegans* diabetes inducido

El modelo diabetes inducido en *C. elegans* se logró como fue descrito por Schlotterer y colaboradores¹⁴, agregando 7,2 g de glucosa al medio en fase líquida para lograr una concentración de 14 mmol/L por gusano. Este modelo de diabetes inducido permitió observar los efectos y cambios que ejerce una dieta rica en glucosa sobre el nematodo. A continuación, se describen los efectos de la exposición a una dieta rica en glucosa sobre la morfología, reproducción y motilidad de *C. elegans* N2.

5.3.1 Morfología de modelo *C. elegans* diabetes inducido

Luego de exponer la cepa N2 a altas concentraciones de glucosa, fue posible observar cambios en la morfología como el aumento en el diámetro corporal del gusano con respecto al nematodo sin glucosa, dichos cambios fueron observados en microscopio y estereoscopio (Figura 10).

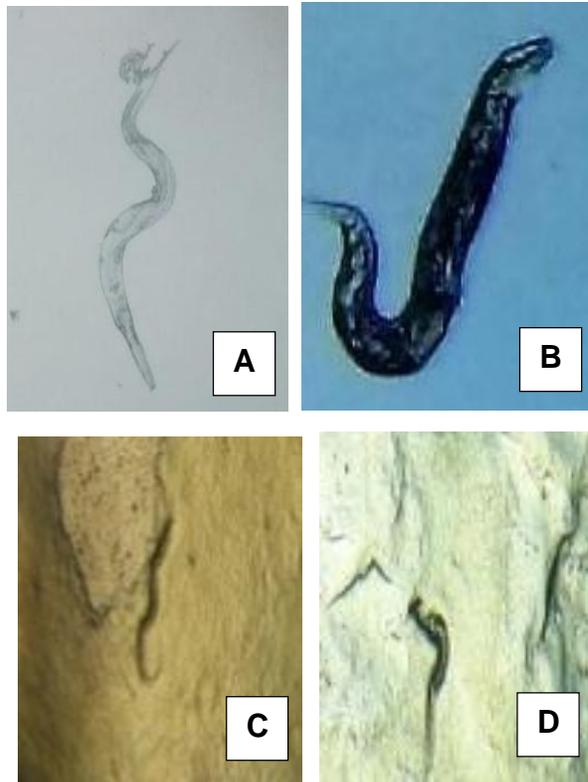


Figura 10: Morfología *C. elegans*. A-B) Cepa N2 sin glucosa y con glucosa visto en microscopio objetivo 40X.C-D) Cepa N2 sin glucosa y con glucosa visto en estereoscopio.

El cambio en el diámetro del nematodo al exponerse a glucosa se sugiere que es debido a acúmulos de grasa la cual se evidenció mediante tinción con Negro Sudán B el cual tiene afinidad por los lípidos, permitiendo que se colorean de tono azul rojizo. En la Figura 9 se observa un nematodo de la cepa N2 sin ningún tipo de tratamiento y donde no se evidencia acumulo excesivo de grasa (Figura 11A). Al someter la cepa N2 a una dieta rica en glucosa y teñir con Negro Sudan B, es posible observar las gotas de grasa acumuladas a lo largo del cuerpo del nematodo (Figura 11B).



Figura 11: Acúmulos de grasa en *C. elegans*. Se evidenció la acumulación de grasa mediante tinción con Negro Sudán B. A) Adulto N2 sin tratamiento. B) Adulto N2 con glucosa.

5.3.2 Reproducción modelo *C. elegans* N2 diabetes inducido

Luego de someter la cepa N2 a una dieta rica en glucosa, se evidenció una disminución notoria en la capacidad reproductiva el nematodo, ya que al realizar el conteo de las larvas en etapa L1 y L2 al finalizar el ciclo reproductivo del nematodo, se obtuvo un promedio de 232 larvas en el grupo control (N2 sin glucosa), mientras que, en la cepa sometida a glucosa, el promedio de larvas disminuyó a 174 larvas (Anexo 2). Esto permite evidenciar el efecto negativo que ejerce una concentración elevada de glucosa, sobre la reproducción de *Caenorhabditis elegans* (Figura 12).

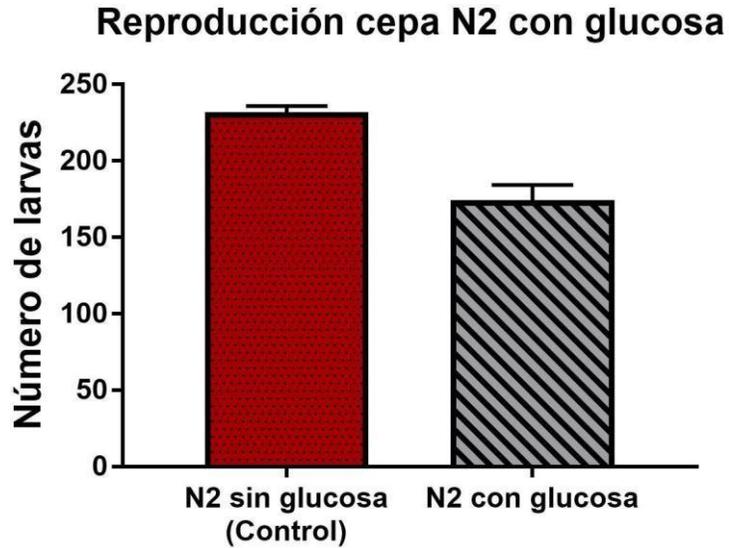


Figura 12: Reproducción *C. elegans* N2 modelo diabetes inducido. Se observa disminución significativa en la cantidad promedio de larvas en la cepa expuesta a glucosa con respecto a la cepa control (N2 sin glucosa). GraphPad Prism.

