



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFUSIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. EN
Caenorhabditis elegans ANTE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA (UV).**

DAHIANA BELÉN VELÁZQUEZ BARRERA

Foz do Iguaçu

2022

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFUSIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. EN
Caenorhabditis elegans ANTE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA (UV).**

DAHIANA BELÉN VELÁZQUEZ BARRERA

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de grado en Biotecnología.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Leticia Priscilla Arantes

Foz do Iguaçu

2022

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFUSIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L.
EN *Caenorhabditis elegans* ANTE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA
(UV).**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial para la obtención del título de grado en Biotecnología

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dr^a. Leticia Priscilla Arantes
UNILA

Prof^a Dr^a Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri
UNILA

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA

Foz do Iguaçu, 1 de agosto de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Dahiana Belén Velázquez Barrera

Curso: Biotecnología

	Tipo de Documento
(X) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFUSIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. EN *Caenorhabditis elegans* ANTE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA (UV).**

Nome do orientador(a): Leticia Priscilla Arantes

Data da Defesa: 01 / 08 / 2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 1 de Agosto de 2022.

Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a mis padres,
a mis abuelos, a mi hermana y a
Federico por haber creído
siempre en mi capacidad.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por no soltarme nunca de la mano, pues a pesar de no ser merecedora, Él siempre me ha brindado muchas bendiciones durante todo este tiempo.

A mis padres Heriberto Velázquez y Norma Barrera por ser el pilar más importante en mi vida, por su apoyo incondicional, por el amor y la confianza que siempre depositaron en mí.

A mi hermana Lilian Velázquez y mi cuñado Hernán Verza por el apoyo y las risas que hemos compartido.

A mis abuelos Gabriela Cabañas, Iluminada López, Gerardo Velázquez y Sergia Olmedo por su apoyo y cariño.

A Federico Acosta por su apoyo incondicional, por su compañía en las largas noches de estudio y trabajo, por su amor, paciencia y por brindarme un hombro sobre el que llorar cuando las cosas van mal.

A mi orientadora Leticia Arantes por su paciencia, por la dedicación y el amor por la profesión con la que me ha guiado en este trabajo, por la oportunidad de permitirme trabajar con ella a pesar de la inexperiencia en el área, transmitirme su conocimiento y por ser una persona que me inspira con su carrera y trabajo.

A Analía Martínez y Leticia Alcaraz por ser mis compañeras de lucha a lo largo de los años de carrera, por ayudarme a crecer y mejorar como persona y por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A la banca por aceptar ser parte de este momento.

Al Parque Tecnológico Itaipú Paraguay por haberme brindado la oportunidad de acceder a un subsidio y aliviar la carga económica que involucra estudiar en la UNILA.

A los compañeros de curso que en algún momento me brindaron su ayuda sin esperar nada a cambio y compartieron su amor por la Biotecnología, convenciéndome de haber tomado la decisión correcta.

*Cuida tus pensamientos, porque se
convertirán en tus palabras. Cuida tus
palabras, porque se convertirán en tus actos.
Cuida tus actos, porque convertirán en tus
hábitos. Cuida tus hábitos, porque se
convertirán en tu destino*

Mahatma Gandhi

VELÁZQUEZ BARRERA, Dahiana Belén. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFUSÃO DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE *Caenorhabditis elegans* FRENTE À EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA (UV).** 2022. 47. **Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia.** Trabajo de Conclusión de Curso Biotecnología – Universidad Federal de la Integración de Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMO

A camada de ozônio está se deteriorando em 0,5% ao ano, deixando animais, humanos e ecossistemas expostos e vulneráveis à radiação ultravioleta (UV) do Sol. O rápido esgotamento do ozônio se deve, em parte, às atividades antrópicas, que levam a uma aceleração da deterioração da camada protetora. A radiação ultravioleta causa sérias alterações em humanos, por exemplo, mutações genéticas, câncer de pele e estresse oxidativo. Também afeta os ecossistemas, impactando o equilíbrio competitivo das plantas e afetando os ciclos biogeoquímicos, por isso, diversos estudos vem sendo realizados com o intuito de minimizar esses efeitos. A planta *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.) é de extrema importância e vem sendo utilizada desde a antiguidade na medicina popular, isso porque possui compostos biologicamente ativos, como carnosol, ácido rosmarínico e óleos essenciais. O nematóide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um pequeno verme que é utilizado para diversos estudos toxicológicos, farmacológicos, biológicos e genéticos, seu uso se deve à série de vantagens que proporciona ao pesquisador, sendo elas um ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção e 60-80% de homologia de genes com mamíferos. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da infusão das folhas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre o nematoide *C. elegans* submetido à exposição à luz ultravioleta, onde os nematoides são expostas à luz UV por 15 minutos e tratados com uma infusão preparada a partir de folhas de *R. officinalis* L. antes ou depois da exposição à luz UV. A taxa de sobrevivência obtida foi de 27% nos vermes expostos à luz UV e não tratados com a infusão, enquanto os vermes pré-tratados com 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL da infusão e posterior exposição à luz UV tiveram uma taxa de sobrevivência de 80, 91 e 93%, respectivamente. Por sua vez, os vermes post-tratados, ou seja, expostos à luz UV e posteriormente tratados com 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL da infusão, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 66, 73 e 80%, respectivamente. Em relação ao desenvolvimento larval, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 0% após 48 horas após o experimento, não sendo possível estudar um desenvolvimento normal das larvas, porém, nas primeiras 24 horas ocorreu um atraso no desenvolvimento larval, possível resultado de uma dose excessiva de radiação UV para o estágio L1 dos vermes utilizados. Conclui-se que *R. officinalis* L. possivelmente apresente um efeito antioxidante em vermes expostos à radiação UV, porém, mais estudos são necessários para definir exatamente os mecanismos de ação da planta e a dose específica de radiação UV e de infusão a ser utilizada.

Palavras-chave: radiação ultravioleta; *C. elegans*; *Rosmarinus officinalis* L.; produtos naturais; plantas medicinais; mutação genética; especiarias; toxicologia; farmacologia.

VELÁZQUEZ BARRERA, Dahiana Belén. **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA INFUSIÓN DE *Rosmarinus officinalis* L. EN *Caenorhabditis elegans* ANTE LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA (UV)**. 2022. 47. Trabajo de Conclusión de Curso Biotecnología – Universidad Federal de la Integración de Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMEN

La capa de ozono se degrada un 0,5 % al año, lo que deja a los animales, los seres humanos y los ecosistemas expuestos y vulnerables a la radiación ultravioleta (UV) del sol. El rápido agotamiento del ozono se debe, en parte, a las actividades humanas, que aceleran el deterioro de la capa protectora. La radiación ultravioleta provoca cambios graves en los humanos, por ejemplo, mutaciones genéticas, cáncer de piel y estrés oxidativo. También afecta a los ecosistemas, impactando en el equilibrio competitivo de las plantas y afectando los ciclos biogeoquímicos, por lo que se han realizado varios estudios con el fin de minimizar estos efectos. La planta *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.) es de suma importancia y ha sido utilizada desde la antigüedad en la medicina popular, debido a que posee compuestos biológicamente activos como carnosol, ácido rosmarínico y aceites esenciales. El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un pequeño gusano que se utiliza para varios estudios toxicológicos, farmacológicos, biológicos y genéticos, mantenimiento y homología génica del 60-80% con mamíferos. Este trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos de la infusión de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre el nematodo *C. elegans* sometido a exposición a luz ultravioleta, donde los nematodos son expuestos a luz ultravioleta por 15 minutos y tratados con una infusión preparada a partir de hojas de *R. officinalis* L. antes o después de la exposición a la luz ultravioleta. La tasa de supervivencia obtenida fue del 27% en los gusanos expuestos a la luz UV y no tratados con la infusión, mientras que los gusanos pretratados con 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL de la infusión y posterior exposición a la luz UV tuvo una tasa de supervivencia del 80, 91 y 93%, respectivamente. A su vez, los gusanos post-tratados, es decir, expuestos a la luz ultravioleta y posteriormente tratados con 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL de la infusión, tuvieron una tasa de supervivencia del 66, 73 y 80%. respectivamente. En cuanto al desarrollo larvario, se obtuvo una tasa de supervivencia del 0% a las 48 horas de realizado el experimento, no pudiéndose estudiar un desarrollo normal de las larvas, sin embargo, en las primeras 24 horas se presentó un retraso en el desarrollo larvario, posible resultado de una dosis excesiva de radiación UV a la etapa L1 de los gusanos utilizados. Se concluye que *R. officinalis* L. posiblemente tenga un efecto antioxidante sobre las lombrices expuestas a la radiación UV, sin embargo, se necesitan más estudios para definir con exactitud los mecanismos de acción de la planta y la dosis específica de radiación UV e infusión a utilizar.

Palabras clave: radiación ultravioleta; *C. elegans*; *Rosmarinus officinalis* L.; productos naturales; plantas medicinales; mutación genética; especies; toxicología; farmacología.

VELÁZQUEZ BARRERA, Dahiana Belén. **EVALUATION OF THE EFFECTS OF THE INFUSION OF *Rosmarinus officinalis* L. ON *Caenorhabditis elegans* IN THE FACE OF EXPOSURE TO ULTRAVIOLET LIGHT (UV)**. 2022. 47. Biotechnology Course Conclusion Work – Universidad Federal de la Integración de Latino-Americana, Foz do Iguacu, 2022.

ABSTRACT

The ozone layer is degrading by 0.5% per year, leaving animals, humans and ecosystems exposed and vulnerable to ultraviolet (UV) radiation from the sun. The rapid depletion of ozone is due, in part, to human activities, which accelerate the deterioration of the protective layer. UV radiation causes serious changes in humans, for example, genetic mutations, skin cancer and oxidative stress. It also affects ecosystems, impacting the competitive balance of plants and affecting biogeochemical cycles, for which several studies have been carried out in order to minimize these effects. The plant *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis* L.) is extremely important and has been used since ancient times in popular medicine, because it has biologically active compounds such as carnosol, rosmarinic acid and essential oils. The nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is a small worm used for various toxicological, pharmacological, biological and genetic studies, maintenance and 60-80% gene homology with mammals. The objective of this work is to evaluate the effects of the infusion of *Rosmarinus officinalis* L. leaves on the nematode *C. elegans* subjected to exposure to ultraviolet light, where the nematodes are exposed to ultraviolet light for 15 minutes and treated with an infusion prepared from of *R. officinalis* L. leaves before or after exposure to ultraviolet light. The survival rate obtained was 27% in the worms exposed to UV light and not treated with the infusion, while the worms pretreated with 50 mg/mL, 100 mg/mL and 200 mg/mL of the infusion and subsequent exposure under UV light it had a survival rate of 80, 91 and 93%, respectively. In turn, post-treated worms, that is, exposed to ultraviolet light and subsequently treated with 50 mg/mL, 100 mg/mL and 200 mg/mL of the infusion, had a survival rate of 66, 73 and 80%, respectively. Regarding larval development, a survival rate of 0% was obtained 48 hours after the experiment was carried out, not being able to study a normal development of the larvae, however, in the first 24 hours there was a delay in larval development, possible result of an excessive dose of UV radiation to the L1 stage of the worms used. It is concluded that *R. officinalis* L. possibly has an antioxidant effect on earthworms exposed to UV radiation, however, more studies are needed to define exactly the mechanisms of action of the plant and the specific dose of UV radiation and infusion to use.

Key words: ultraviolet radiation; *C. elegans*; *Rosmarinus officinalis* L.; natural products; medicinal plants; genetic mutation; spices; toxicology; pharmacology.

