



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

**TRABAJO DE GRADO PARA OBTENER TITULO DE
BACTERIOLOGO Y LABORATORISTA CLINICO**

PRESENTADO POR
CAMILA ANDREA CORTÉS DÍAZ
ALBA JUDITH ESPITIA MARTÍNEZ

ASESORAS
RUTH MELIDA SANCHEZ MORA
MARTHA GOMEZ JIMENEZ

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

Contenido

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados

Conclusiones

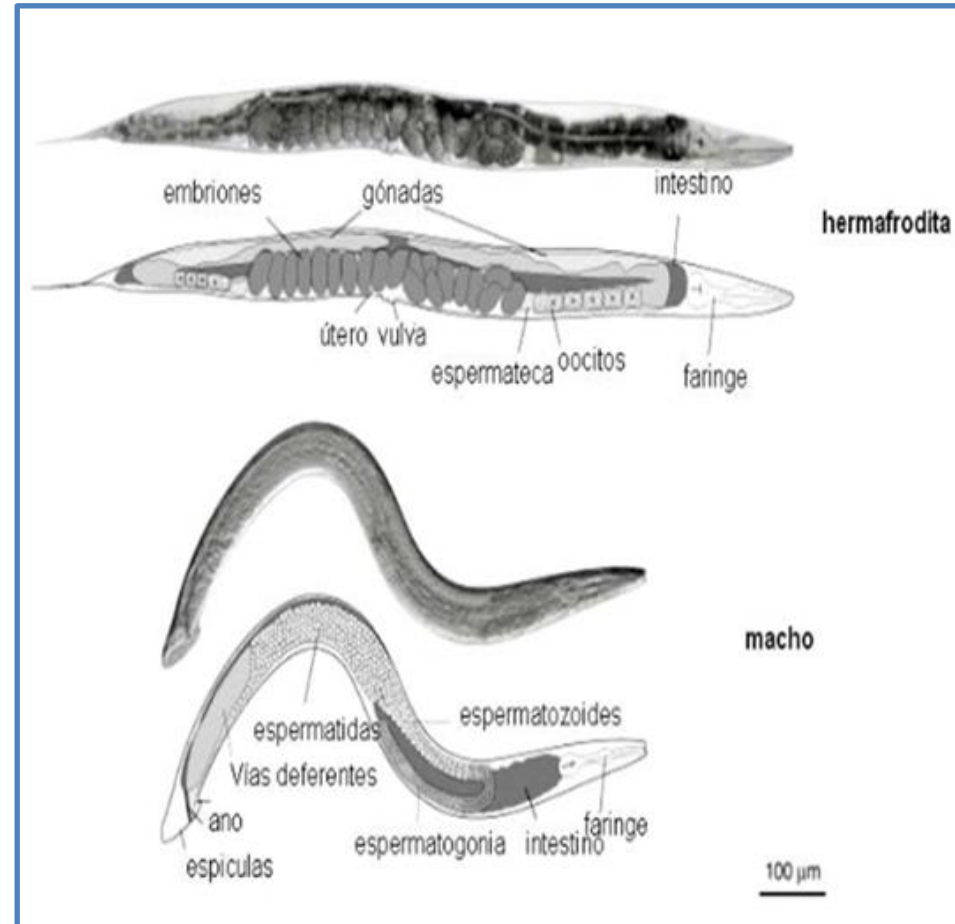
Agradecimientos

Caenorhabditis elegans

Características generales

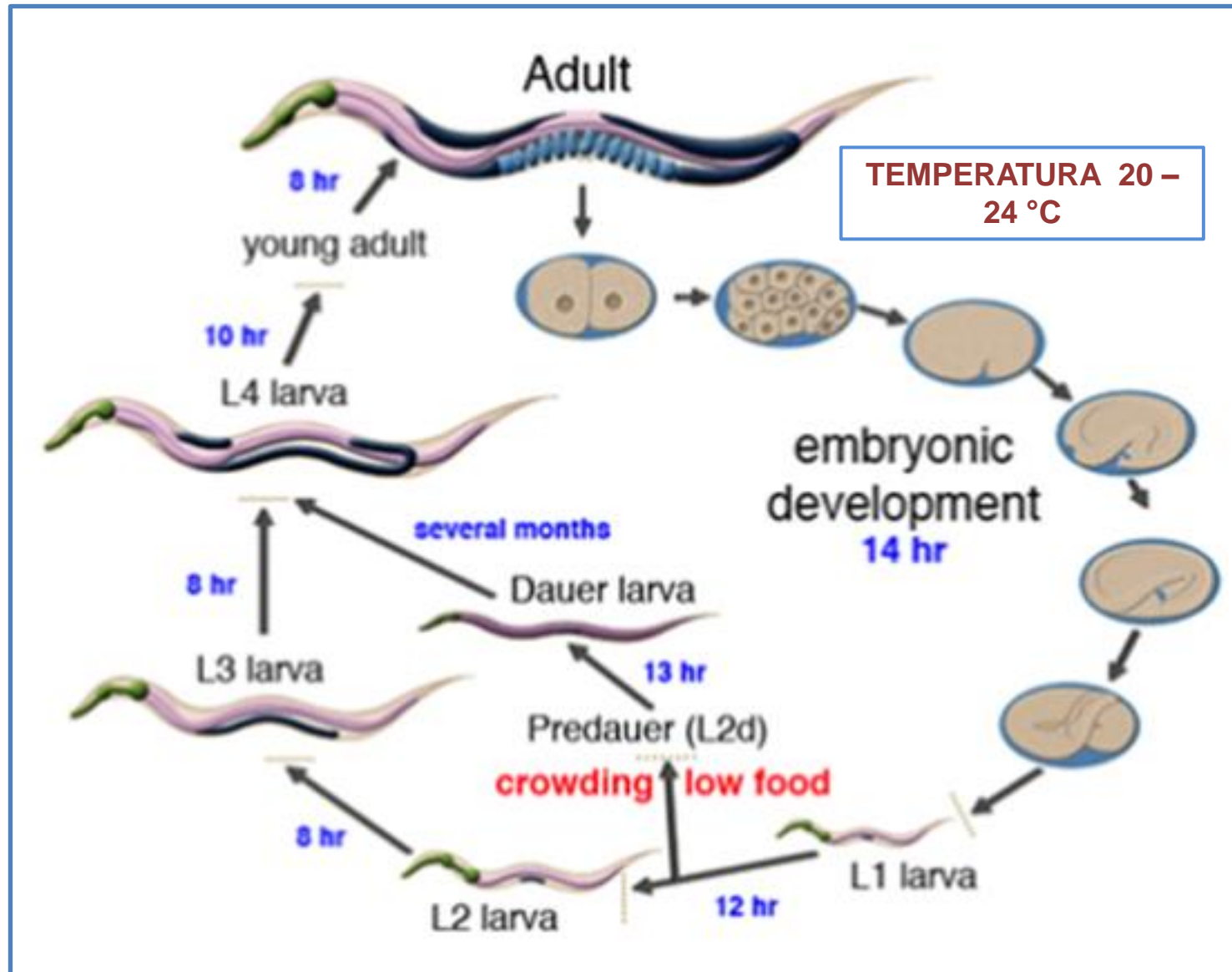
Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Rhabditida
Familia	Rhabditidae
Genero	<i>Caenorhabditis</i>
Especie	<i>elegans</i>

Nematodo redondo
Transparente
Longitud de 1mm
Modelo de investigación
Completa anatomía.



