EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICOLÓGICO ADVERSO DE TÓPICOS PARA LA ALOPECIA ANDROGÉNICA UTILIZANDO UN MODELO BIOLÓGICO DE *Caenorhabditis elegans*

JUAN CARLOS LOZANO PINEDA

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA EN TOXICOLOGÍA

CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.

2020

EVALUACIÓN DEL EFECTO TOXICOLÓGICO ADVERSO DE TÓPICOS PARA LA ALOPECIA ANDROGÉNICA UTILIZANDO UN MODELO BIOLÓGICO DE *Caenorhabditis elegans*

JUAN CARLOS LOZANO PINEDA

BARBARA JULIA ARROYO SALGADO
DIRECTOR

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DESARROLLADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN TOXICOLOGÍA.

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA
CARTAGENA DE INDIAS D.T. Y C.
2020

NOTA DE APROBACIÓN DEL JURADO

_____

_____

_____

_____

PRESIDENTE DEL JURADO

_____

JURADO

_____

JURADO

CARTAGENA DE INDIAS, 2020

AGRADECIMIENTOS

Al Número UNO.

A mi Esposa y mis Hijas, por el tiempo que les correspondía y me lo cedieron.

A la doctora Bárbara Arroyo, por su irrestricto y generoso apoyo.

Al cuerpo de Docentes de la maestría, por su paciencia y consideración.

A la doctora Miriam Gutiérrez, maestra motivadora.

A Saray Paternina, por su disposición.

A la CURN, por su apoyo Institucional.

DEDICATORIA

A esa Existencia que habita en uno… en todo, y nos mueve a escudriñar la vida.

A mis hermosas mujeres, mi tesoro amado.

A mí amada familia.

1. TABLA DE CONTENIDO

Tabla de contenido

RESUMEN 11
ABSTRACT 11
1. MARCO TEÓRICO 12
1.1. ANTECEDENTES 12
1.2. GENERALIDADES 15
1.2.1. Tratamientos para la alopecia androgénica 15
1.2.2. Minoxidil 17
1.2.3. Estudios Toxicológicos 17
1.2.4. Principales características de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).. 19
1.2.5. Ciclo de Vida 21
1.2.6. C. elegans transgénicos con proteína verde fluorescente (GFP) 23
1.2.7. Utilidad del modelo en medios estuarinos 25
1.2.8. Utilidad del modelo para la identificación de objetivos, detección de drogas y en algunas enfermedades. 27
2. OBJETIVOS 29
2.1. OBJETIVO GENERAL 29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29
3. METODOLOGÍA PROPUESTA 29
3.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN 29
3.2. CEPAS 29
3.2.1. Mantenimiento de nemátodos. 30
3.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES 30
3.4. BIOENSAYOS 31
3.4.1. Ensayo de Letalidad 31
3.4.2. Ensayo de crecimiento 31
3.4.3. Ensayo de acumulación de lípidos con aceite rojo rápido O (qORO). 32
3.4.4. Ensayo de expresión génica 32
3.4.5. Operacionalización de las variables. 33

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 34
3.6. ENSAYOS DE MORTALIDAD 34
3.7. ENSAYO DE CRECIMIENTO 35
3.8. ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS CON ACEITE ROJO RÁPIDO O (QORO) 36
3.9. EXPRESIÓN GÉNICA 38
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS 39
5. CONCLUSIONES 45
6. BIBLIOGRAFÍA 45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de los tópicos utilizados en el estudio. 30
Tabla 2. Operacionalización de las variables 33
Tabla 3. Acumulación lipídica en C. elegans, luego de la exposición a tópicos para la alopecia androgénica. 37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de C. elegans. (Adaptado de Tejeda et al., 2015) 22

Figura 2. Mortalidad de C. elegans expuesto a tópicos para la alopecia androgénica. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05). 34

Figura 3. Longitud corporal de C. elegans expuesto a tópicos para la alopecia androgénica. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05). 36