LISTA DE ILUSTRACIONES

Figura 1 - Luz ultravioleta posicionada en relación al resto del espectro de luz	18
Figura 2 - Ciclo de vida del nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
Figura 3 - Anatomía del <i>Caenorhabditis elegans</i> adulto.....	25
Figura 4 - Protocolo de Sincronización de <i>C. elegans</i>	29
Figura 5 - Tratamiento con Infusión previa a la exposición a la luz UV	30
Figura 6 - Tratamiento con Infusión posterior a la exposición a la luz UV.....	31
Figura 7 - Exposición de <i>C. elegans</i> a la luz UV.....	32
Figura 8 - Análisis de sobrevivencia en tratamiento con <i>R. officinalis</i> L. Pre-UV	34
Figura 9 - Análisis de sobrevivencia en tratamiento con <i>R. officinalis</i> L. Post-UV..	35

LISTA DE ABREVIACIONES Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ADN mt	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
ANOVA	Análisis de varianza
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramos
HaCaT	Células de queratinocitos humanos inmortalizados
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico
KPO ₄	Fosfato de Potasio
M	Molar
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mg	Miligramos
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio

mL	Mililitros
NGM	Nematode Growth Medium (Medio de crecimiento de nematodos)
NaCl	Cloruro de calcio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato sódico
nm	Nanómetros
<i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
rpm	Rotaciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
UNILA	Universidad Federal de la Integración Latinoamericana
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	17
2.1 LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA	17
2.1.1 Efectos de la radiación ultravioleta.....	18
2.1.1.1 <i>En la salud humana</i>	18
2.1.1.2 <i>En las plantas terrestres</i>	19
2.1.1.3 <i>En los sistemas acuáticos</i>	20
2.1.1.4 <i>La radiación ultravioleta A como un causante de estrés oxidativo</i> 20	
2.2 <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	20
2.2.1 Usos del <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	21
2.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> COMO MODELO EXPERIMENTAL	22
2.3.1 Biología del <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
2.3.2 Ventajas del <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo biológico.....	25
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5. METODOLOGÍA	27
5.1. PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN	27
5.2. PREPARACIÓN DE PLACAS NGM Y CULTIVO DE BACTERIAS <i>E. Coli</i> 27	
5.3. MANTENIMIENTO Y SINCRONIZACIÓN DE LOS NEMATODOS <i>C. elegans</i>	28
5.4. TRATAMIENTO CON <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	29
5.4.1 PREVIA A LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.	29
5.4.2 TRAS LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.	30
5.5. EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.	31
5.6. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LETALIDAD.....	32
5.7. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO LARVAL.....	33
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	33
6.1. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LETALIDAD.....	33
6.2 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO LARVAL.....	37
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUCCIÓN

El medioambiente y la atmósfera se ven gravemente afectados por las actividades antropogénicas, siendo de conocimiento público uno de los grandes efectos: el daño y degradación de la capa de ozono (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011) que consiste principalmente de un gas en la estratósfera donde están acumuladas varias partículas de ozono (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010). Normalmente, esta capa sufre de una descomposición natural, sin embargo, hay un equilibrio entre esa descomposición y su formación natural, manteniendo constante la cantidad de ozono (ANWARD *et al.*, 2016). No obstante, ese equilibrio se ve afectado tanto por fenómenos naturales como humanos, siendo algunos de ellos, el uso de clorofluorocarbonos (ANGELL & KORSHOVER, 2005), la emisión de compuestos nitrogenados (RAVISHANKARA & PORTMANN, 2009), el efecto invernadero, el calentamiento global y el lanzamiento no regulado de cohetes (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011). Todo esto causa una gran preocupación pues la capa de ozono cumple un papel super importante: protegernos de la radiación ultravioleta (DE GRUIJL, 2002).

La radiación ultravioleta es responsable de causar graves enfermedades a los seres humanos, como, por ejemplo, mutaciones genéticas, cáncer de piel, daño ocular (ANGELL & KORSHOVER, 2005) y estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (POURZAND & TYRELL, 1999), además de afectar negativamente a los ambientes acuáticos y a los animales (SÁNCHEZ, 2006).

Las plantas y hierbas poseen compuestos con propiedades antioxidantes, siendo estas, enzimas, glutatión, vitaminas y compuestos fenólicos, conocidos como metabolitos secundarios. Estos son capaces de evitar el daño oxidativo tanto en los seres vivos (NIETO *et al.*, 2018) como en los alimentos, causado por las especies reactivas de oxígeno (ALTEMIMI *et al.*, 2017) y son generalmente encontrados en los aceites esenciales y extractos de plantas (FIKRY *et al.*, 2019). Además, también son fuente de moléculas como flavonas, catequinas, antocianinas, carotenoides y flavonas (STEVANATO *et al.*, 2014) los cuales funcionan como compuestos fotoprotectores (LORENZO, 2019) capaces de aplacar las afecciones causadas por la radiación ultravioleta,

por ejemplo, el cáncer de piel (MONTES DE OCA *et al.*, 2017) y el fotoenvejecimiento celular (MUKHERJEE *et al.*, 2011; LORENZO, 2019). Por esto, infusiones de hojas de varias plantas son utilizadas en tratamientos profilácticos y como un apoyo en los tratamientos medicinales aprobados por especialistas, con efectos sedantes y analgésicos (FIKRY *et al.*, 2019), antiinflamatorios y antioxidantes (GOUDJIL *et al.*, 2020; FLORES-VILLA *et al.*, 2020).

La familia de plantas Lamiaceae es una de las más grandes y más destacadas en cuanto a la medicina y estética por poseer estructuras glandulares externas capaces de producir aceite volátil (GARCÍA *et al.*, 2019). Dentro de esta familia se encuentra la planta *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis*), coloquialmente conocida como Romero o Rosemary, la cual es ampliamente utilizada pues sus metabolitos secundarios se encuentran distribuidos por casi todas las partes de la planta, siendo estos, el tallo, las flores, las hojas y las raíces (FLORES-VILLA *et al.*, 2020). Esta ventaja ha conllevado a que cada día se realicen nuevos estudios con el objetivo de encontrar aplicaciones de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas del *R. officinalis* L., útiles tanto para los seres humanos como para los animales. De hecho, según Topcu y Kusman (2014) esta planta ha demostrado cumplir el papel de un neuroprotector natural y está científicamente comprobado que posee actividades antimicrobianas (MANGENA & MUYIMA, 2002), antiulcerosas (DIAS *et al.*, 2000), antitumorales (SINGLETARY & NELSHOPPEN, 1991), antioxidantes (BACKLEH *et al.*, 2003), entre otras (BEGUM *et al.*, 2013). También, Pérez-Sánchez *et al.* (2014), demostró que los extractos de *R. officinalis* y citrus ejercen un efecto protector en la viabilidad de modelos de células de piel luego de ser expuestas a la radiación ultravioleta B, además de prevenir el daño del ADN en una línea de células de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT).

Uno de los organismos frecuentemente utilizados en estudios laboratoriales *in vivo* con enfoques toxicológicos y ambientales es el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), quien últimamente ha demostrado ser exitoso en evaluaciones de toxicidad de sustancias tóxicas que se encuentran en concentraciones ambientales relevantes (ZHANG *et al.*,

2011). No obstante, el *C. elegans* también es ampliamente utilizado para estudios de origen molecular y fue el primer metazoario en tener su genoma totalmente secuenciado (BRENNER, 1974; PEÑA *et al.*, 2017). De hecho, se ha demostrado una homología de 60-80% entre los genes del *C. elegans* y los genes de mamíferos (KALETTA & HENGARTNER, 2006), conllevando a una fuerte conservación de genes y proteínas entre humanos y *C. elegans* (VANDYUN *et al.*, 2012). Existen diversos ensayos de supervivencia que ayudan a estudiar procesos fisiológicos y que pueden ser realizados utilizando a este nematodo como organismo modelo. Algunos de esos ensayos son el estrés oxidativo y el estrés por radiación ultravioleta, este último puede ser realizado analizando la supervivencia contra la radiación ultravioleta utilizando diferentes etapas de gusanos *C. elegans* con el fin de determinar los efectos específicos de la radiación UV en cada etapa larval (PARK *et al.*, 2017), pues se ha demostrado que los efectos de la luz ultravioleta sobre la salud y la supervivencia de los *C. elegans* son dependientes de la dosis administrada (MURAKAMI & JOHNSON, 1996; WANG *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la exposición humana a la luz solar, ya sea crónica o aguda, está relacionada con diferentes efectos patológicos y fisiológicos que van desde un simple eritema y quemadura solar, hasta el envejecimiento de la piel y el cáncer (POURZAND & TYRELL, 1999). Es por eso que este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antioxidante y reparador de la infusión de plantas de *R. officinalis* L. en *C. elegans* buscando revertir o prevenir los efectos producidos por exposiciones a radiaciones ultravioleta.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

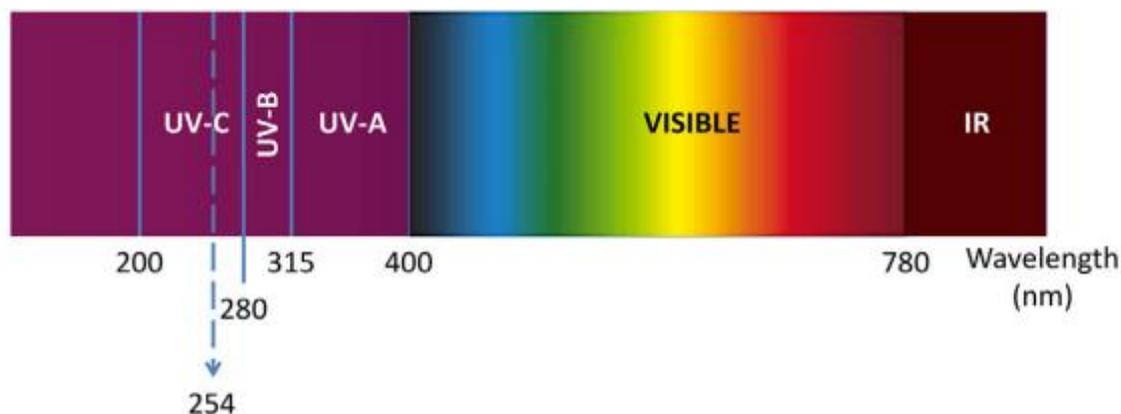
2.1 LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

Gracias a la capa de ozono conocemos a la vida terrestre como tal (VAN DER LEUN, 2004) pues actúa como un escudo o protector natural contra los rayos ultravioleta (UV) (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010), los cuales son considerados una toxina ambiental a la que los humanos, animales y ecosistemas se encuentran expuestos (DEBARDELEBEN *et al.*, 2017). No obstante, debido a ciertos fenómenos naturales y a las actividades humanas, el ozono presente en la estratósfera se está agotando (ANWAR *et al.*, 2016). De hecho, se ha documentado que desde el año 2000 se ha notado un aumento del 0,5% por año en la tasa de agotamiento de la capa de ozono (ROZEMA *et al.*, 2005) dejando a la Tierra vulnerable ante los rayos UV que afectan los ciclos biogeoquímicos, la vida acuática, los animales, humanos y también contribuye al calentamiento global (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011).

La porción ultravioleta del espectro electromagnético está compuesta por tres tipos de radiaciones clasificadas de acuerdo a sus longitudes de onda. Están las radiaciones UV de onda corta, que comprenden de 200 a 280 nm y son llamadas de radiación ultravioleta C (UVC), luego se encuentran las radiaciones UV de onda media, comprendiendo de 280 a 315 nm, llamadas de radiación ultravioleta B (UVB) y, por último, se encuentran las radiaciones ultravioletas de onda larga, que comprenden de 315 a 400 nm y son llamadas de radiación ultravioleta A (UVA) (BINTSIS *et al.*, 2000; URBAN *et al.*, 2016) (Figura 1).

La capa de ozono se encarga de absorber por completo las longitudes de onda menores que 280 nm, es decir, las radiaciones ultravioletas C, sin embargo, mayores longitudes de onda, son capaces de alcanzar la superficie terrestre, las radiaciones ultravioleta B (UVB) y las radiaciones ultravioleta A (UVA), siendo estas dos últimas las responsables de causar daños y enfermedades a los humanos (KRUTMANN, 2000).

Figura 1 - Luz ultravioleta posicionada en relación al resto del espectro de luz



Fuente: URBAN *et al.*, 2016

2.1.1 Efectos de la radiación ultravioleta

El ADN que tiene anillos aromáticos en todas sus bases es una molécula muy susceptible a la radiación UVB pues la absorbe en gran cantidad, volviéndolo un blanco de la radiación UV solar, sin embargo, a pesar de que el rango de absorción de la radiación UVA por parte del ADN es pequeño, éste parece ser dañado por ella (DE GRUJIL, 2002). Aparentemente, ese daño surge de manera indirecta mediante la absorción de la radiación UV por parte de otras moléculas que posteriormente forman radicales libres capaces de reaccionar con el ADN, donde las especies reactivas de oxígeno parecen ser protagonistas de dichas reacciones (PEAK *et al.*, 1987; DE GRUJIL, 2002).