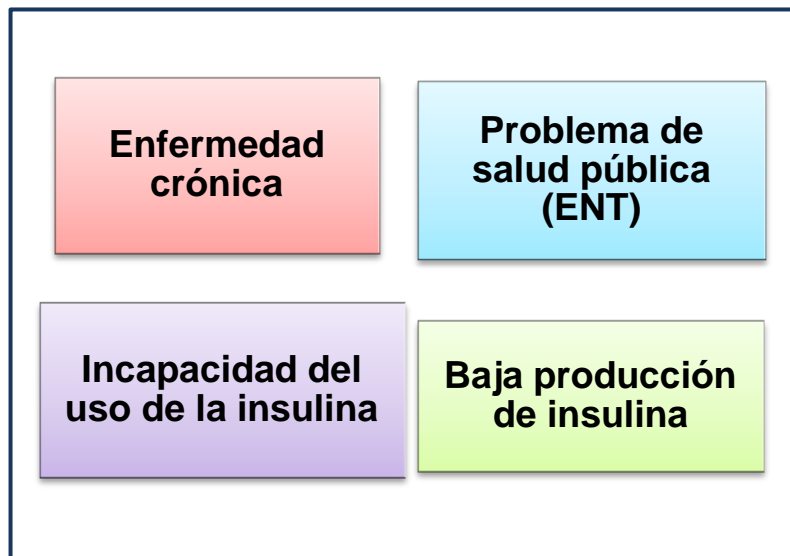
Caenorhabditis elegans

Ciclo de vida

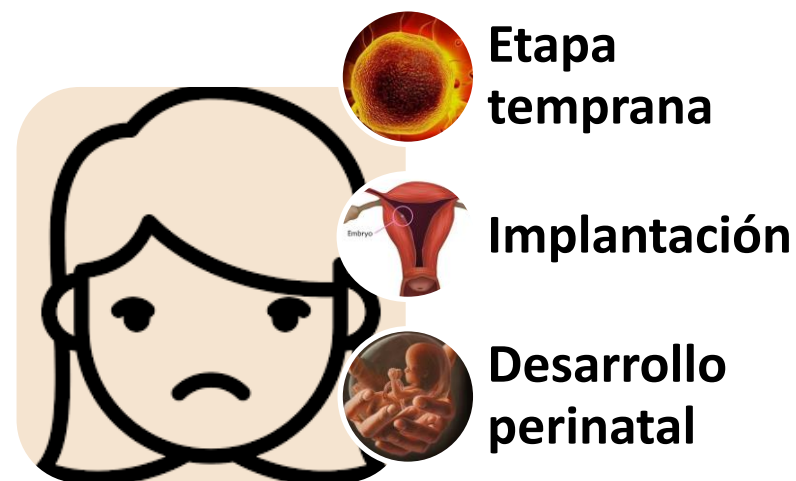
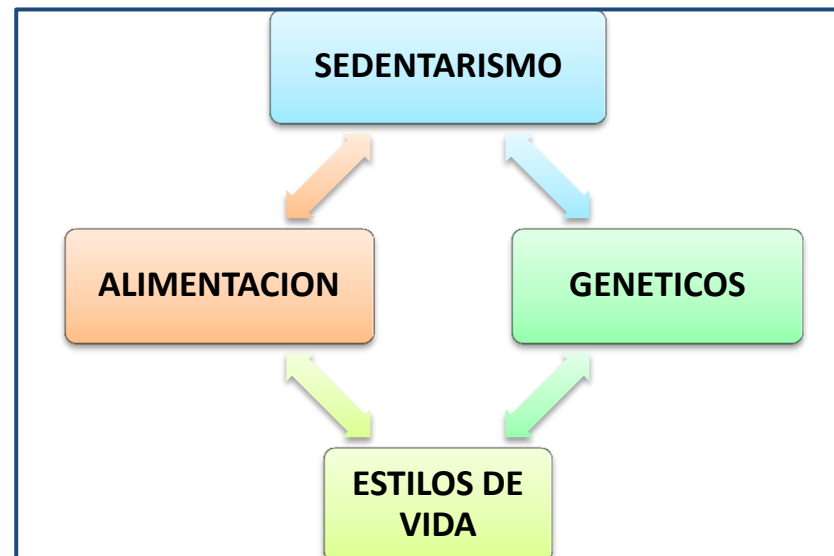


Diabetes mellitus

GENERALIDADES



FACTORES DE RIESGO



Morinda citrifolia



Características

- Arbusto de 6 mts altura
- Climas húmedos y templados.
- Antiinflamatorio, analgésico y adelgazante.

Beneficios

- Esteban Arboleda: Xeronina.
- Laura Arguedas: escopoletina, Damnacanthal y Norepinefrina.