5.3.3 Motilidad de modelo *C. elegans* N2 diabetes inducida

La evaluación de la motilidad del nemátodo se realizó teniendo en cuenta el número de thrashings realizado por cada gusano ante un estímulo durante 30 segundos. En la cepa N2 silvestre el número de thrashings en promedio es de 1 por segundo, en cambio, al ser sometido a altas concentraciones de glucosa, se evidencia una reducción significativa en el número de thrashings. En la tabla 4 se muestra el número de thrashings obtenidos tanto en la cepa N2 sin glucosa, como en la cepa N2 con glucosa.

Tabla 4: Motilidad modelo diabetes inducido. Número de thrashings realizados por la cepa control (N2 sin glucosa) y la cepa N2 expuesta a glucosa.

Ensayo de motilidad					
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Thrashings por 30 segundos	N2 sin glucosa	29	31	30	30
	N2 con glucosa	18	21	16	18,33

5.4 Modelo *C. elegans* diabetes inducido con extracto de noni

Luego de inducir un estado de diabetes en la cepa N2, los gusanos fueron expuestos a cada una de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de noni, con el fin de observar los efectos que éste ejerce sobre el modelo diabético inducido. Fue posible observar una recuperación en cuanto a la morfología, reproducción y motilidad de la cepa, principalmente al tratarse con la concentración de 1 mg/ml del extracto de noni.

5.4.1 Morfología de modelo *C. elegans* diabetes inducido con extracto de noni

Luego de exponer el modelo diabético a cada una de las concentraciones del extracto, se pudo observar una reducción en el diámetro corporal en la cepa tratada con la concentración 1 mg/mL del extracto de Noni (Figura 13).

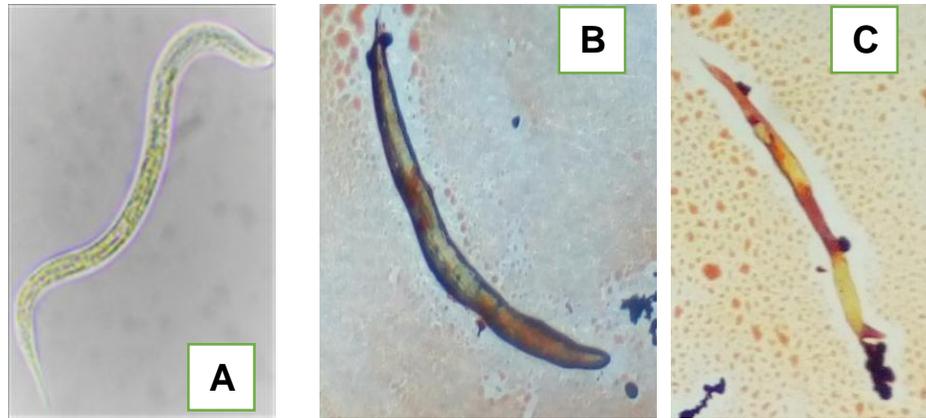


Figura 13: Acúmulos de grasa en *C. elegans*. A) Nematodo adulto N2 sin glucosa. B) Nematodo adulto N2 con glucosa. C) Adulto N2 con glucosa tratado con 1 mg/ml de extracto de noni.

5.5 Reproducción modelo *C. elegans* N2 diabetes inducido tratado con extracto de noni

Al someter los nematodos que habían sido tratados con glucosa a las diferentes concentraciones del extracto (0.01, 0.1 y 1 mg/ml), se observó una recuperación en la reproducción de *C. elegans*, ya que en la cepa N2 con glucosa en promedio se obtuvo un conteo de 174 larvas en etapa L1 y L2; al tratarse con la concentración de 0,01 mg/ml del extracto, el promedio de larvas fue de 194; en el caso de la concentración de 0,1 mg/ml este promedio aumentó a 209 larvas; y por último al tratarse con la concentración de 1 mg/ml del extracto, el promedio fue de 220 larvas (Anexo 2). Al comparar el promedio de cada uno de los grupos con el promedio de la cepa control (232 larvas), es posible observar que, aunque no hay una recuperación total de la reproducción, hay una mejoría notoria al exponer nematodos con dieta rica en glucosa a las diferentes concentraciones del extracto, siendo la concentración de 1 mg/ml la más cercana al promedio de larvas contadas en la cepa silvestre N2 (Figuras 14 y 15).