2.1.1.1 En la salud humana

Las mitocondrias tienen como función proveer de energía a la célula llevando a cabo la fosforilación oxidativa, proceso llevado a cabo por el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (mt), (mt ADN), sin embargo, un error en esa reacción podría llevar a la formación de especies reactivas de oxígeno. Mediante estudios, se pudo reconocer que mutaciones del mt ADN tienen un papel importante tanto en el proceso normal de envejecimiento como en el fotoenvejecimiento de la piel humana. También se ha demostrado que cantidades de deleciones a gran escala del mt ADN se encuentran en la piel fotoenvejecida cuando comparadas con la piel protegida del sol (BERNEBURG

et al., 1997; BERNEBURG *et al.*, 1998). Mediante diversos estudios se pudo comprobar que la radiación UVA ejerce un papel importante en mutaciones de mt ADN en la piel humana (KRUTMANN, 2000).

Se ha demostrado también que la exposición a la radiación UV solar puede conllevar al desarrollo de cáncer de piel, del cual existen dos tipos: Melanoma y no melanoma. Una búsqueda bibliográfica en la que fueron analizados 57 estudios, demostró que existe una fuerte relación entre el desarrollo de melanoma, la exposición intermitente al sol y los antecedentes de quemaduras solares (GANDINI *et al.*, 2004). Los estudios realizados sobre el carcinoma de piel no melanoma demostraron también que tomar sol aumenta cinco veces más el riesgo de desarrollo en la región del tronco del cuerpo (ANWAR *et al.*, 2016).

Con respecto al ojo, casi todas las estructuras oculares son dañadas por la radiación UV, yendo desde el párpado hasta el cristalino y la córnea (CHRISTENSON *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 1999). La luz ultravioleta también está asociada al carcinoma de células escamosas, ya que la superficie frontal del ojo es capaz de absorber 99% de la radiación UV. Este carcinoma puede ocurrir en la conjuntiva del ojo e invadir la córnea y el interior del ojo, haciendo que a veces sea necesaria una cirugía de extirpación del ojo entero (KUO, 2019). También se ha demostrado que las cataratas, la ceguera y la fotoqueratitis son causadas por la radiación UV (ANWAR *et al.*, 2016).

Varios experimentos demostraron, además, que la exposición a los rayos UV resultan en la disminución de la respuesta inmune ante algunas enfermedades infecciosas y a los distintos tipos de cáncer de piel (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011). De acuerdo a ANDERSEN *et al.* (2002), mientras más aumenta el agotamiento del ozono, más aumenta también la supresión del sistema inmunológico.

2.1.1.2 *En las plantas terrestres*

STEDMAN (1981), menciona que existe una probabilidad que un alto índice de radiación UVB en pastizales y bosques conlleve a una mutación de las especies, resultando en la alteración de la biodiversidad en los diversos ecosistemas. Por otro lado, la radiación UVB también podría tener un

efecto negativo en los organismos vegetales, pudiendo alterar desde la forma de la planta hasta el metabolismo secundario producido por la misma, pudiendo impactar el equilibrio competitivo de las plantas y los ciclos biogeoquímicos (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011).

2.1.1.3 *En los sistemas acuáticos*

Altos índices de radiaciones UV pueden causar una disminución del fitoplancton y también causar daños en el desarrollo de los animales marinos (anfibios, camarones, cangrejos, peces) que también acabaría afectando a la especie humana, pues generalmente estos animales sirven como fuente de alimento y proteínas diarias (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011).

2.1.1.4 *La radiación ultravioleta A como un causante de estrés oxidativo*

Estudios realizados *in vitro* demuestran que la radiación UVA de las moléculas puede conllevar a la formación de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido (TYRRELL, 1991; TYRRELL *et al.*, 1991) y que la reducción del peróxido de hidrógeno por el anión superóxido puede causar en una cantidad aún mayor el radical hidroxilo, el cual es altamente reactivo (BEAUCHAMP, 1970; POURZAND & TYRRELL, 1999). Algunos estudios realizados en células procariotas y eucariotas demuestran que también es posible que se generen especies reactivas de oxígeno *in vivo* mediante la radiación UVA (POURZAND & TYRRELL, 1999).

2.2 *Rosmarinus officinalis L.*

El *R. officinalis L.* (Romero) es una de las plantas más prometedoras e importantes dentro de la familia Lamiaceae (OZAROWSKI *et al.*, 2013), es una planta doméstica originaria del Mediterráneo, de Asia Occidental y del norte y sur de África (KARADAG *et al.*, 2019) pero es actualmente cultivada en diversas partes del mundo (ZAMBERLAN *et al.*, 2016).

Se trata de una planta aromática perenne que puede llegar hasta los 2 metros de altura, con ramas de color marrón y hojas de un tamaño de 10-36 x 1,2-3,5 mm. Presenta pocas flores que se encuentran en una

disposición conocida como verticilastro auxiliar, el cáliz joven mide entre 3 y 4 nm llegando a alcanzar los 7 nm una vez maduro, a su vez, la corola llega a medir hasta 12 nm (CENTENO, 2002). En cuanto a su cultivo, la multiplicación puede realizarse a partir de semillas o por esquejes. La multiplicación por semillas se lleva a cabo en viveros a comienzos de la primavera o una vez que las semillas de la planta madre ya se encuentren maduras, por otro lado, los esquejes ya bien desarrollados son enterrados también a comienzos de la primavera y ya sea en otoño o en la siguiente primavera son trasplantados al terreno que será definitivo (CENTENO, 2002). De mayo a junio es cuando ocurre su periodo de floración y de primavera a verano el de fructificación (BORGES *et al.*, 2018; FLORES-VILLA *et al.*, 2020).

Se ha demostrado que los extractos de sus hojas son ricos en compuestos biológicamente activos: ácidos fenólicos (ácido rosmarínico y ácido clorogénico), aceite esencial, diterpenos fenólicos (ácido carnósico y carnosol), flavonoides y triterpenos pentacíclicos (oleanólico y ácido betúlico) (ORHAN, *et al.*, 2008; ALMELA *et al.*, 2006; HERRERO *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2008; OZAROWSKI *et al.*, 2013).

2.2.1 Usos del *Rosmarinus officinalis L.*

Entre sus principales aplicaciones y usos se encuentra la industria alimenticia, como saborizante de comida (BASHEER, 2018; BORGES *et al.*, 2018) y en la preservación de alimentos perecederos (SASIKUMAR, 2012), la industria cosmética como aromatizante de perfumes y fragancias, como impulsor del crecimiento capilar (ENDO *et al.*, 2018) y como aditivo de cremas, shampoo y jabón (AKHBARI *et al.*, 2018; FLORES-VILLA *et al.*, 2020).

Desde hace tiempo se conoce que esta planta posee efectos antidepresivo (HEINRICH *et al.*, 2006), antiinflamatorio (ALTINIER *et al.*, 2007), hepatoprotector (SOTELO-FELIX *et al.*, 2002), gastroprotector (AMARAL *et al.*, 2013), antidiabético (BAKIREL *et al.*, 2008), antioxidante (BASHEER, 2018), antitrombótico (YAMAMOTO *et al.*, 2005; ZAMBERLAN *et al.*, 2016), espasmolítico (GOMES *et al.*, 2020), antidiarreicos (SELMİ *et al.*, 2017), vasorrelajante (ZHANG *et al.*, 2019), antiobesidad, neuroprotector (HAMIDPOUR *et al.*, 2017), anti-toxigénicos y antimutagénicos (NIETO *et al.*,

2018), anticancerígeno (KARIM *et al.*, 2017), antitumorales y anti-hepatotóxico (EL-DESOUKY *et al.*, 2019), inhibidor contra el VIH (BARBIERI *et al.*, 2019), antihelmíntico (ZORAL *et al.*, 2018), antiartrítico (BELTRAN *et al.*, 2017; FLORES-VILLA *et al.*, 2020) y un potencial terapéutico para la enfermedad del Alzheimer (HABTEMARIAM, 2016; NIETO *et al.*, 2018).

Además, en los estudios e investigaciones realizados actualmente se ha conseguido demostrar efectos farmacológicos contra cardiopatías isquémicas, úlceras gástricas, aterosclerosis, procesos inflamatorios, deficiencias cardíacas y hasta contra algunos tipos de cáncer (AMARAL *et al.*, 2017; FLORES-VILLA *et al.*, 2020). En un estudio realizado por MARTIN *et al.* (2008) donde se investigaron los efectos que un extracto de *R. officinalis* L. soluble en agua posee sobre la expresión de la metaloproteinasa de matriz-1 (MMP-1) en un modelo de piel 3D inducida por la radiación UV, se encontró que el extracto en cuestión inhibe la regulación al alza de la transcripción del gen MMP-1 inducida por la radiación UV. Siendo esto de suma importancia, pues la regulación en alza de la MMP-1 es uno de los principales factores del desarrollo del fotodaño de la piel.

2.3 *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO EXPERIMENTAL

Debido a que los mamíferos de laboratorios usados en pruebas de toxicidad poseen gran similitud con los humanos en cuanto a vías de desarrollo y órganos del cuerpo, ellos son uno de los más utilizados en el área de la toxicología (HUNT, 2016). Sin embargo, los estudios toxicológicos que emplean mamíferos como objetos de estudio además de requerir bastante tiempo, también son muy costosos (NASS & HAMZA, 2007; TRALAU *et al.*, 2012), por eso, la toxicología predictiva se encarga de encontrar nuevos métodos que puedan mejorar los resultados obtenidos, mientras que intenta reducir el tiempo necesario, el uso de mamíferos y el costo de la investigación (HUNT, 2016). Una de las opciones alternativas al uso de mamíferos, es el uso del *Caenorhabditis elegans* (HUNT, 2016).

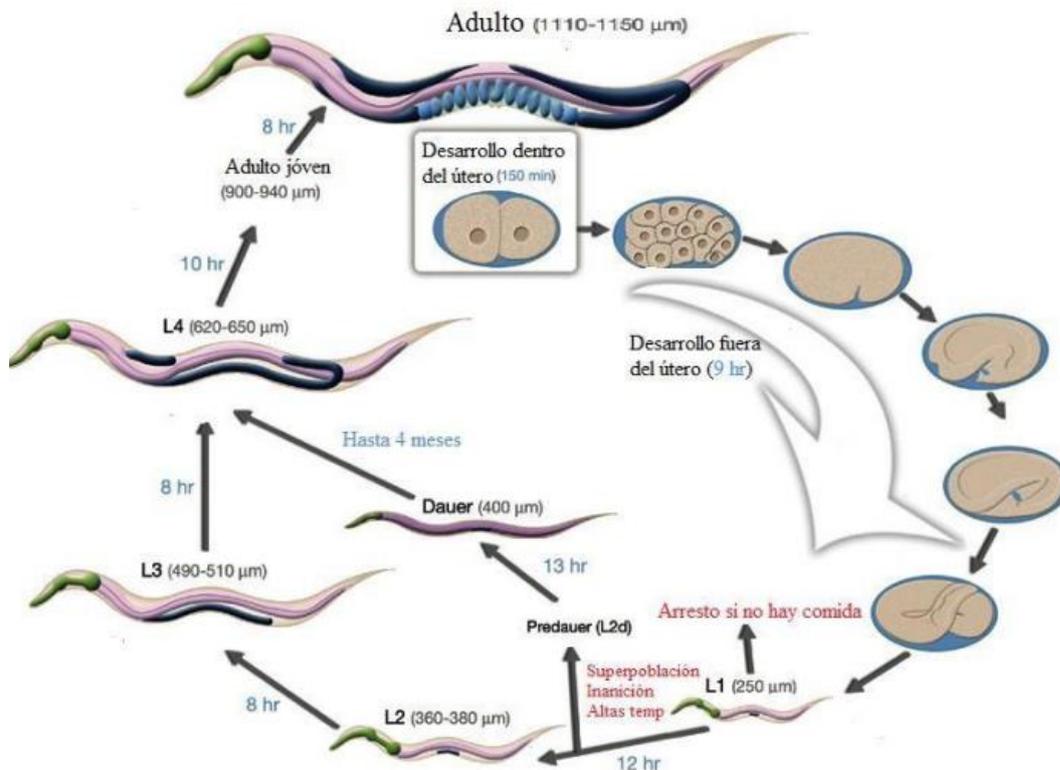
El *C. elegans* es un nematodo de vida libre que hoy día es considerado un gran modelo biológico en distintas áreas, por ejemplo, ciencias médicas, biología del desarrollo, genética, toxicología y farmacología, y

procesos biológicos como señalización celular, regulación génica, apoptosis, determinación celular, ciclo celular y metabolismo (RIDDLE *et al.*, 1997; KALETTA & HENGARTNER, 2006) Todo esto comenzó en el año 1963, mediante las investigaciones de Sydney Brenner, un biólogo molecular ganador del premio Nobel, usando *C. Elegans* con el fin de estudiar sobre el sistema nervioso y su desarrollo (BRENNER, 1988; STRANGE, 2006; AVILA *et al.*, 2012).