REINO	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Gentianales
Familia	Rubiaceae
Subfamilia	Rubioideae
Tribu	Morindeae
Genero	<i>Morinda</i>
Especie	<i>citrifolia</i>

Antecedentes

Elida González

- 2002
- Afecciones que presentan las mujeres que padecen diabetes mellitus

S. Nayak

- 2011
- La *Morinda citrifolia* (noni) ejerce un efecto hepatoprotector en ratas diabéticas

Verónica Araya

- 2014
- Relación bidireccional entre hipogonadismo y diabetes

Gómez et al

- 2015
- Altas concentraciones de glucosa tienen efectos deletéreos sobre la reproducción de *C. elegans* N2

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

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

Diseño metodológico

Investigación de tipo descriptivo experimental

Hipótesis: El extracto de noni favorece la reproducción y motilidad de *Caenorhabditis elegans* N2 modelo diabetes inducido

Población:
Nemátodo
Caenorhabditis elegans

Variable independiente:
Extracto de noni
(0.01/0.1/1 mg/ml)

Variable dependiente:
Reproducción y motilidad de *C. elegans*

Muestra: Cepa N2

Mantenimiento de la cepa

Preparación del medio NGM (Brenner).

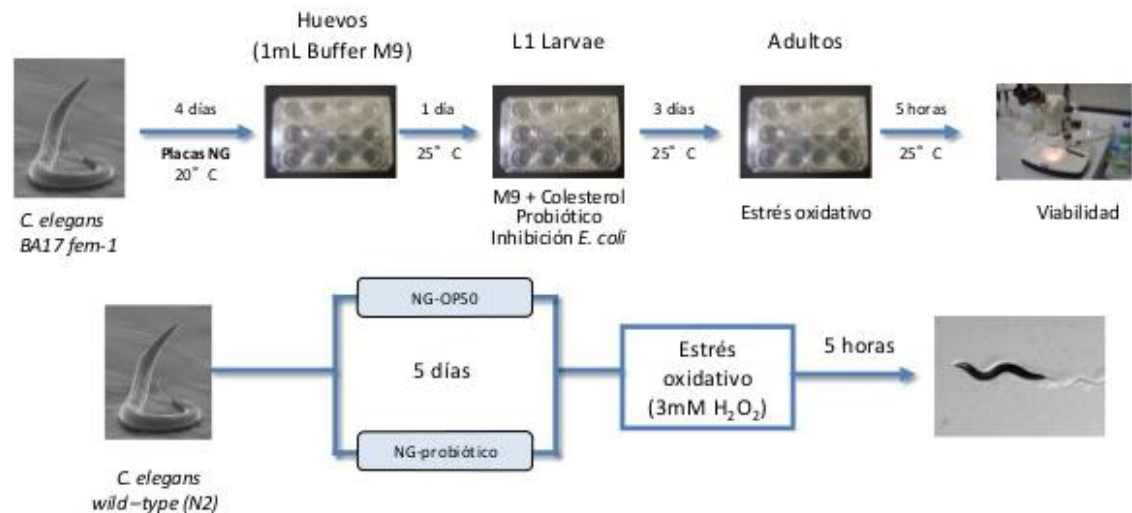


- Cloruro de sodio
- Agar
- Peptona
- Agua destilada

- Cloruro de calcio
- Colesterol
- Sulfato de magnesio
- Buffer fosfato

E. coli OP50

Sincronización



Modelo *C. elegans* N2 diabetes inducido

Schlotterer

NGM agregando 7,2 g de glucosa

Se sincronizó la cepa N2 y los huevos se dejaron en el medio con glucosa

Se permitió el desarrollo del gusano y se evaluó el modelo



Lavado de los nematodos con PBS, se dejó en hielo por 10' y se agregó formaldehído.

Se colocó en hielo y en baño serológico 3 veces por 10' cada uno y se lavó con PBS

Se deshidrataron con etanol al 70% dejando los gusanos por 2'

Se lavó con etanol al 70% y se realizó montaje en lámina

Se descartó el Negro Sudán del sobrenadante dejando 100 UL de la mezcla con gusanos

Se transfirió 300 UL de gusanos a tubo nuevo, se agregó Negro Sudán B

Tratamiento con extracto

Preparación del extracto



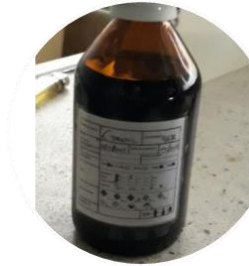
462 mg



4 ml



115,5 mg/ml



$V1 \times C1 = V2 \times C2$

E. Coli OP50

Celegans N2

Reproducción

Transferencia de larvas L4 individualmente, a diario hasta que terminó el ciclo reproductivo

Las cajas con huevos se dejaron en incubación durante 36 horas

El total de progenies se obtuvo realizando conteo de larvas L1 y L2 en cada una de las cajas