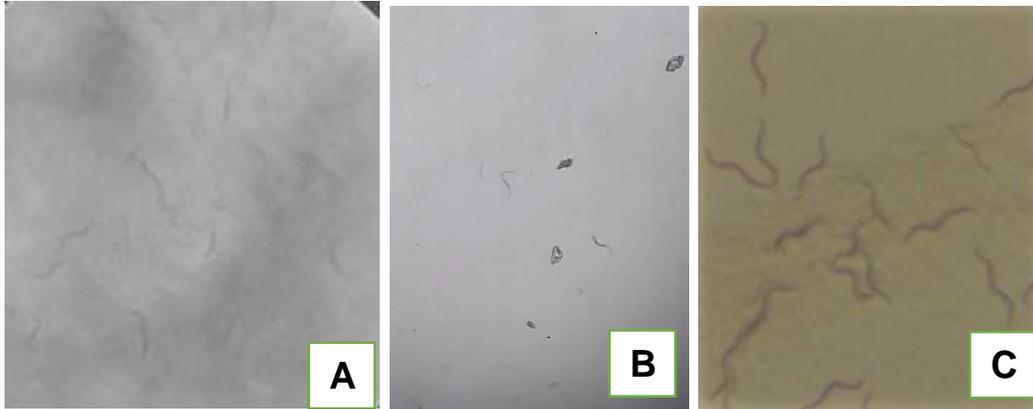


Figura 14: Población de larvas de *C. elegans*. A) Cepa N2 sin glucosa (Control). B) Cepa N2 con glucosa. C) Modelo diabetes inducido con extracto de concentración. 1 mg/ml de extracto de noni.

Reproducción N2 diabetes inducido con extracto

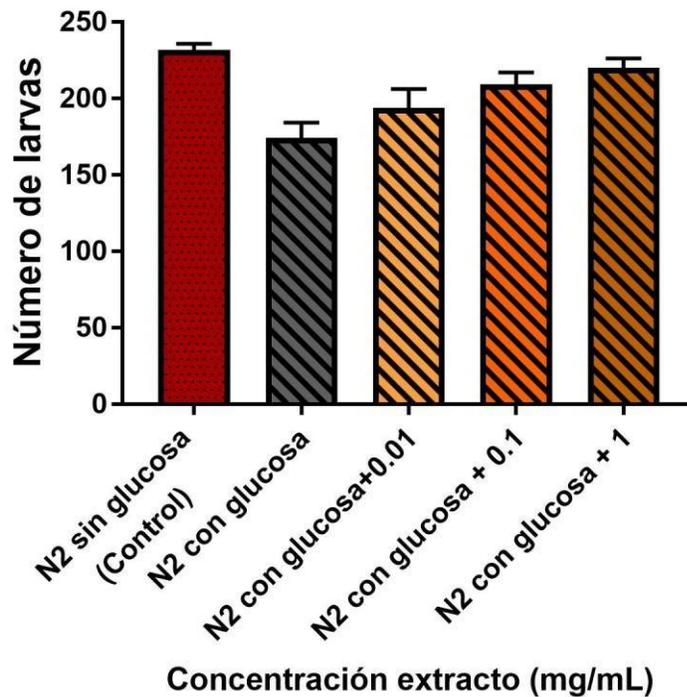


Figura 15: Reproducción *C. elegans* N2 modelo diabetes inducido tratado con extracto de noni. Se observa el comportamiento reproductivo de la cepa N2 sin glucosa, con glucosa, y con tratamiento del extracto a diferentes concentraciones. Se evidencia que hay una recuperación significativa de la reproducción al tratarse

la cepa con la mayor concentración del extracto (1mg/ml). GraphPad Prism (One-way ANOVA) $P < 0,0001$.

5.6 Motilidad modelo *C. elegans* N2 diabetes inducida tratada con extracto de noni.

La evaluación de la motilidad del nemátodo se realizó teniendo en cuenta el número de thrashings realizado por cada gusano ante un estímulo durante 30 segundos. En la cepa N2 silvestre el número de thrashings en promedio es de 1 por segundo, en cambio, al ser sometido a altas concentraciones de glucosa, se evidencia una reducción significativa en el número de thrashings. Por otra parte, el extracto por sí solo no ejerce ningún efecto en la motilidad del nemátodo. En cuanto a la cepa expuesta a glucosa y posteriormente tratada con las diferentes concentraciones del extracto, se observó una mejoría significativa con la concentración de 1 mg/ml (Tabla 5).

Tabla 5: Motilidad modelo diabetes inducido tratado con extracto. Se observa el número de thrashings realizado por el nemátodo sin tratamiento (N2), el modelo diabetes inducido, y tratado con las concentraciones del extracto.

Ensayo de Motilidad					
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Thrashings por 30 segundos	N2 sin glucosa (control)	29	31	30	30
	N2 con glucosa	18	21	16	18.33
	N2 con glucosa + 0,01 mg/ml	23	22	20	21.67
	N2 con glucosa + 0,1 mg/ml	26	24	25	25.00
	N2 con glucosa + 1 mg/ml	28	26	29	27.67

6. Discusión

El nematodo *Caenorhabditis elegans* ha sido de gran utilidad en el área de investigación, ya que, gracias a su homología genética con los humanos, ha permitido y facilitado el estudio de diversas enfermedades entre las cuales se encuentra la diabetes. Cuenta con características que lo hacen un buen modelo de investigación, entre las cuales se destacan, facilidad de manejo y mantenimiento en el laboratorio, corto ciclo de vida lo cual permite obtener resultados en poco tiempo y buena capacidad reproductiva.