2.3.1 Biología del *Caenorhabditis elegans*

El *C. elegans* pertenece al filo Nematoda, los gusanos adultos son mayoritariamente hermafroditas que pueden producir aproximadamente 300 descendientes y pueden medir aproximadamente 1 mm de longitud, sin embargo, existe un pequeño porcentaje de gusanos machos. Si son mantenidos bajo condiciones óptimas de crecimiento en el laboratorio, su promedio de vida puede ser de dos a tres semanas. Tienen un ciclo de vida muy rápido (STRANGE, 2006), en tres días pasan de huevos a gusanos adultos (KALETTA & HENGARTNER, 2006), pasando por cuatro estadios larvales para convertirse en adultos: estadio L1, estadio L2, estadio L3 y estadio L4 (STRANGE, 2006). Existe una ruta de desarrollo alternativa llamada de larva Dauer, esta se da cuando el *C. elegans* se encuentra en un ambiente desfavorable, ya sea por la elevada temperatura, por escasez de alimentos o sobrepoblación. En estas situaciones, las larvas entran en un estado hipometabólico (BATTISTA, 2019) en el cual dejan de alimentarse y tienen adaptaciones comportamentales: la locomoción se ralentiza, aumentando su esperanza de vida hasta diez veces más (STRANGE, 2006), pudiendo llegar a sobrevivir por tres o cuatro meses (BATTISTA, 2019), una vez que las condiciones mejoran, las larvas continúan su desarrollo hasta llegar a la etapa adulta (SMEAL & GUARENTE, 1997; STRANGE, 2006) (Figura 2).

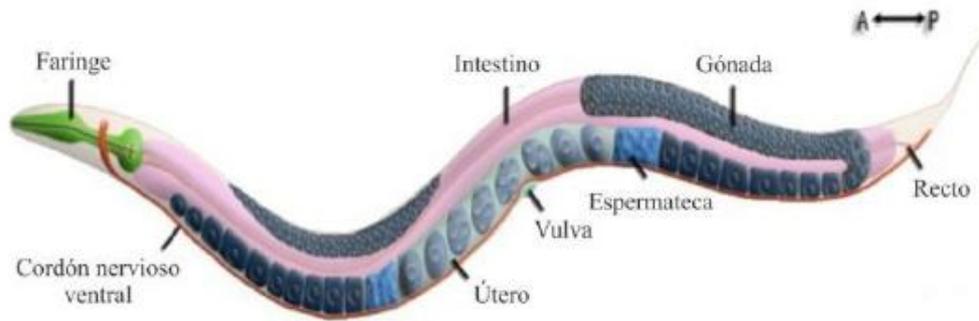
Figura 2 - Ciclo de vida del nematodo *Caenorhabditis elegans*



Fuente: BATTISTA, 2019.

El sistema nervioso de los gusanos de *C. elegans* hermafroditas adultos está compuesto por 302 neuronas y 56 células de la glía y de soporte, por otro lado, los gusanos machos tienen 381 neuronas y 92 células de la glía y de soporte (STRANGE, 2006). Las neuronas emiten señales mediante 1410 uniones neuromusculares, 890 uniones eléctricas y 6393 sinapsis químicas usando los mismos sistemas neurotransmisores que son expresados en los vertebrados (CHEN *et al.*, 2006; AVILA *et al.*, 2012). También se puede apreciar que los adultos cuentan con 959 células somáticas capaces de formar glándulas, el sistema reproductivo, la hipodermis, los músculos y el sistema nervioso (RIDDLE *et al.*, 1997; White, 1988; KALETTA & HENGARTNER, 2006) (Figura 3).

Figura 3 - Anatomía del *Caenorhabditis elegans* adulto



Fuente: Imagen modificada de BATTISTA, 2019.

2.3.2 Ventajas del *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico

El *C. elegans* posee varias características que lo hacen un gran candidato para los estudios laboratoriales. Primeramente, se encuentra su ciclo de vida rápido, pues en 4 días es posible iniciar y terminar un experimento obteniendo resultados concluyentes, mientras que en los mamíferos es de gran dificultad el estudio de efectos crónicos y retardados de los agentes ambientales, por ejemplo, debido a sus largos ciclos de vida (KALETTA & HENGARTNER, 2006). Seguidamente se encuentra el hecho de poseer un cuerpo transparente que permite visualizar marcadores de fluorescencia *in vivo* (CORSI, 2006; BATTISTA, 2019), dándonos la oportunidad de estudiar procesos como el metabolismo de las grasas, el crecimiento de axones y la embriogénesis (KALETTA & HENGARTNER, 2006). En tercer lugar, tenemos el bajo costo de cultivo y mantenimiento, pues es posible hacerlo crecer en placas de Petri con un sembrado de bacterias de *Escherichia coli* (*E. coli*) de cepa OP50 y su mantenimiento solamente consiste en transferir a los gusanos cortando un pedazo pequeño de agar y colocarlo en otra placa conteniendo el medio de crecimiento y el sembrado de bacterias (BATTISTA, 2019). Por último, se encuentra el hecho de ser el primer animal en tener su genoma secuenciado por completo (BENITEZ & VERBEL, 2016) y, gracias a eso, se pudo saber que expresan homólogos del 60% al 80% de genes humanos (KALETTA & HENGARTNER, 2006; AVILA *et al.*, 2012). Es más, comparaciones realizadas entre mamíferos y *C. elegans* confirman que gran

parte de las vías de enfermedad y genes humanos se encuentran en los *C. elegans* (THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM, 1998; KALETTA & HENGARTNER, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Las actividades humanas junto con algunos fenómenos naturales causan un deterioro en la capa de ozono, dejando a la Tierra más susceptible y expuesta a la radiación ultravioleta proveniente del Sol, debido a eso, tanto los seres humanos como los animales y ecosistemas se encuentran vulnerables ante sus efectos dañinos (SIVASAKTHIVEL & REDDY, 2011).

La planta de *Rosmarinus officinalis* L. posee una gran variedad de componentes bioactivos y es una de las especies conocidas a lo largo de los años por poseer sustancias benéficas para la salud (TUNCER, 1978; TOPCU & KUSMAN, 2014).

Dado que el nematodo *Caenorhabditis elegans* tiene gran similitud con los humanos en cuanto a la respuesta de ambos organismos a nivel molecular ante la exposición a genotóxicos (VANDUYN *et al.*, 2012), el mismo fue seleccionado como animal experimental en este estudio.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la infusión de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. poseen un efecto preventivo o curativo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* sometido a una exposición a luz ultravioleta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los efectos que causa la exposición del *Caenorhabditis elegans* a la luz ultravioleta;
- Analizar si la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. ejerce efectos benéficos en gusanos de *Caenorhabditis elegans* pre y post expuestos a la luz ultravioleta;

- Definir la concentración de infusión de *Rosmarinus officinalis L.* más beneficiosa ante los efectos producidos por la exposición a la luz ultravioleta.

5. METODOLOGÍA

5.1. PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN

La infusión se obtuvo a partir de 50 g de hojas secas de *Rosmarinus officinalis L.*, de la marca “Arcoiris” y lote “13/01/22”, proveniente de la tienda “Minimercado Glacial”, hervidas en 200 mL de agua destilada durante 10 minutos (ACHOUR *et al.*, 2017) obteniendo una solución madre de 250 mg/mL.

5.2. PREPARACIÓN DE PLACAS NGM Y CULTIVO DE BACTERIAS *E. Coli*

Fueron preparadas placas con medio de crecimiento de nematodos (NGM) mediante 2,5 g de bactopectona, 3 g de NaCl y 17 g de agar en 975 mL de agua destilada, medio que fue posteriormente enriquecido con 1 mL de CaCl₂ 1M, 1 mL de colesterol 5mg/mL, 1 mL de MgSO₄ 1M, 1 mL de Estreptomina, 1 mL de Nistatina y 25 mL de KPO₄ 1M (STIERNAGLE, 2006). Esas placas tuvieron a su vez un sembrado de bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) OP50 que sirvieron como fuente de alimento y nutrientes, por último, las placas fueron mantenidas a 37°C.

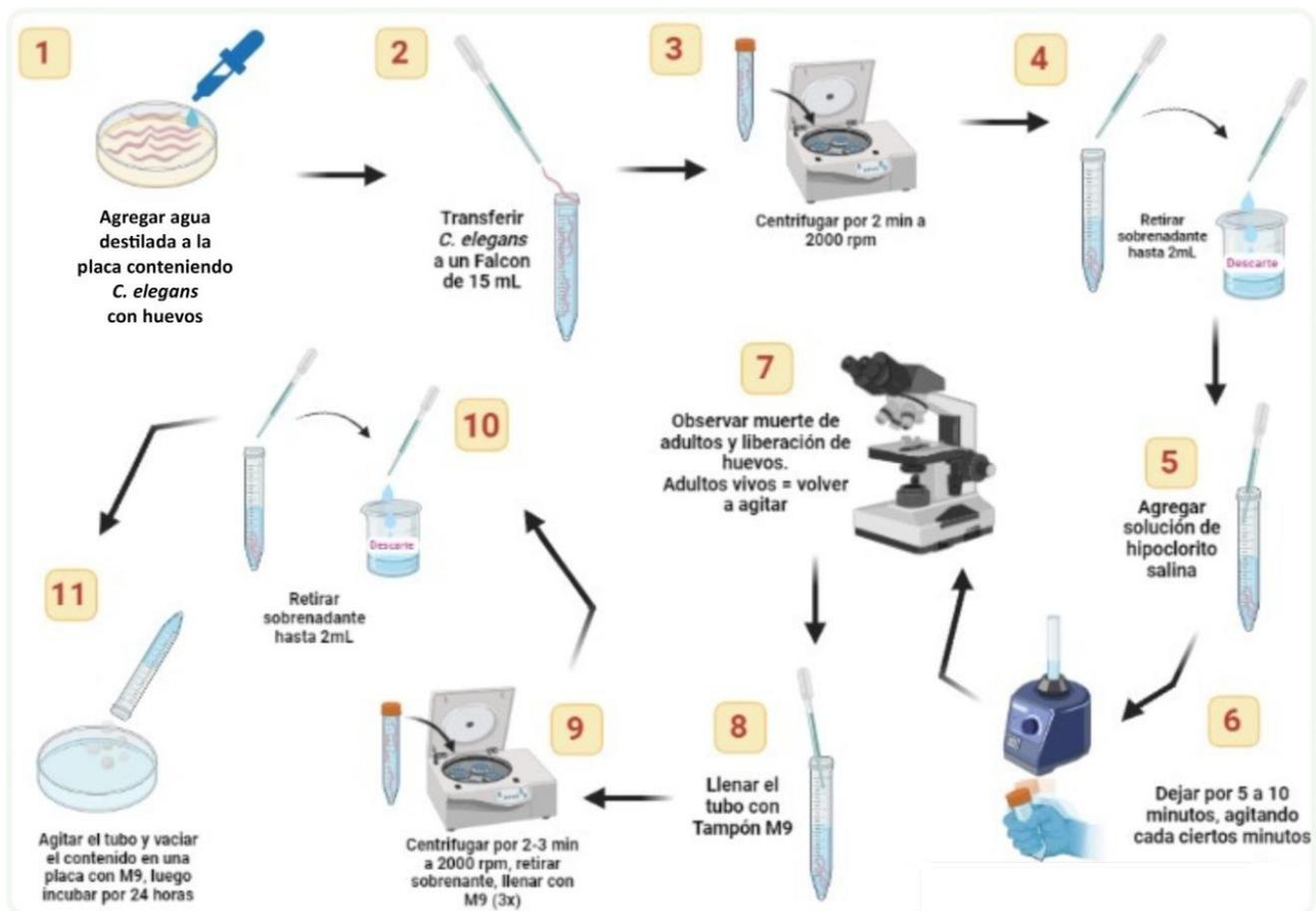
Para poder conseguir las bacterias *E. coli*, partiendo de un cultivo stock, se aisló una colonia y se procedió a cultivarla en medio Luria Bertani sólido, compuesto por 10 g de Bacto-triptona, 5 g de Bacto-levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar y 1 litro de agua destilada (BYERLEY *et al.*, 1976), usando el método de estrías y dejando el cultivo crecer a 37 °C por 24 horas. Una vez se haya obtenido el crecimiento de la colonia aislada, se procedió nuevamente a aislar una colonia de interés y se la dejó crecer en medio Luria Bertani líquido, el cual contenía los mismos reactivos previamente descritos, a excepción del agar. Este procedimiento fue realizado en tres ocasiones.