Motilidad

1 gota de Buffer M9 en lámina porta objetos

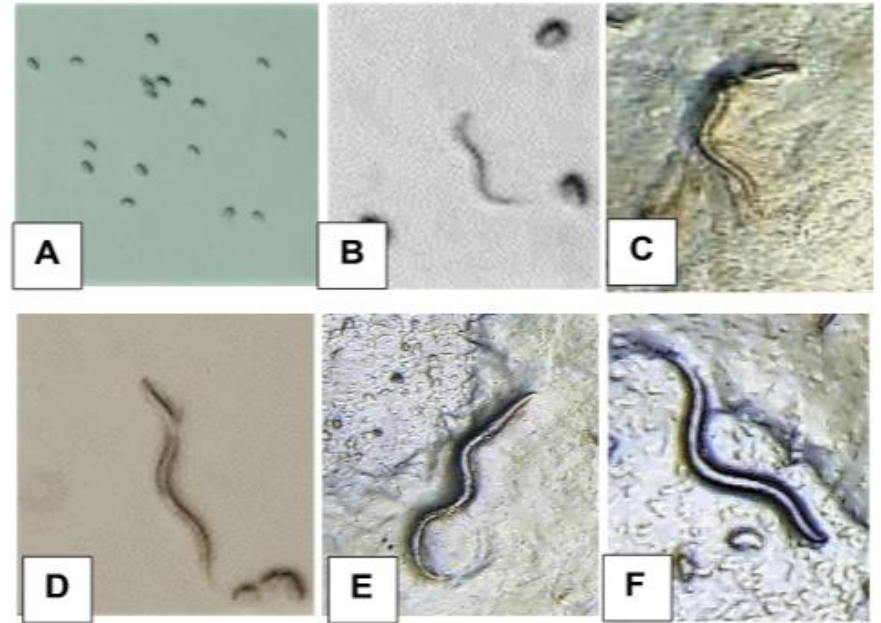
Transferencia de gusanos individualmente

Movimiento libre por un minuto y conteo de ondulaciones por 30 seg.

GraphPad Prism (One-way ANOVA)

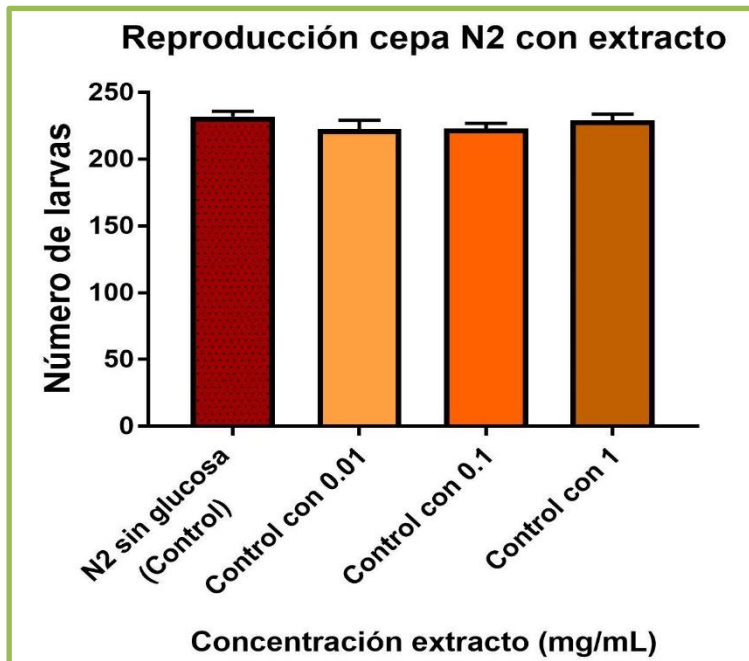
Efecto de la *Morinda citrifolia* en *C. elegans* N2

Características fenotípicas



No se observan diferencias en las características fenotípicas del nematodo expuesto a las concentraciones del extracto

Efecto de la *Morinda citrifolia* en *C. elegans* N2



El promedio de progenies de la cepa N2 es de 232 larvas. Según Altun et al, en promedio un hermafrodita produce 300 progenies.