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades que actualmente tiene gran relevancia a nivel mundial. Dicho síndrome se presenta principalmente en adultos, pero en los últimos años esta enfermedad también ha afectado la población infantil, provocando efectos negativos en la calidad de vida de las personas que padecen DM. El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anormalidades metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes. Es importante mencionar que el síndrome metabólico ha sido considerado un equivalente diagnóstico de prediabetes, por ser predictor de diabetes⁴⁹. Uno de los síntomas característicos del SM es la obesidad abdominal o central, en la que se producen adipoquinas como la leptina y el TNF- α , las cuales pueden conducir al desarrollo de hipogonadismo y a una resistencia a la insulina, resultando en DM tipo 2⁵⁰.

Para evaluar y explicar la importancia de este trastorno, se han realizado estudios en *C. elegans* que permiten plantear dos teorías acerca de la relación de la insulina con la longevidad de los nematodos: la primera teoría propone que el mecanismo de señalización de la insulina tiene un efecto sobre el nematodo reduciendo o prolongando su esperanza de vida, la segunda teoría propone que la insulina determina la capacidad de las células para soportar el estrés oxidativo de la respiración mediando la tasa de envejecimiento⁵¹.

El presente estudio se llevó a cabo con el fin de observar los efectos y diferencias fenotípicas que tiene una dieta rica en glucosa y su tratamiento con extracto obtenido a partir de hojas de *Morinda citrifolia* (noni), sobre la capacidad reproductiva y motilidad del nematodo *Caenorhabditis elegans* cepa N2.

Como factor de riesgo para el síndrome metabólico se encuentra el trastorno del metabolismo de los lípidos. El acúmulo de grasa en los músculos y diferentes órganos indica una desregulación en la vía metabólica, lo cual puede conducir a diabetes, obesidad, arteriosclerosis, envejecimiento acelerado y pérdida de la reproducción, representando un riesgo en la salud pública. Gracias a varios estudios realizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans* incluyendo la investigación hecha por Hashmi y colaboradores, ha sido posible establecer que el nematodo posee una homología con los humanos en el metabolismo de los lípidos,

razón por la cual ha sido tomado como modelo para evaluar diferentes factores hipoglucemiantes⁵²⁻⁵³.

El modelo de *C. elegans* diabetes inducido se logró al agregar glucosa al medio de cultivo NGM en una concentración de 14 mmol/L por cada gusano, tal como lo describió Schlotterer et al en su estudio¹⁴. Se pudo determinar que la concentración de 14 mmol/L de glucosa es suficiente para que el nematodo tenga un cambio en la morfología corporal de manera similar a un mamífero con diabetes. Al someter la cepa de *C. elegans* N2 (control) a altas concentraciones de glucosa fue posible evidenciar cambios a nivel morfológico, así como en la capacidad motora y reproductiva del nematodo.

La morfología del nemátodo es una de las características que cambian al someter al gusano a glucosa y al tratarlo con el extracto. Esto se pudo evidenciar en cada uno de los ensayos, ya que se observó un aumento en el grosor del cuerpo del nemátodo luego de ser sometido a la dieta rica en glucosa con respecto al grupo control (N2 sin glucosa). Luego de tratar el modelo diabetes inducido con las concentraciones del extracto, el nemátodo fue recuperando su grosor normal, infiriendo así una disminución en la acumulación de grasa. Se utilizó tinción con Negro Sudán B, el cual tiene afinidad por los lípidos, para facilitar la visualización de los acúmulos de grasa en el cuerpo de *C. elegans*, y tal como lo describen Kaveh et al, dichos acúmulos se observan de color azul rojizo a lo largo del cuerpo del nematodo⁴⁸. Gracias a esto, fue posible observar que en el modelo diabetes inducido, hay más acúmulos de grasa que en la cepa N2 sin glucosa. Así mismo, se observó una disminución en la acumulación de grasa al tratar el modelo diabetes inducido con las concentraciones del extracto, siendo la concentración de 1mg/ml la que presentó mayor efecto recuperador.

En la evaluación de la reproducción de la cepa control (N2 sin glucosa) se obtuvo un promedio de 232 larvas al finalizar el ciclo reproductivo del nemátodo, similar a lo descrito por Altun et al, quienes establecen que en una cepa N2 silvestre, sin ningún tipo de tratamiento, el hermafrodita adulto produce ovocitos durante aproximadamente cuatro días, después de este periodo fértil de 3-4 días, y el adulto maduro vive durante 10-15 días más. Un hermafrodita que se auto-fecunda puede producir cerca de 300 progenies en su ciclo reproductivo²³. Al someter la cepa control a las distintas concentraciones del extracto (0.01, 0.1 y 1 mg/ml), se evidenció que el extracto no ejerce ningún efecto negativo en la reproducción de *C. elegans*, ya que el número de progenies obtenidas con cada concentración es muy similar al del grupo control y a lo establecido por Altun et al.

Por otra parte, en el modelo de *C. elegans* N2 diabetes inducido la reproducción se afectó significativamente, ya que el promedio del número de progenies disminuyó a 174. Por esto, se corrobora que una alta concentración de glucosa tiene un efecto negativo sobre la reproducción del nematodo, tal como lo describen Gómez et al en su estudio¹⁵.