5.3. MANTENIMIENTO Y SINCRONIZACIÓN DE LOS NEMATODOS *C. elegans*

Los nematodos fueron sembrados en las placas NGM preparadas anteriormente y dejados crecer en incubadora a 20°C para su posterior sincronización.

Para conseguir gusanos en etapa L1, luego de 72 horas (3 días) de cultivarlos, los gusanos adultos con huevos fueron colocados en 5 mL de tampón M9 (el cual contenía 3 g de KH₂PO₄ 22mM, 6 g de Na₂HPO₄ 42 mM, 5 g de NaCl 86 mM, 1 mL de MgSO₄ 1 mM y 1 L de agua destilada (PORTA-DE-LA-RIVA *et al.*, 2012) y luego fueron transferidos a un tubo Falcon de 15 mL para su posterior centrifugación por dos minutos a 2000 rpm, luego el sobrenadante fue eliminado dejando apenas 2mL de solución. Fueron añadidos 5 mililitros de solución de hipoclorito alcalino (Bleaching solution), compuesto por 3,5 mL de agua, 0,5 mL de hidróxido de sodio (NaOH 10M) y 1 mL de hipoclorito de sodio (NaOCl) (STIERNAGLE, 2006) el cual se dejó reposar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente con agitación cada ciertos minutos para resuspender los gusanos que se hayan asentado (LEWIS & FLEMING, 1995), logrando que los gusanos adultos mueran por medio de la ruptura de la cutícula, liberando así los huevos contenidos en su interior. Los embriones fueron incubados por 24 horas a 20°C en tampón M9 (NASS *et al.*, 2002; NASS & HAMZA, 2007; VANDUYN *et al.*, 2012). Después de eso, los huevos eclosionaron y obtuvimos los gusanos L1 que se usaron en los experimentos siguientes (Figura 4). Procedimiento realizado en tres ocasiones.

Figura 4 – Protocolo de Sincronización de *C. elegans*



Fuente: de la autora.

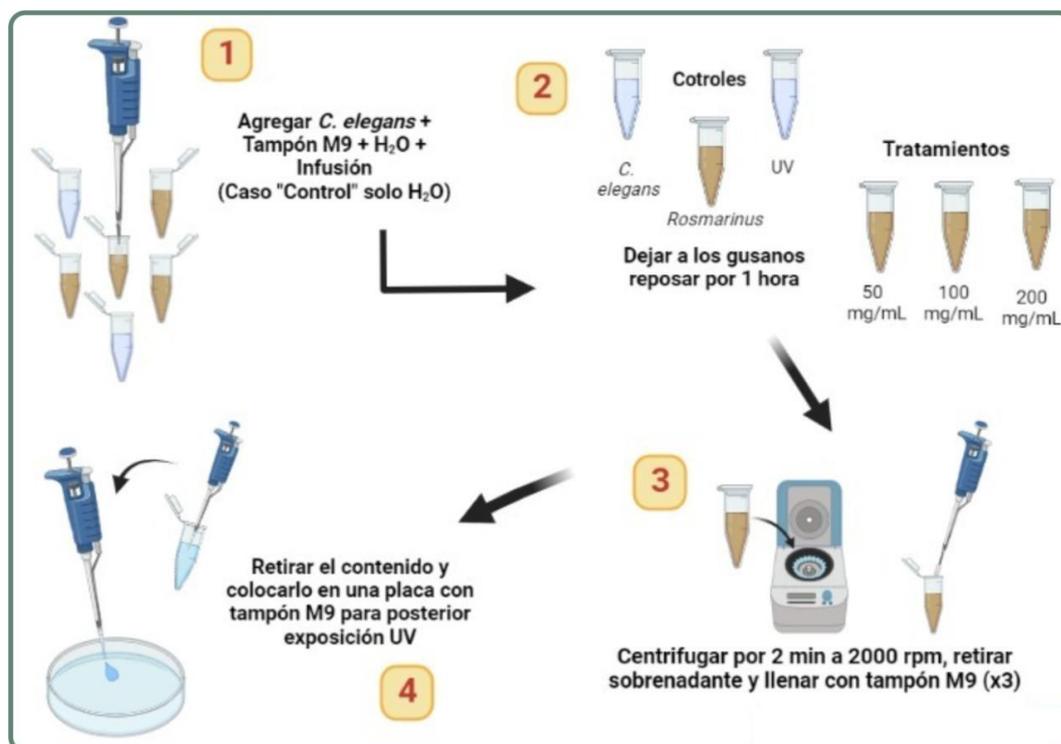
5.4. TRATAMIENTO CON *Rosmarinus officinalis* L.

5.4.1 PREVIA A LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.

Antes de que los gusanos fuesen expuestos a la luz ultravioleta, los mismos fueron pre-tratados durante 1 hora con tres concentraciones diferentes (50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL) de la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. previamente preparada con el objetivo de determinar cuál de ellas posee la actividad benéfica deseada. Estas concentraciones fueron seleccionadas por corresponder a las mayores concentraciones posibles, teniendo en cuenta la infusión madre (250 mg/mL) y el volumen de gusanos y tampón en el eppendorf (3 eppendorfs para cada concentración usada). También fue usado un control conteniendo 200mg/mL de la infusión para demostrar que el *R. officinalis* L. por sí solo no resulta dañino para el nematodo.

Para esta exposición, aproximadamente 2000 gusanos fueron colocados en microtubos (eppendorfs) conteniendo tampón M9 y la infusión en cuestión o agua destilada para el control, completando así 500 μL de solución. Una vez completado el tiempo de pre-tratamiento, los gusanos fueron lavados tres veces con tampón M9 y pasaron a ser expuestos a la luz UV durante 15 minutos (Figura 5). Procedimiento realizado tres veces para garantizar resultados certeros y minimizar los efectos del azar.

Figura 5 – Tratamiento con Infusión previa a la exposición a la luz UV.



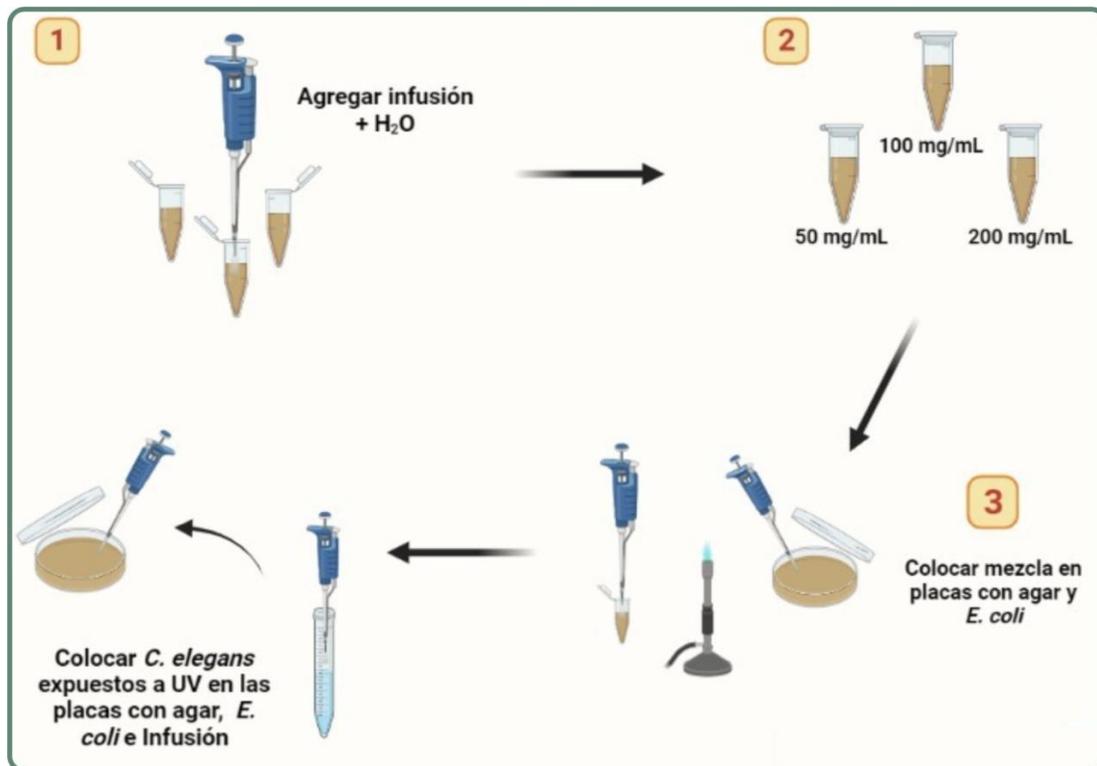
Fuente: de la autora

5.4.2 TRAS LA EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.

Han sido probadas tres concentraciones de la infusión de *Rosmarinus officinalis L.* con el objetivo de determinar cuál de ellas posee mayor efecto benéfico sobre una previa exposición a la luz ultravioleta. Para eso, fueron usadas las placas con medio NGM y *E. coli* previamente preparadas y en ellas fueron colocados 400 μL de agua para el control o 400 μL de las concentraciones de infusión seleccionadas: 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL, concentraciones también correspondientes a las más altas

posibles. Luego esas placas se dejaron secar y luego aproximadamente 100 gusanos L1 ya expuestos a la luz UV fueron colocados en ellas (Figura 6). Todo el procedimiento fue realizado en tres ocasiones para garantizar resultados certeros y minimizar los efectos del azar.