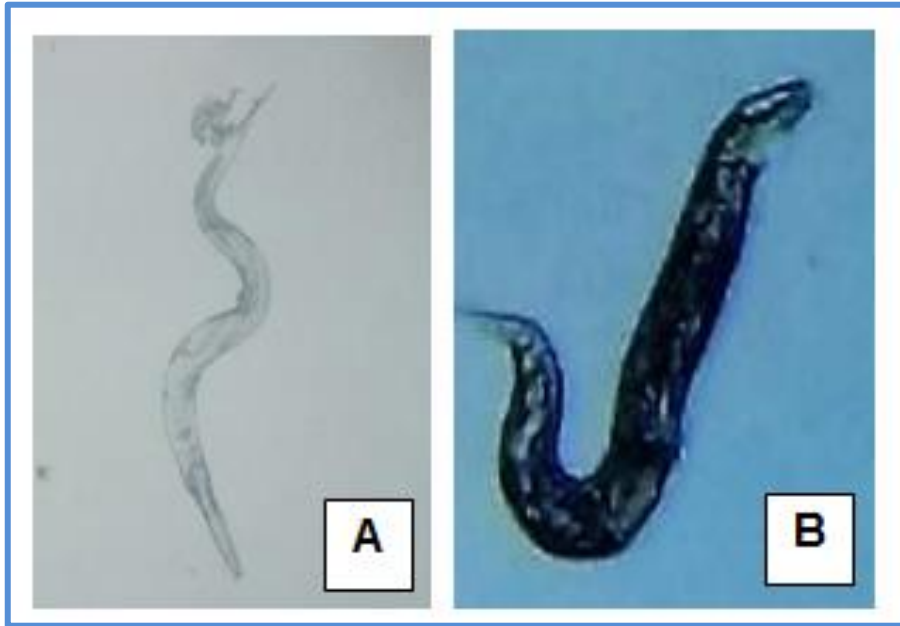
No se observa diferencia estadísticamente significativa

Brignull et al, en promedio *C. elegans* N2 sin ningún tipo de tratamiento realiza una ondulación por segundo

Motilidad cepa N2 con extracto de noni

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Ondulaciones por 30 segundos	N2 glucosa sin	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

Modelo de *C. elegans* N2 diabetes inducida



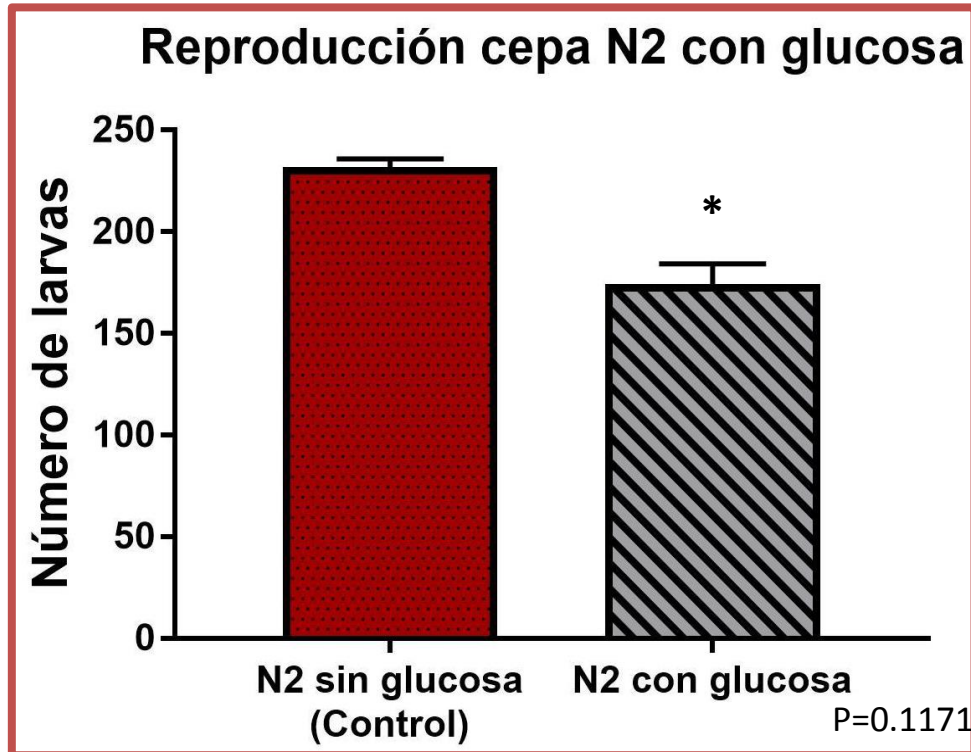
Morfología *C. elegans*. A) Cepa N2 sin glucosa y B) con glucosa visto en microscopio objetivo 40X.