A lo largo de los años la ciencia ha buscado nuevas alternativas para el tratamiento de distintas enfermedades incluyendo la diabetes. Gracias a esto, ha sido posible llevar a cabo varios estudios en los cuales se comprueban los efectos protectores y recuperadores que tienen plantas como *Morinda citrifolia* (noni) sobre modelos con diabetes inducida. En el presente estudio fue posible observar el efecto recuperador que ejerce el extracto de noni sobre el modelo de *Caenorhabditis elegans* N2 diabetes inducido, lo cual se evidenció en la cantidad de larvas obtenida al final del ciclo reproductivo del modelo diabetes inducido tratado con las concentraciones del extracto de hojas de noni, siendo la concentración de 1 mg/ml la que logró recuperar casi en su totalidad la capacidad reproductiva del nematodo. Por esto, es posible inferir que el extracto de noni tiene la capacidad de contrarrestar los efectos negativos que ejerce la glucosa sobre el nemátodo, tal como lo describen Aline Carla Inada y colaboradores en uno de sus estudios, en donde establecen que el noni tiene efectos positivos en la función metabólica, incluyendo la regulación del peso corporal y depósitos de grasa, metabolismo de lípidos y glucosa, y efectos hepatoprotectores. Por otra parte, un claro ejemplo del efecto protector del noni es el expuesto por Nayak y colaboradores en su estudio realizado en ratas con diabetes inducida, en donde determinaron que dicha fruta tiene un efecto hepato protector en este modelo⁵⁴.

En los ensayos de motilidad fue posible determinar que la cepa N2 sin ningún tratamiento, tiene un promedio de un thrashing por segundo, tal como lo describen Brignull et al⁵⁵. Al momento de exponer la cepa N2 al extracto no se observó ningún cambio en la capacidad motora del nematodo, lo cual indica que el extracto no tiene efectos negativos sobre la motilidad de *C. elegans*. Sin embargo, al administrar altas concentraciones de glucosa a la cepa, se evidenció una disminución en el número de thrashings realizados por el nemátodo, demostrando una vez más el efecto negativo que tiene una dieta rica en glucosa sobre el gusano.

Luego de tratar el modelo diabetes inducido con cada una de las concentraciones del extracto hubo un cambio en el movimiento del nematodo, se registró un aumento en el número de thrashings realizados por el gusano. Este cambio se evidenció en mayor medida con la concentración de 1 mg/ml del extracto de hojas de noni. Por esta razón es posible inferir que efectivamente el extracto ejerce un efecto positivo sobre el modelo diabetes inducido al recuperar casi por completo su motilidad gracias a la disminución de los acúmulos de grasa.

Gracias a los resultados obtenidos, es posible inferir que el extracto de hojas de noni, es una buena alternativa para el tratamiento de los efectos provocados por ingesta de concentraciones altas de glucosa, disminuyendo así la probabilidad de sufrir de enfermedades como la diabetes y el hipogonadismo por síndrome metabólico. Esta última siendo producida por la sobreproducción de adipoquinas, tal como lo describen Pitteloud et al quienes establecen que en sujetos obesos se ha mostrado una relación inversa entre niveles de leptina y testosterona; por lo

tanto, la hiperleptinemia podría ser uno de los factores que favorecería el hipogonadismo en sujetos con resistencia a la insulina u obesidad⁵⁶.

Caenorhabditis elegans es un modelo que permite realizar estudios e investigaciones sin problema gracias a sus características. Esto favorece el entendimiento de enfermedades con gran importancia como la diabetes, parkinson, alzheimer, entre otras. En Colombia se ha documentado pocos estudios relacionados con este nematodo, lo que lo hace un modelo interesante para evaluar más a fondo diversas enfermedades. Se sugiere realizar estudios para establecer los componentes específicos de la fruta *Morinda citrifolia* que ejercen el efecto hipoglucemiante y las células diana sobre las que actúan en la recuperación del modelo se *C. elegans* N2 diabetes inducido.

7. Conclusiones

1. El extracto etanólico obtenido a partir de hojas de *M. citrifolia* (noni) no ejerce ningún efecto sobre la reproducción y motilidad de la cepa silvestre N2 (control), lo cual permite determinar que el extracto no es tóxico para *C. elegans*.
2. En el modelo diabetes inducido, tanto la capacidad reproductiva como la capacidad motora se afectan significativamente, presentando disminución en la ovoposición y el número de thrashings.
3. El tratamiento con las concentraciones de 0,01 y 0,1 mg/ml no produjo una recuperación significativa ni en la reproducción, ni en la motilidad del modelo diabetes inducido.
4. El modelo diabetes inducido posteriormente tratado con la concentración de 1 mg/ml del extracto, presentó una recuperación casi total en la producción de larvas, así como en el número de thrashings realizados por el nemátodo.
5. Se determinó que el extracto etanólico obtenido a partir de hojas de *M. citrifolia* (noni), es una buena alternativa para contrarrestar los efectos que tiene la glucosa sobre la reproducción y motilidad del modelo *C. elegans* N2 diabetes inducido.
6. Se recomienda realizar estudios que permitan determinar el(los) componente(s) específico(s) que contrarrestan los efectos negativos de una dieta rica en glucosa sobre la reproducción y motilidad del nemátodo.