Figura 6 – Tratamiento con Infusión posterior a la exposición a la luz UV



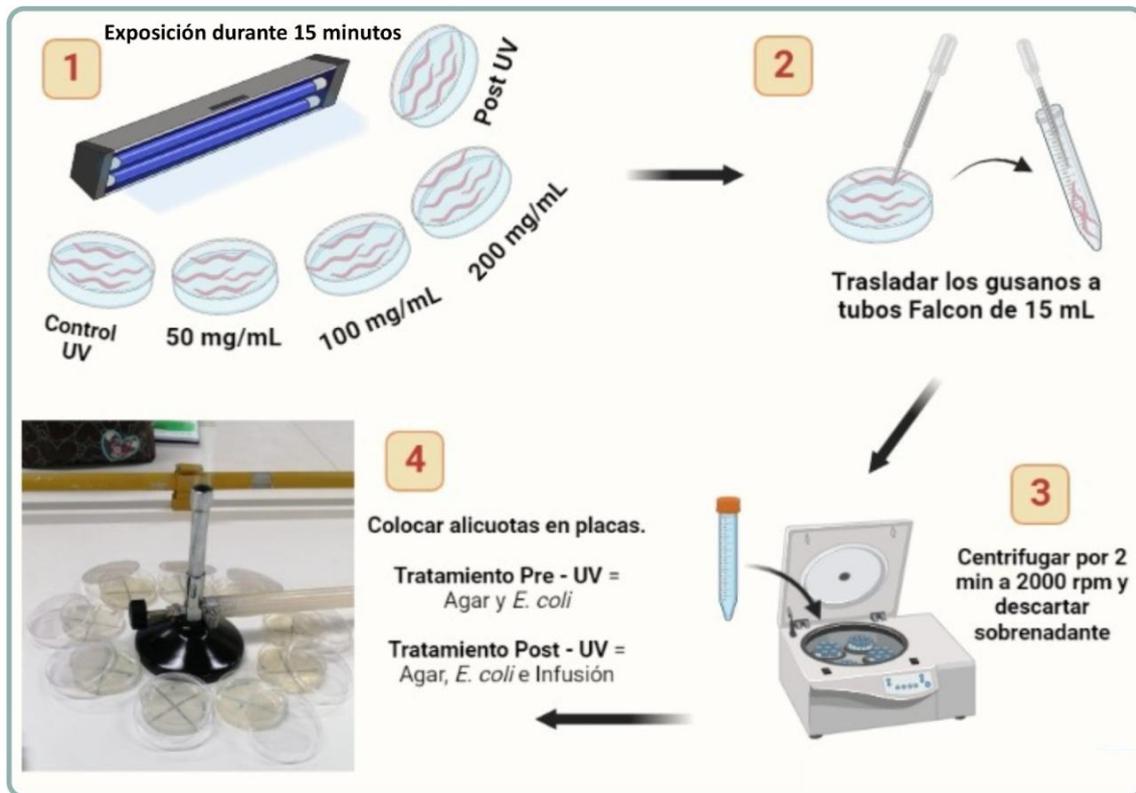
Fuente: de la autora

5.5. EXPOSICIÓN A LA LUZ ULTRAVIOLETA.

Aproximadamente 2000 gusanos fueron expuestos durante 15 minutos a la luz ultravioleta en placas de Petri conteniendo tampón M9 (PRASANTH *et al.*, 2016). La luz UV utilizada fue la de una cámara de flujo laminar disponible en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana (UNILA). Al finalizar la exposición mencionada, los gusanos fueron centrifugados y aproximadamente 100 de ellos fueron colocados tanto en las placas de Petri con agar y *E. coli* como en placas con agar, *E. coli* junto con las concentraciones de *R. officinalis* y fueron incubados por 24 horas a 20°C. Después de las 24 horas mencionadas, se evaluó la letalidad y el desarrollo de todos los gusanos de las placas (Figura 7).

Dicho procedimiento fue una adaptación de un procedimiento realizado por PRASANTH *et al.*, 2016, y fue realizado en tres repeticiones. para garantizar resultados certeros y minimizar los efectos del azar.

Figura 7 – Exposición de *C. elegans* a la luz UV.



Fuente: de la autora

5.6. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LETALIDAD

Una vez cumplidas las 24 horas de incubación, los gusanos fueron clasificados como vivos o muertos, mediante el uso de un microscopio estereoscópico. Los que reaccionaron a un estímulo mecánico con un alambre de platino fueron clasificados como vivos y los que no respondieron a dicho estímulo fueron considerados muertos (ARANTES *et al.*, 2016). Este procedimiento fue realizado en tres ocasiones.

5.7. EVALUACIÓN DEL DESARROLLO LARVAL

La capacidad de un desarrollo normal de los gusanos sobrevivientes fue evaluada cada 24 horas por tres días luego de la exposición a la luz UV y tratamiento con infusión de *Rosmarinus officinalis* L. y fue determinada la etapa larval en que estos se encontraban. Esto fue realizado mediante la observación microscópica del desarrollo de la vulva y la presencia de huevos en el útero al finalizar el tercer día (HIRSH *et al.*, 1976; ARANTES *et al.*, 2016). Este procedimiento fue realizado en tres ocasiones.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 9 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados se representaron como la media \pm SEM (error estándar de la media) de tres experimentos individuales. Se utilizó ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey para comparar grupos. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$ (ARANTES *et al.*, 2016).

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

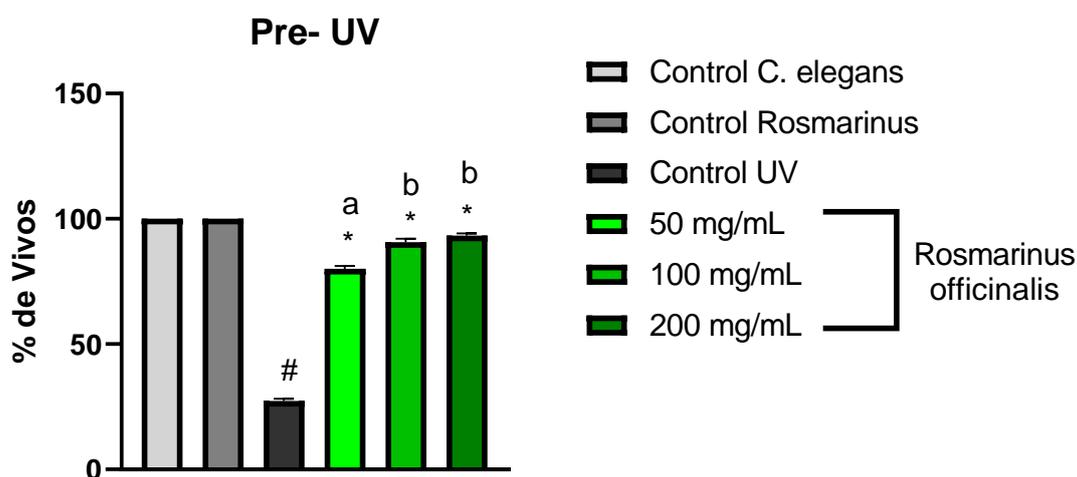
6.1. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS DE LETALIDAD

En este estudio experimental, la exposición a la luz ultravioleta por 15 minutos en gusanos no tratados con la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. (Control UV) indujo una sobrevivencia de solo 27% (Figuras 8 y 9), la cual, se vio aumentada mediante el efecto ejercido por la infusión preparada ya que los gusanos pre-tratados con 50 mg/mL de dicha infusión y luego expuestos a la luz UV demostraron una tasa de sobrevivencia de 80%, mientras que los que fueron tratados con 100 mg/mL y 200 mg/mL de infusión y posteriormente expuestos a la luz UV, resultaron en una tasa de sobrevivencia de 91% y 93%, respectivamente (Figura 8). A su vez, los gusanos que fueron previamente expuestos a la luz UV y posteriormente tratados con 50 mg/mL de la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. demostraron una tasa de sobrevivencia de 66%, mientras que los que fueron previamente expuestos a la luz UV y luego tratados con 100 mg/mL y 200 mg/mL de la infusión, demostraron una tasa de sobrevivencia de 73% y 80% (Figura 9).

Por otro lado, los gusanos llamados de “Control *C. elegans*” y “Control Rosmarinus” mostraron una tasa de sobrevivencia del 100%, pues ninguno de ellos fue sometido a la exposición UV, sólo fueron usados como referencia de sobrevivencia normal, siendo el “Control Rosmarinus” una prueba de que la infusión de *Rosmarinus officinalis* L. en la concentración más alta (200mg/mL) por sí sola no produce ningún efecto dañino que pueda afectar la sobrevivencia de las larvas (Figuras 8 y 9). Esto nos demuestra que la cepa de gusanos utilizados se encontraba en condiciones óptimas de cultivo y darían resultados certeros.

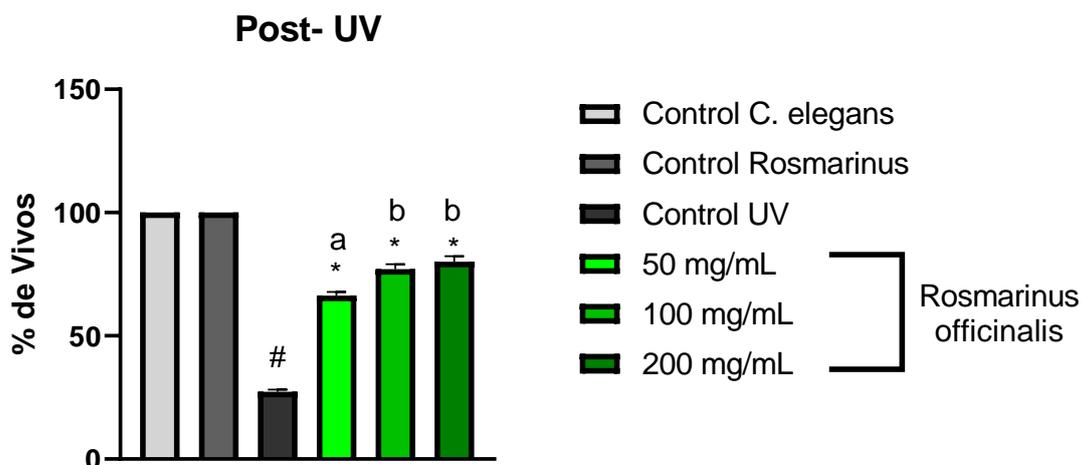
Los análisis de ANOVA unidireccional y la prueba de comparación múltiple de Tukey (Figuras 8 y 9) mostraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de *Rosmarinus officinalis* L. utilizadas, donde se pudo apreciar una diferencia entre la concentración de 50 mg/mL con la de 100 mg/mL, al igual que con la de 200 mg/mL, sin embargo, no hubo ninguna diferencia encontrada entre las concentraciones de 100 mg/mL y 200 mg/mL. Por ende, la concentración con más efectos benéficos sobre los *C. elegans* expuestos fue la de 50 mg/mL.

Figura 8 - Análisis de sobrevivencia en tratamiento con *R. officinalis* L. Pre-UV.



Los datos se informan como porcentaje de gusanos vivos de 100 gusanos por grupo en cada experimento de 3 ensayos independientes. *P <0,05 comparado con el grupo Control UV. # P <0,05 comparados con los grupos Control *C. elegans* y Control *Rosmarinus*. a, b P <0,05 las distintas concentraciones comparadas entre ellas mismas (ANOVA unidireccional).

Figura 9 - Análisis de sobrevivencia en tratamiento con *R. officinalis* L. Post-UV.



Los datos se informan como porcentaje de gusanos vivos de 100 gusanos por grupo en cada experimento de 3 ensayos independientes. *P <0,05 comparado con el grupo Control UV. # P <0,05 comparados con los grupos Control *C. elegans* y Control *Rosmarinus*. a, b P <0,05 las distintas concentraciones comparadas entre ellas mismas.

Está demostrado que una breve exposición a las radiaciones UV causan daños en el ADN, debido a que estas radiaciones tienen la capacidad de perturbar a las biomoléculas, como las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (ANWAR *et al.*, 2016). También, mediante las radiaciones UVB, podrían existir elementos transponibles crípticos que conllevarían a mutaciones (SHINDELL *et al.*, 1998). Se han llevado a cabo estudios en ratones del tipo “nude” donde se evidencia que la exposición a la radiación UVA en la piel de dichos ratones causa una palidez en la piel, la cual conlleva a una disminución en el suministro de sangre, finalizando en posterior apoptosis y necrosis (HUNG *et al.* 2015). También MARTIN *et al.* (2008) demostró que una exposición de *Caenorhabditis elegans* a la radiación UVA aceleró el proceso de envejecimiento en los gusanos, de una manera dependiente de la vía de señalización parecida a la insulina.