Schlotterer, los depósitos de grasa, se logran ver gracias a la afinidad que tiene el Negro Sudán B por las grasas



Acúmulos de grasa en *C. elegans*. A) Nematodo adulto N2 sin glucosa. B) Nematodo adulto N2 con glucosa. microscopio objetivo 40X.

Modelo de *C. elegans* N2 diabetes inducida



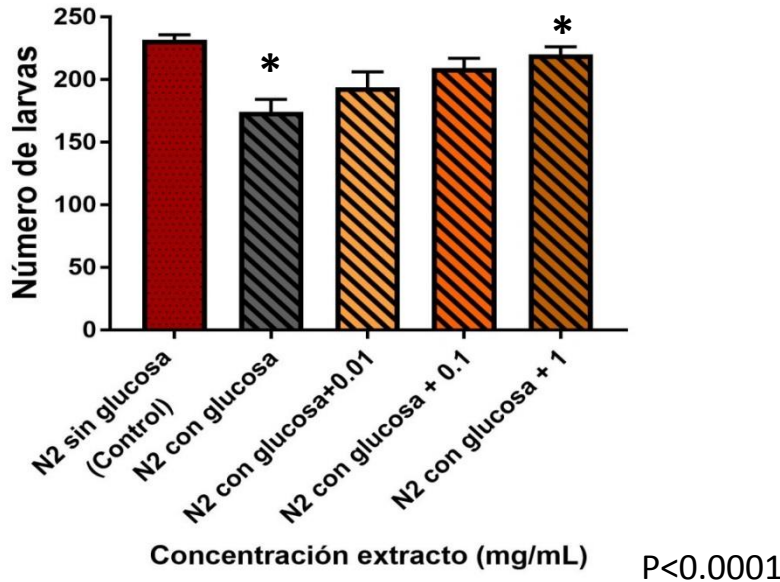
El promedio de progenies de la cepa N2 expuesta a glucosa es de 174 larvas. Gómez et al, una dieta rica en glucosa disminuye la motilidad de *C. elegans* N2

Motilidad cepa N2 con dieta rica en glucosa

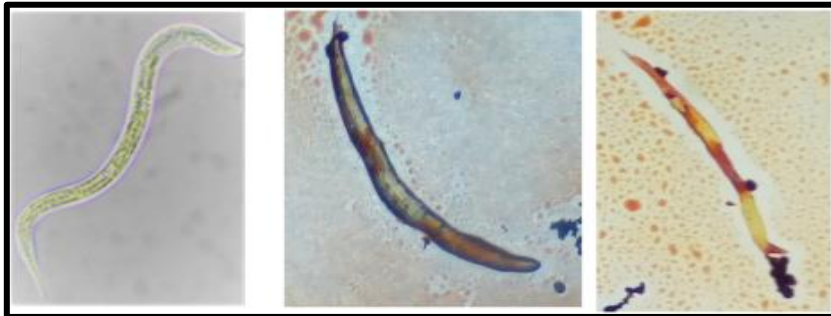
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Ondulaciones por 30 segundos	N2 glucosa sin	29	31	30	30
	N2 glucosa con	18	21	16	18,33

Efecto del extracto sobre el modelo diabetes inducido

Reproducción N2 diabetes inducido con extracto



Recuperación casi total de la reproducción del modelo diabetes inducido al tratarlo con extracto en concentración de 1 mg/ml