8. Referencias bibliográficas

1. Cruz Pérez Carlos, Jiménez Rodríguez Covadonga. Propuesta de menú para diabéticos en los restaurantes Mariscos Boca del Río en la ciudad de Orizaba, Veracruz. [Internet]. 2006 [citado 24 mar 2017]. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lhr/cruz_p_ca/
2. Sánchez Rivero Germán. Historia de la diabetes. Gac Med Bol [Internet]. 2007 [citado 24 mar 2017]; 30 (2): 74-78. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1012-29662007000200016&lng=es
3. Dávila Cervantes Claudio, Agudelo Botero Marcela, Gloria Hernández Laura. Diabetes en México y Colombia: Análisis de la tendencia de años de vida perdidos, 1998-2007. Rev Sal Pub [Internet]. 2011 [citado 24 mar. 2017]; V13, n.4, P. 560-571. ISSN 2539-3596. Disponible en: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/revsaludpublica/article/view/18928/37998>
4. Gimeno AL, Franchi AM, González ET. Progesterone in vitro and the output of prostaglandin F from the uterus of ovariectomized rats. Priming or withdrawal? Prostaglandins Leukot Med. [Internet] 1984 may. [citado 24 mar. 2017]; 14(2):289-96. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6588394>
5. Sánchez Gila M. Prostaglandinas y función reproductiva [Internet]. Hospital Universitario Virgen de las Nieves Granada; 2008 [citado 24 mar. 2017]. 15 p. Disponible en: http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/cr08.pg_fn_reproductiva.pdf
6. González E. Diabetes Mellitus experimental: etiología de las malformaciones congénitas en descendientes de ratas diabéticas. Rev Cubana Endocrinol. v.13 n. 1 [Internet]. 2002 ene.-abr. [citado 24 mar. 2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532002000100007
7. Cornejo Ferradas M, Asmad Abanto A, Ruíz Reyes S. Efecto analgésico postexodoncia simple del extracto de *Morinda Citrifolia* (noni): Ensayo clínico aleatorizado de grupos en paralelo. Int. J. Odontostomat. [Internet] 2014 dic. [citado 24 mar. 2017]; 8(3): 433-438. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2014000300018

8. Mc Clatchey W. From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). Integrative Cancer Therapies Vol. 1 [Internet] 2002 jun. [citado 24 mar. 2017]; 2: pp. 110-120. Disponible en: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1534735402001002002>
9. Torres A.; Toranzo Reyes A. Antecedentes y estado actual de investigaciones sobre la utilidad médica de la *Morinda Citrifolia* (Noni tahitiano) [Trabajo de revisión en Internet]. Holguín, Cuba: Universidad Médica Mariana Grajales Coello; 2009 [citada 24 mar. 2017]. 17p. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no134/pdf/no134rev1.pdf>
10. Meganoni [Internet]. Noni y el cáncer: [citado 24 mar. 2017]. [1 pantalla]. Disponible en: <http://www.meganoni.net/cancer/>
11. Polterat O, Hamburger M. *Morinda citrifolia* (Noni) fruit--phytochemistry, pharmacology, safety. Planta Med. [Internet]. 2007 feb. [citado 24 mar. 2017]. 73(3):191-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17286240>
12. Nayak BS, Isitor GS, Maxwell A, et. al. Wound-healing activity of *Morinda citrifolia* fruit juice on diabetes-induced rats. J Wound Care [Internet]. 2007 feb. [citado 24 mar. 2017]. 16(2):83-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319624>
13. American Chemycal Society [Internet]. 2000. Noni Plant May Yield New Drugs To Fight Tuberculosis; [citado 24 mar. 2017]. [1 pantalla]. Disponible en: <https://www.sciencedaily.com/releases/2000/12/001219074537.htm>
14. Schlotterer A, Kukudov G, Bozorgmehr F, et. al. *C. elegans* as model for the study of high glucose- mediated life span reduction. Diabetes [Internet]. 2009 nov. [citado 24 mar. 2017]. 58(11):2450-6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19675139>
15. Gómez Gómez A.; Osorio Oviedo J. Efecto del extracto de hojas de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) sobre cepas de *Caenorhabditis elegans* sometidas a altas concentraciones de glucosa. [Trabajo de grado]. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2015 [citada 01 abr. 2017]. 78p.

16. Strome S. *Caenorhabditis elegans*, the worm. [Internet]. Strome lab. [Citado 01abr. 2017]
17. Saavedra Ezequiel Alvarez. Premio Nobel de Medicina 2002: Brenner, Horvitz, Sulston y el gusano *Caenorhabditis elegans*. Medicina (B. Aires) [Internet]. 2003 abr. [citado 01 abr. 2017]; 63(2): 179-182. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802003000200015&lng=es
18. Petrushin A, Ferrara L, Blau A. The Si *elegans* project at the interface of experimental and computational *Caenorhabditis elegans* neurobiology and behavior. J. Neural Eng. [Internet] 2016. [citado 01 abr. 2017]. 13: 065001 (8pp). Disponible en: <http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1741-2560/13/6/065001/pdf>
19. NCBI Taxonomy browser. *Caenorhabditis elegans*. [Internet] [consultado 03 abr. 2017]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6239>
20. Boxem M. Review Open Access cyclin-dependent kinases in *C. elegans*. BioMed Central. [Internet] 2006 [citado 06 abr. 2017]. Disponible en: <https://celldiv.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1747-1028-1-6?site=celldiv.biomedcentral.com>
21. Corsi A, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. Worm Book. [Internet] [citado 06 abr. 2017]. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html
22. Daehan Lee, Harksun Lee, Nari Kim, DaisyS. Lim, Junho Lee. Regulation of a hitchhiking behavior by neuronal insulin and TGF- β signaling in the nematode *Caenorhabditis elegans*. BBRC [Internet] 2017 [citado 06 abr. 2017]; Vol. 484. Pages 323-330. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17301730>
23. Altun, Z. F. y Hall. WORMATLAS. Introduction to *C. elegans* anatomy. [Internet] [citado 06 abr. 2017]. Disponible en: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>
24. Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov. [Internet] 2006 [citado 06 abr. 2017]; 5(5):387-98. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672925>