Diversos estudios comprobaron que las plantas y vegetales poseen polifenoles con la capacidad de prevenir las alteraciones de la piel causadas por la radiación UV (NOBILE *et al.*, 2016), por ejemplo, Zheng *et al.*, (2014) mediante el uso de *Caenorhabditis elegans* pudieron demostrar que los polifenoles totales de la hoja de morera (MLP) retrasaron el envejecimiento, redujeron el almacenamiento de ácidos grasos *in vivo* y aumentaron la resistencia al estrés oxidativo. También, SONANI *et al.*, (2014) estudiaron la

actividad antioxidante de la ficoeritrina ante los efectos del envejecimiento en los *Caenorhabditis elegans* y descubrieron que el suplemento de ficoeritrina empleado aumentó la vida media de los gusanos de aproximadamente 15 días a poco más de 19 días. Y también se vio como resultado una mejora en la tolerancia al estrés oxidativo en gusanos adultos, pues se observó un aumento en la tasa de sobrevivencia media de aproximadamente 30% a 63%. ZAMBERLAN *et al.*, (2016) también reportó que entre los efectos del *Rosmarinus officinalis* L. sobre el *C. elegans* se encuentra el aumento de la resistencia contra el estrés térmico y el estrés oxidativo y una extensión de la longevidad de los *C. elegans* de una manera dependiente de la señalización de insulina/IGF. Esto demuestra la posibilidad de que los compuestos contenidos en las plantas de *Rosmarinus officinalis* L. (ácido carnósico, ácido rosmarínico, ácido betulico, aceites esenciales, entre otros) de nuestro experimento también estén actuando de manera parecida en cuanto al estrés oxidativo en los gusanos. Además, mediante una investigación utilizando un modelo de piel 3D expuesto a una radiación solar simulada, se pudo confirmar que el *Rosmarinus officinalis* L. posee una actividad anti-metaloproteinasa de matriz, (anti-MMP-1), la cual es el principal factor de envejecimiento y fotodaño de la piel, y un efecto protector a nivel morfológico. Gracias a estos resultados concluyeron que el extracto de *Rosmarinus officinalis* L. podría tener la capacidad de prevenir que se liberen citocinas IL1 α e IL6, que participan activamente del aumento de MMPs-1. Esto implica beneficios potenciales para los seres humanos a la hora de buscar una solución para prevenir el fotodaño cutáneo (NOBILE *et al.*, 2016), además de ser benéfico contra las enfermedades como el Alzheimer y la diabetes (ZAMBERLAN *et al.*, 2016).

El *C. elegans* es un gran candidato para la realización de estudios genéticos pues se pueden generar knockdown de genes usando técnicas de ARN de interferencia (ARNi) y los mutantes que presentan la pérdida de función pueden ser producidos mediante mutagénesis dirigida al sitio (ÁVILA *et al.*, 2012). Además, los ensayos toxicológicos realizados en este nematodo brindan datos de un animal metabólicamente activo que posee los mismos sistemas intactos que los mamíferos poseen: sistema sensorial y neuromuscular, sistema digestivo, sistema reproductivo y sistema endócrino (HUNT, 2006).

6.2 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO LARVAL

El desarrollo larval se debería haber analizado cada 24 horas durante 3 días seguidos, sin embargo, no fue posible realizar dicho procedimiento pues los gusanos *C. elegans* expuestos a la luz UV y pre o post tratados con la infusión de *Rosmarinus officinalis L.* se encontraron todos muertos al inicio del segundo día (48 horas), sin embargo en las primeras 24 horas se pudo observar un retraso en el desarrollo de los nematodos sobrevivientes, pues estos se encontraban aún en la etapa L1 siendo que ya deberían haberse desarrollado hasta la etapa L2.

MURAKAMI & JOHNSON (1996) nos dicen que la radiación ultravioleta y sus efectos son dependientes de la dosis administrada al momento de la exposición, también, para poder estudiar la sobrevivencia de los gusanos de *C. elegans* contra la exposición a la radiación UV, se pueden realizar ensayos usando gusanos que se encuentran en distintos estadios larvales, lo que permitirá determinar los efectos específicos de la radiación UV en cada etapa (PARK *et al.*, 2017). PRASANTH *et al.*, (2016) llevaron a cabo un estudio de los efectos de exposición a la radiación UVA usando gusanos de *C. elegans* en etapa de adultos-jóvenes y obtuvieron como resultado una alteración en el comportamiento (movimiento faríngeo y el tamaño de la cría). Considerando estos datos, se podría decir que el daño causado en los gusanos de este experimento fue tan grande que los compuestos del *Rosmarinus officinalis L.* no pudieron revertirlos del todo, pero no sería realmente un problema de la infusión, más bien podría ser la etapa larval de los gusanos que se eligió (L1) para realizar la exposición a la luz UV, pues según KLASS (1977), la sensibilidad de los gusanos ante la radiación UV es menor a medida que el nematodo va envejeciendo. Otro factor podría ser la intensidad de radiación UV empleada en los ensayos, de la cual no se tiene información certera, pues la misma no estaba especificada en la cámara de flujo laminar utilizada.

NOBILE *et al.*, (2016) analizaron los efectos de una combinación de *Rosmarinus officinalis L.* y *Citrus paradisi* ante las consecuencias de la exposición a la radiación UV en la piel de distintos seres humanos y descubrieron la posibilidad de que el mecanismo de acción de los efectos de esa combinación sea mediante la inhibición de las especies

reactivas de oxígeno y de los marcadores inflamatorios, como lo son las citocinas y los lipoperóxidos, al igual que su acción directa sobre las vías de señalización intracelular.

7. CONSIDERACIONES FINALES

- Se observó una tasa de supervivencia muy baja causada por la exposición a la radiación UV en *C. elegans* no tratados con la infusión.
- La tasa de supervivencia aumentó considerablemente con el tratamiento con la infusión de *Rosmarinus officinalis L.*
- Es imprescindible el conocimiento del tipo de radiación ultravioleta que se está aplicando en las exposiciones realizadas.
- La planta de *Rosmarinus officinalis L.* posee compuestos con actividad biológica benéfica para la salud.
- Se hace necesaria la realización de pruebas moleculares para definir los daños de la radiación UV sobre el ADN de las células, al igual que para identificar los compuestos bioactivos de la planta de *Rosmarinus officinalis L.* para su posterior aplicación específica.
- Es necesario mayor tiempo experimental para descubrir una concentración ideal de la infusión de *Rosmarinus officinalis L.*

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUR, Mariem; MATEOS, Raquel; FREDJ, Maha Ben; MTIRAOU, Ali; BRAVO, Laura; SAGUEM, Saad. A Comprehensive Characterisation of Rosemary tea Obtained from *Rosmarinus officinalis* L. Collected in a sub-Humid Area of Tunisia. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 1, p. 87-100, 12 set. 2017.

AKHBARI, M. *et al.*, Optimization of microwave assisted extraction of essential oils from Iranian *Rosmarinus officinalis* L. using RSM. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 2197-2207, mar 2018.

ALMELA, L. *et al.*, Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 2, p. 221-229, jul 2006.

ALTEMIMI, Ammar; LAKHSSASSI, Naoufal; BAHARLOUEI, Azam; WATSON, Dennis G.; LIGHTFOOT, David A. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. **Plants - Basel**, v. 6, n. 42, p. 1-23, 22 set. 2017.

ALTINIER, G. *et al.*, Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1718-1723, mar 2007.

AMARAL, G. *et al.*, Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 48-55. May 2013.

ANDERSEN, S.; SARMA, M.; Protecting the Ozone Layer. **The United Nations History, Earthscan Publicatios Ltd., Virginia**. 2002.

ANGELL, J. K.; KORSHOVER, J. Quasi-Biennial and Long-Term Fluctuations in Total Ozone. **Monthly Weather Review**, v. 101, n. 1, p. 426-443, 2005.

ANWAR, F.; CHAUDHRY, F.; NAZEER, S.; ZAMAN, N.; AZAM, S. Causes of Ozone Layer Depletion and Its Effects on Human: Review. **Atmospheric and Climate Sciences**, v. 6, n. 1, p. 129-134, jan 2016.

ARANTES, Leticia P.; PERES, Tanara V.; CHEN, Pan; CAITO, Samuel W.; ASCHNER, Michael; SOARES, Felix A. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) attenuates methylmercury-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology Research**. 2016.

AVILA, D. *et al.*, The *Caenorhabditis elegans* model as a reliable tool in neurotoxicology. **Human and Experimental Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 236-243, dic 2012.

BACKLEH, M. *et al.*, Enrichment of the glycoalkaloids α -solanine and α chaconine from potato juice by Adsorptive Bubble Separation using a pH gradient. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 12, p. 1042-1044, ago 2004.

BAKIREL, T. *et al.*, *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 64-73, feb 2008.

BARBIERI, J. *et al.*, Deep eutectic solvents applied in the extraction and stabilization of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) phenolic compounds. **Industrial Crops & Products**, v. 144, n. 1, p. 1-8.

BASHEER, A. Effect of alcoholic extract of rosmarinus against some type of enterobacteriaceae. **Tikrit Journal of Pure Science**, v. 23, n. 7, p. 18-21. 2018.

BATTISTA, Bernabé. **Caenorhabditis elegans como modelo para estudiar el metabolismo de colesterol: autofagia y efecto del aceite de kril**. 77 h. Trabajo de final de grado (Licenciatura Biotecnología) - Universidad Nacional de Rosario, 2019

BEAUCHAMP, C. & FRIDOVICH, I., A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 18, p. 4641-4646, 1970.

BEGUM, A. *et al.*, An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 1, p. 61-73, jan 2013.

BELTRAN, K. *et al.*, Synergistic antinociceptive interaction of *Syzygium aromaticum* or *Rosmarinus officinalis* coadministered with ketorolac in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, n. 1, p. 858-864, ago 2017.

BENITEZ, L. & VERBEL, J. *Caenorhabditis elegans*, a Biological Model for Research in Toxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 237, n. 1, p. 1-35, 2016.

BERNEBURG M. *et al.*, Chronically ultraviolet (UV)-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. **Photochemistry and Photobiology**. v. 66, n. 1, p. 271-275, ago 1997.

BERNEBURG M.; KRUTMANN J., Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 1, p. 709-710, 1998.

BINTSIS, T. *et al.*, Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry e a critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 1, p. 637-645, 2000.

BORGES, R. *et al.*, *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, n. 1, p. 1-63, sep 2018.

BRENNER S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 1974, v. 77,

n.1, p. 71-94.

BRENNER, S. The Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics Research**, p. 9-14, 1988.

BYERLY, L.; CASSADA, R. C.; RUSSELL, R. L., The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. **Developmental Biology**, v. 1, n. 5, p. 23-33, jul 1976.

CENTENO, Luz. Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). **Ediciones Universidad de Salamanca**, v. 21, n. 1, p. 105-118, 2002.

CHEN, B. *et al.*, Wiring optimization can relate neuronal structure and function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 1, p. 4723-4728, 2006.

CHRISTENSON, L. J., *et al.*, Incidence of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas in a Population Younger Than 40 Years. **JAMA**. v. 294, n. 6, p. 681-690, ago, 2005.

CORSI, A. A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*. **Analytical Biochemistry**, v. 359, n. 1, p. 1-17, 2006.

DEBARDELEBEN, H.; LOPES, L.; NESSEL, M.; RAIZEN, D., Stress-Induced Sleep After Exposure to Ultraviolet Light Is Promoted by p53 in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 207, n. 2, p. 571-582, oct 2017.

DE GRUIJL, F. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB Radiation. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 15, n. 1, p. 316-320, 2002.

DIAS, P. C.; FOGGIO, M.A.; POSSENTI, A.; CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extracts of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 1, p. 57-62, 2000.

EL-DESOUKY, M. *et al.*, Nephroprotective effect of green tea, rosmarinic acid and rosemary on N-diethylnitrosamine initiated and ferric nitrilotriacetate promoted acute renal toxicity in Wistar rats. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 12, n. 1, p. 98-110, 2019.

ENDO, E. *et al.*, Anti-biofilm activity of *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum* and *Tetradenia riparia* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and synergic interaction with penicillin. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, n. 11, p. 48-54, dic 2018.

FIKRY, Sahar; KHALIL, Noha; SALAMA, Osama. Chemical profiling, biostatic and biocidal dynamics of *Origanum vulgare* L. essential oil. **AMB Express**. v. 9, n. 1, p. 1-10. 2019.

FLORES-VILLA, Emmanuel; SAENZ-GALINDO, Aidé; CASTAÑEDA-FACIO, Adali O.; NARRO-CEPEDES, Rosa I. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su

origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**. Ciudad de México - México, v. 23, n. 1, p. 1-17. 2020.

GANDINI, S. *et al.*, Meta-Analysis of Risk Factors for Cutaneous Melanoma: II. Sun Exposure. **European Journal of Cancer**. v. 41, n. 1, p. 45-60, 2005.