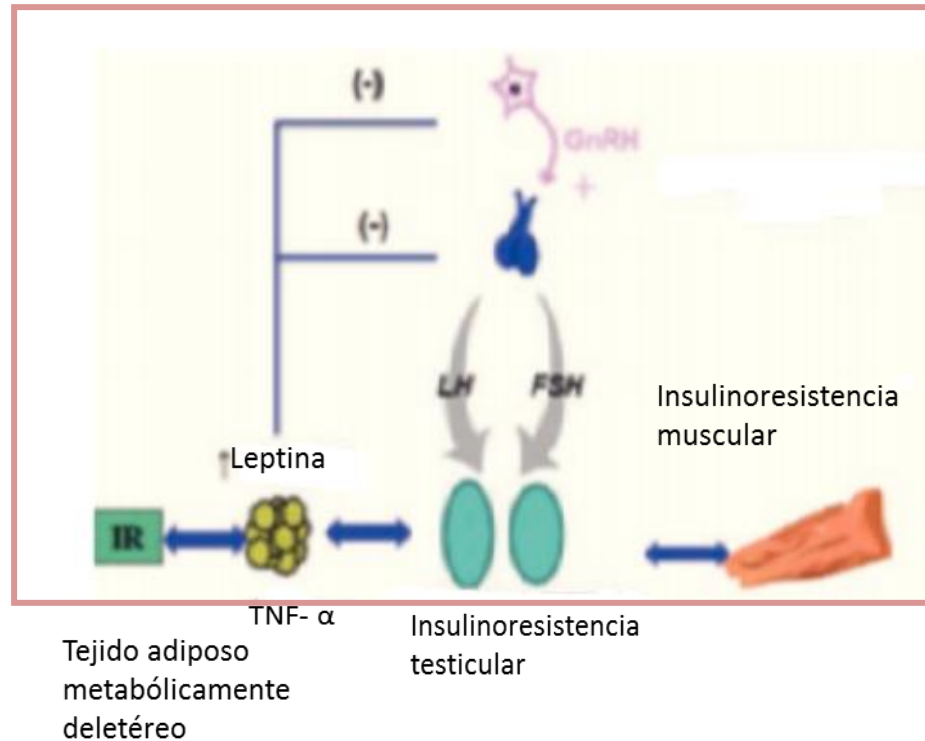


Aline Inada, el noni regula los depósitos de grasa

Motilidad cepa N2 glucosa tratada con extracto

		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio
# Ondulaciones 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

Insulino resistencia y eje hipotálamo-hipófisis-testículo

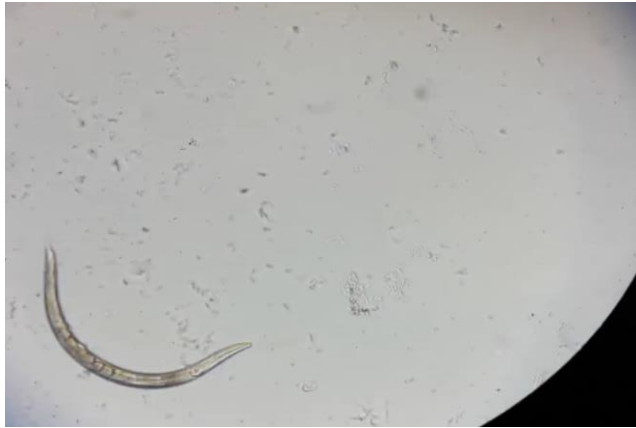


IR. Disminuye la respuesta testicular a LH y la secreción de testosterona (T)

La disminución de T favorece la IR muscular y los depósitos de grasa visceral

La GV secreta en exceso adipocinas como leptina y TNF que influyen negativamente sobre el eje determinando disminución de secreción de T.

Movimiento de *C. elegans* cepa N2



Movimiento de *C. elegans* cepa N2 sin glucosa (control)

Movimiento de *C. elegans* N2 expuesto a dieta rica en glucosa

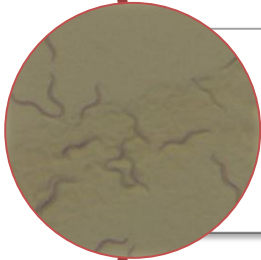


Movimiento de *C. elegans* cepa N2 tratado con extracto de noni (1 mg/ml)

Conclusiones



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.



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.



Se recomienda realizar estudios que permitan determinar el(los) componente(s) específico(s) de la *Morinda citrifolia* que contrarrestan los efectos negativos de una dieta rica en glucosa sobre la reproducción y motilidad del nemátodo.

Agradecimientos

*Agradecemos a nuestra familia, a la Universidad
Colegio Mayor de Cundinamarca , la Dra Ruth Mélida
Sánchez, Martha Gómez al semillero de investigación
Biotecnología y Genética*