25. Quintin S, Gally C, Labouesse M. Noncentrosomal microtubules in *C. elegans* epithelia. *Genesis* [Internet] 2016 [citado 06 abr. 2017]. Volume 54; Pages 229–242. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvg.22921/full>
26. Surco Laos F. Evaluación de la actividad de flavonoides y sus metabolitos en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Universidad de Salamanca. [Trabajo de grado en internet] 2011 [citado 08 abr. 2017]. Pags. 198. Disponible en: https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/110630/1/DQANB_Surcos_Laos_F_EvaluacionDeLaActividad.pdf
27. White J, Southgate E, Thomson J, Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Royal Society Publishing [Internet] [citado 14 abr. 2017]. Vol. 314, No. 1165 (Nov. 12, 1986), pp. 1-340. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.715.1812&rep=rep1&type=pdf>
28. Oliver H. Development of Left/Right Asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* Nervous System: From Zygote to Postmitotic Neuron. *Genesis* [Internet] 2014 [citado 14 abr. 2107]. Vol 52: Pags.528–543. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvg.22747/epdf>
29. Meera V, Matthew B. The *Caenorhabditis elegans* Excretory System: A Model for Tubulogenesis, Cell Fate Specification, and Plasticity. *Genetics Wormbook* [Internet] 2016 [citado 14 abr 2017]. Vol. 203, 35–63. Disponible en: <http://www.genetics.org/content/genetics/203/1/35.full.pdf>
30. Stacie E, Kimberley E, Chengjie X, Kerry K. Genetic and Pharmacological Factors That Influence Reproductive Aging in Nematodes. *Plos Genetics* [Internet] 2007 [citado 14 abr. 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797816/pdf/pgen.0030025.pdf>
31. Lints R, Hall DH. Reproductive system, egg laying apparatus. *WormAtlas*. [Internet] 2013 [citado 14 abr. 2017] Disponible en: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/egglaying%20apparatus/Eggframe set.html>
32. Judith K, David H. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Wormatlas*. [Internet] 1979 [citado 14 abr. 2017]. Disponible en:

http://www.wormatlas.org/ver1/Postemblingonad_1979/toc.html

33. Adam A, Carolyn R, Edward M, Gian G. Cell and growth cone migrations. *C. elegans* II edition. [Internet] 1997 [citado 14 abr 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20070/>
34. Sulston J, Albertson D, Thomson J. The *Caenorhabditis elegans* Male: Postembryonic Development of Nongonadal Structures. Wormatlas. [Internet] 1980 [citado 14 abr 2017]. Disponible en: http://www.wormatlas.org/SulstonpostembMale_1980/SulstonpostembMale1980.html
35. John S. The nematode *Caenorhabditis elegans*: Cell lineage. [Internet] [citado 14 abr. 2017]. Pags 123-155. Disponible en: <http://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/5020>
36. Donald R, Thomas B, Barbara M, James P. Morphogenesis. *C. elegans* II edition. [Internet] 1997 [citado 14 abr. 2017]. Vol 33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20050/>
37. Can N, David H, Ying Y, David F. Morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* male tail tip. *Developmental biology*. [Internet] 1999 [citado 14 abr. 2017]. Vol 207. Pags 86-106. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160698991734>
38. Scott E, Paul W. Male Development and Mating Behavior. *C. elegans* II edition. [Internet] 1997 [citado 14 abr. 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20073/#A395>
39. Byerly L, Cassada C, Russel L. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* [Internet] 1976 [citado 14 abr. 2017]. Vol 51. Pags 23-33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160676901196?via%3Dihub>
40. Jonathan H. sexual dimorphism and sex determination. The nematode *Caenorhabditis elegans* [Internet]. [citado 28 abr. 2017]. Pags 243-279. Disponible en: <http://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/5024>
41. John W. The anatomy. The nematode *Caenorhabditis elegans* [Internet]. [citado 28 abr. 2017]. Pags 81-122. Disponible en: <http://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/5019>