GARCÍA, P.; ROMERO, M., J.; LLANDERAL, A.; CARMEÑO, P.; LAO, M. T.; SEGURA, M. L., Effects of Drought Stress on Biomass, Essential Oil Content, Nutritional Parameters, and Costs of Production in Six Lamiaceae Species. **Water**. v. 11, n. 3, p. 1-12.0. mar. 2019.

GOMES, P. *et al.*, Integrative process to extract chlorophyll and purify rosmarinic acid from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*). **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95; n. 5, p. 1503-1510, ene 2020.

GOUDJIL, Mohamed B.; ZIGHMI, Souad; HAMADA, Djamila; MAHCENE, Zineb; BENCHEIKH, Salah E.; LADJEL, Segni. Biological activities of essential oils extracted from *Thymus capitatus* (Lamiaceae). **South African Journal of Botany**. v. 128, n. 1, p. 274-282. 2020.

HABTEMARIAM, S. The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, n. 2016, 1-14. Ene 2016.

HAMIDPOUR, R. *et al.*, *Rosmarinus officinalis* (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer, Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Treatment. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2017.

HEINRICH, M. *et al.*, Ethnobotany and ethnopharmacology – interdisciplinary links with the historical sciences. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 157-160, sep 2006.

HERRERO, M. *et al.*, Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and *in-vitro* assays. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2512-2520, abr 2010.

HIRSH, D.; OPPENHEIM, D.; KLASS, M. Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. **Developmental Biology**. 1976. v. 49, n. 1, p. 200-219.

HUNG, CHI-FENG *et al.*, Skin aging modulates percutaneous drug absorption: the impact of ultraviolet irradiation and ovariectomy. **AGE**, v. 37, n. 2, p. 1-14, feb 2015.

- HUNT, P. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, may 2016.
- KALETTA T. & HENGARTNER M. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-398, may 2006.
- KARADAG, A., *et al.*, In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. **South African Journal of Botany**, v. 125, n. 1, p. 214-220, sep 2019.
- KARIM, N. *et al.*, Molecular docking and anti-amnesic effects of nepitrin isolated from *Rosmarinus officinalis* on scopolamine-induced memory impairment in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, n. 1, p. 700-709, nov 2017.
- KLASS, Michael. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 6, n. 6, p. 413-429, dic 1977.
- KRUTMANN, J. Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 23, n. 1, p. 22-26, 2000.
- KUO, Irene; How to Protect Your Eyes from UV Damage, **Johns Hopkins Medicine**, disponible en: <https://www.hopkinsmedicine.org/news/articles/how-to-protect-your-eyes-from-uv-damage>. Accesado en: 18/07/2022.
- LEE, K. W. *et al*, Chromatographic Comparison of the UVA Sensitizers Present in Brunescant Cataracts and in Calf Lens Proteins Ascorbylated *in Vitro*. **Experimental Eye Research**. v. 69, n. 4, p. 375-384, 1999.
- LEWIS, James A.; FLEMING, John T. Bacis Culture Methods. EPSTEIN, Henry F.; SHAKES, Diane C. **Methods in Cell Biology**. Prepared under the Auspices of the American Society for Cell Biology. v. 48. Houston – Texas, 1995. p. 3-29.
- LORENZO, J. Las plantas como fuente de compuestos fotoprotectores frente al daño en el ADN producido por la radiación ultravioleta. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 43, n. 168, p. 550-562, set 2019.
- MARTIN, Richard; PIERRARD, Cécile; LEJEUNE, François, HILAIRE, Pascal; BRETON, Lionel; BERNERD, Françoise. Photoprotective effect of a water-soluble extract of *Rosmarinus officinalis* L. against UV-induced matrix metalloproteinase-1 in human dermal fibroblasts and reconstructed skin. **European Journal of Dermatology**. v. 18, n. 2, p. 128-135, abr 2008.
- MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O., Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 291-296, 1999.
- MONTES DE OCA, M., *et al.*, Adherence to inhaled therapies of COPD patients

from seven Latin American countries: The LASSYC study. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. 1-14, nov. 2017.

MUKHERJEE, P. K.; MAITY, N; NEMA, N. K., SARKAR, B. K. Bioactive compounds from natural resources against skin aging. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 64-73, 2011.

MURAKAMI, S.; JOHNSON, T. E., A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 1207-1218, 1996.

NASS, Richard; HALL, David H.; MILLER, David M.; BLAKELY, Randy D. Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, n. 5, p. 3264-3269. 2002.

NASS, Richard; HAMZA, Iqbal. The Nematode *C. elegans* as an Animal Model to Explore Toxicology *In Vivo*: Solid and Axenic Growth Culture Conditions and Compound Exposure Parameters. **Current Protocols in Toxicology**. v. 31, n. 1, p. 1.9.1-1.9.18. 2007.

NASS, R.; MERCHANT, K. M.; RYAN, T. *Caenorhabditis elegans* in Parkinson's disease drug discovery: addressing an unmet medical need. **Molecular Interventions**. v. 8, n. 6, p. 284-293. 2008.

NASS, R.; SETTIVARI, R. S., *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease: a robust genetic system to identify and characterize endogenous and environmental components involved in dopamine neuron degeneration, in Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems. **Elsevier Academic Press**, New York, NY., p 347–360, 2008.

NIETO, G. *et al.*, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. **Medicines**. v. 5, n. 1, p. 1-13. 2018.

NOBILE V., *et al.*, Skin photoprotective and antiageing effects of a combination of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) polyphenols. **Food & Nutrition Research**, v. 60, n. 1, p. 1-15, jul 2016.

ORHAN, I. *et al.*, Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 663-668, may 2008.

OZAROWSKI, M., *et al.*, *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. **Fitoterapia**, v. 91, n. 1, p. 261-271, sep 2013.

PARK, H.; JUNG, Y.; LEE, S., Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and Cells**, v. 40, n. 2, p. 90-99, feb 2017.

PEAK, M. J.; PEAK, J. G.; CARNES, B. A., Induction of direct and indirect

single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 45, n. 3, p. 381-387, 1987.

PEÑA, Zyanya M.; VAZQUEZ, Denia; OLIVO, Luis; TIPACAMU, Gabriela; CARBAJAL, Fausto. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**. Mérida- México. v., 8, n. 3, p., 279-289. 2017.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. *et al.*, Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 136, n. 1, p. 12-18, abril 2014.

PORTA-DE-LA-RIVA, M.; FONTRODONA, L.; CERÓN, J. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. **Journal of Visualized Experiments**, v. 64, n. 1, p. 1-9, oct 2012.

POURZAND, C.; TYRRELL, R. M. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 1, p. 380-390.

PRASANTH, M. *et al.*, Ultraviolet-A triggers photoaging in model nematode *Caenorhabditis elegans* in a DAF-16 dependent pathway. **AGE**, v. 38, n. 27, p. 1-13, feb 2016.

RAVISHANKARA, A. R.; DANIEL, J. S.; PORTMANN, R. W. Nitrous Oxide (N₂O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century. **Science Express**, v. 326, n. 1, p. 123-125, ago 2009.

RIDDLE, D. *et al.*, *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1997.

ROZEMA, J.; BOELEN, P.; BLOKKER, P., Depletion of Stratospheric Ozone over the Antarctic and Arctic: Responses of Plants of Polar Terrestrial Ecosystems to Enhanced UV-B, an Overview. **Environmental Pollution**, v. 137, n. 1, p. 428-442, 2005, abril 2005.

SANCHEZ, F. Consideraciones sobre la capa de ozono y su relación con el cáncer de piel. **Revista Médica de Chile**, v. 134, n. 9, p. 1185-1190, set 2006.

SASIKUMAR, B. Rosemary. **Handbook of Herbs and Spices**. p. 452-468. dic 2012.

SELMI, S. *et al.*, Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil components exhibit anti-hyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects in experimental diabetes. **Pathophysiology**, v. 24, n. 4, p. 297-303, sep 2017.

SHINDELL, D. T. *et al.*, Increased Polar Stratospheric Ozone Losses and Delayed Eventual Recovery Owing to Increasing Greenhouse-Gas Concentration. **Nature**, v. 292, n. 1, p. 589-592, abr 1998.

SINGLETERY, K. W.; NELSHOPPEN, J. M., Inhibition of 7,12-dimethylbenz[*c*]anthracene (DMBA)-induced mammary tumorigenesis and of in vivo formation of mammary DMBA-DNA adducts by rosemary extract. **Cancer Letters**, v. 60, n. 1, p. 169-175.

SIVASAKTHIVEL, T; REDDY, K. K. S. K. Ozono Layer Depletion and Its Effects: A review. **International Journal of Environmental Science and Development**. v. 5, n. 1, p. 30-37, feb 2011.

SMEAL, T. & GUARENTE, L. Mechanisms of cellular senescence. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 7, n. 1, p. 281-287, 1997.

SONANI, R. *et al.*, Phycoerythrin extends life span and health span of *Caenorhabditis elegans*. **AGE**, v. 36, n. 5, p. 1-14, oct 2014.

SOTELO-FELIX, J. *et al.*, Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 145-154, jul 2002.

STEDMAN, D. H., Atomic Chlorine and the Chlorine Monoxide Radical in the Stratosphere: Three in Situ Observations. **Science**, v. 198, n. 4316, p. 501-503, 1981.

STEVANATO, R.; BERTELLE, M.; FABRIS, S. Photoprotective characteristics of natural antioxidant polyphenols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 1, p. 71-77, 2014.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **Wormbook**, v. 11, n. 1, p. 1-11, feb 2006.

THE *C. elegans* SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 1, p. 2012–2018, 1998.

TOPCU, Gulacti & KUSMAN, Tuba. Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease. **Bezmialem Science**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2014.

TUNCER, H. **Utilization of Wild Plants as Medicine, vol. II**. Ankara - Turkey, 1978.

TRALAU, T. *et al.*, Wind of Change Challenges Toxicological Regulators. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1489-1494, nov 2012.

TYRRELL, R. M. *et al.*, Cellular defence against UVA (320-380 nm) and UVB (290-320 nm) radiations. **Photobiology**, 1991.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Ozone Layer Depletion 2010 Assessment**.

URBAN, L. *et al.*, Understanding the physiological effects of UV-C light and

exploiting its agronomic potential before and after harvest. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-11, 2016.

VAN DER LEUN, J. The ozone layer. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 20, n. 1, p. 159-162, 2004.

VANDUYN, Natalia; SETTIVARI, Raja; LEVORA, Jennifer; ZHOU, Shaoyu; UNRINE, Jason; NASS, Richard. The metal transporter SMF-3/DMT-1 mediates aluminum-induced dopamine neuron degeneration. **Journal of Neurochemistry**, 2013, v. 124, n. 1, p. 147-157, 21 nov. 2012.

WANG, D.; LIU, P; XING, X., Pre-treatment with mild UV irradiation increases the resistance of nematode *Caenorhabditis elegans* to toxicity on locomotion behaviors from metal exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 213-222, 2010.

WHITE, J. The anatomy. **The Nematode *Caenorhabditis elegans***. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 81–122, 1988.

XIAO, CHAONI *et al.*, Revealing the Metabonomic Variation of Rosemary Extracts Using ¹H NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10142-10153, sep 2008.

YAMAMOTO, J. *et al.*, Testing various herbs for antithrombotic effect. **Nutrition**, v. 21, n. 5, p. 580-587, may 2005.

ZAMBERLAN, D.C., *et al.*, Rosmarinus officinalis L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 9, p. 1-9, 2016.

ZHANG, J. *et al.*, Screening active ingredients of rosemary based on spectrum-effect relationships between UPLC fingerprint and vasorelaxant activity using three chemometrics. **Journal of Chromatography B**, 2019.

ZHANG, Sihui; BANERJEE, Diya; KUHN; Jeffrey R. Isolation and Culture of Larval Cells from *C. elegans*. **PLoS One**. v. 6, n. 4, p. 1-11. abril 2011.

ZHENG, S. *et al.*, Mulberry leaf polyphenols delay aging and regulate fat metabolism via the germline signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **AGE**, v. 36, n. 6, p. 1-13.

ZORAL, M. *et al.*, Toxicological effects and pharmacokinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract in common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 495, n. 1, p. 955-960. 2018.