42. David G. control of oocyte meiotic maturation and fertilization. Wormbook [Internet] [citado 28 abr. 2017]. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_controloocytematuration/controloocytematuration.html
43. Carlos G. La insulina y su señalización: mecanismos de transducción de la señal y efectos metabólicos. [Internet] 2012 [citado 28 abr. 2017]. Disponible en: <https://dereflexion.wordpress.com/2012/12/07/la-insulina-y-su-senalizacion-mecanismos-de-transduccion-de-la-senal-y-efectos-metabolicos/>
44. Laura J, Juan C, Pamela G, Karen V, Giovanni G. *Morinda citrifolia* (Noni) y sus posibles efectos como planta medicinal. Tecnología en marcha [Internet] 2004 [citado 24 mar. 2017]. Vol. 17 N° 1. Disponible en: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1431
45. Herbal and alternative remedies. The natural way to help maintain universal stewardship. [Internet] 2014 [citado 24 mar. 2017]. Disponible en: https://www.zamboanga.com/z/index.php?title=File:Bankoro_noni.jpg
46. Esteban A. Estudio de factibilidad de la producción, agroindustrialización y comercialización del noni (*morinda citrifolia* L.) En la comunidad de Luisiana, distrito el Cairo, canton de siquirres. [Internet] [citado 24 mar. 2017]. Disponible en: https://hortintl.cals.ncsu.edu/sites/default/files/articles/Noni_tesis_E_Arboleda.pdf
47. Osmar Q, Renato C, Guillermo P. Uso de extractos acuosos y etanólicos de plantas para el control de *Meloidogyne Enterolobii* (nematoda: tylenchida). ResearchGate. Universidad Central de Venezuela. [citado 28 abr 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/267408350_USO_DE_EXTRACTOS_ACUOSOS_Y_ETANOLICOS_DE_PLANTAS_PARA_EL_CONTROL_DE_MELOIDOGYNE_ENTEROLOBII_NEMATODA_TYLENCHIDA
48. Kaveh A. Obesity and the regulation of fat metabolism. Wormbook [Internet]. [citado 28 abr. 2017]. Disponible en: http://www.wormbook.org/chapters/www_obesity/obesity.html
49. Lizarzaburu Robles Juan Carlos. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. An. Fac. med. [Internet]. 2013 Oct [citado 12 ene 2018] 74(4)315-320. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009&lng=es.

50. Araya Verónica. Síndrome metabólico y su relación con hipogonadismo tardío. *Rev. Med. Clin. Condes*. [Internet] 2014 [Citado 12 ene 2018]. Disponible en:
https://www.clinicalascondes.cl/Dev_CLC/media/Imagenes/PDF%20revista%20m%C3%A9dica/2014/1%20Enero/9-Dra.Araya.pdf
51. Gami, Minaxi S, and Catherine A Wolkow. “Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin Signaling Reveal Targets for Pharmacological Manipulation of Lifespan.” *Aging Cell* 5.1 [Internet] 31–37. [Citado 12 ene 2018]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413578/>
52. Hashmi S, Wang Y, Parhar RS, Collison KS, Conca W, Al-Mohanna F, et al. *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutr Metab*[Lond] [Internet] 2013 [citado 28 ene 2018]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4371853/>
53. Jun Zhang, Razan Bakheet, Ranjit S. Parhar, et al. Regulation of Fat Storage and Reproduction by Krüppel-Like Transcription Factor KLF3 and Fat-Associated Genes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology*. [Internet] 2011 [citado 28 ene 2018]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4371853/>
54. Inada, A. C., Figueiredo, P. S., dos Santos-Eichler, R. A., Freitas, K. de C., Hiane, P. A., de Castro, A. P., & Guimarães, R. de C. A. (2017). *Morinda citrifolia* Linn. (Noni) and Its Potential in Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Nutrients*, 9(6), 540. Disponible en:
<http://doi.org/10.3390/nu9060540>
55. B. Shivananda Nayak, Julien R. Marshall, Godwin Isitor, and Andrew Adogwa. Hypoglycemic and Hepatoprotective Activity of Fermented Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) in Diabetic Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. [Internet] vol. 2011. [citado 28 ene 2018]. Disponible en:
<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/875293/cta/>
56. Heather R. Brignull, Finola E. Moore, Stephanie J. Tang, and Richard I. Morimoto. Polyglutamine Proteins at the Pathogenic Threshold Display Neuron-Specific Aggregation in a Pan-Neuronal *Caenorhabditis elegans*

Model. The journal of neuroscience. [Internet] [Citado 12 ene. 2018].

Disponibile en:

<https://pdfs.semanticscholar.org/820e/b3c124a39fe35568827a35d344dff6dd69f.pdf>

57. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, Hayes FJ. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. J Clin Endocrinol Metab. [Internet] [Citado 12 ene. 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15713702>

Anexo 1

Promedio de larvas L1 y L2 en ensayo de reproducción realizado a cepa N2 sin extracto, y su comportamiento en las diferentes concentraciones del extracto. Ensayo realizado por triplicado.

Número de larvas L1 y L2				
	N2	0,01 mg/ml	0,1 mg/ml	1mg/ml
Ensayo 1	236	221	219	229
Ensayo 2	228	217	223	234
Ensayo 3	232	230	227	225
Promedio	232	222	223	229
DE	3,265986324	5,446711546	3,265986324	3,685557398

Anexo 2

Promedio de larvas L1 y L2 en ensayo de reproducción realizado a cepa N2 con glucosa sin extracto, y su comportamiento con el tratamiento con las diferentes concentraciones del extracto. Ensayo realizado por triplicado.

Número de larvas L1 y L2				
	N2 glucosa	0,01 mg/ml	0,1 mg/ml	1mg/ml
Ensayo 1	178	199	218	226
Ensayo 2	163	180	203	214
Ensayo 3	182	203	207	221
Promedio	174	194	209	220
DE	8,180260795	10,03327796	6,34428877	4,924428901