Figura 4. Fluorescencia relativa de C. elegans transgénicos expuestos a tópicos 1, 2 y 3. a) Fluorescencia relativa de hsp-3. b) Fluorescencia relativa de sod-4. c) fluorescencia relativa de gpx-4. d) fluorescencia relativa de gpx-6. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05). 38

ABREVIATURAS

C. elegans: Caenorhabditis elegans

$CaCl_2$: Cloruro de calcio

DP: Papila dérmica

E. coli: Escherichia coli

GFP: Proteína verde fluorescente

Gpx: Glutatión peroxidasa

GST: Glutatión S transferasa

H_2O_2: Peróxido de hidrógeno

Hsp: Proteína de shock térmico

KCl: Cloruro de potasio

MGN: Medio de crecimiento para nematodos

$MgSO_4$: Sulfato de magnesio

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

Ppm: Partes por millón

q-ORO: Aceite rojo rápido O

ROS: Especies reactivas de oxígeno

Se: Selenio

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Tópicos para la alopecia androgénica son comúnmente utilizados para tratamientos estéticos, donde los residuos de estos mismos son vertidos por desagües sin ningún tipo de tratamiento previo, sin considerar los efectos adversos que esto pueda generar sobre el ambiente marino y terrestre al acumularse en fuentes hídricas, hogar de muchas especies de plantas y animales. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de tres tópicos diferentes para alopecia androgénica que contienen minoxidil, sobre el modelo biológico de *Caenorhabditis elegans*. Para ello se expusieron los nematodos *C. elegans* a diferentes concentraciones con los tópicos (0,01; 0,1; 1; y 10 ppm) y se evaluaron los puntos finales de mortalidad, crecimiento, reproducción, acumulación lipídica y genes relacionados con estrés oxidativo y shock térmico (sod-4, gpx-4, gpx-6, hsp-3). Los resultados mostraron mayores efectos adversos en las concentraciones más altas (1 y 10 ppm), al causar los porcentajes más altos de mortalidad y reducción de la longitud corporal, principalmente en aquellos gusanos expuestos al tópico 3. El estrés oxidativo fue más evidente en los tópicos que presentaron menos aditivos, mostrando sobreexpresión principalmente en los genes sod-4 y gpx-6. Además, la acumulación lipídica fue notoria principalmente en las concentraciones 0,01 y 0,1 ppm. Sin embargo, en todos los tratamientos se observó acumulación lipídica. Lo anterior indica que los tópicos para alopecia androgénica con presencia de minoxidil afectan la vitalidad del nematodo alterando funciones como el crecimiento y el metabolismo de lípidos, además actúan con agentes estresores al causar sobre expresión de genes reguladores de estrés oxidativo. La descarga de estos tópicos al ambiente puede generar un impacto negativo sobre los ecosistemas al afectar la vitalidad de seres vivos como *C. elegans*.

Palabras Clave: Alopecia androgénica, estrés oxidativo, acumulación lipídica, minoxidil, *Caenorhabditis elegans*

ABSTRACT

Topical for androgenic alopecia, they are commonly used for aesthetic treatments, where the residues of these are poured down drains without any prior treatment, without considering the adverse effects that this may generate on the marine and terrestrial environment when accumulating in water sources, home to many species of plants and animals. The objective of this work was to evaluate the effects of three different topics for androgenic alopecia containing minoxidil, on the biological model of *Caenorhabditis elegans*. For this, the *C. elegans* nematodes were exposed to different concentrations with the topics (0.01, 0.1, 1, and 10 ppm) and the end points of mortality, growth, reproduction, lipid accumulation and genes related to stress were evaluated oxidative and thermal shock (sod-4, gpx-4, gpx-6, hsp-3). The results showed greater adverse effects in the highest concentrations (1 and 10 ppm), by causing the highest percentages of mortality and reduction in body length, mainly in those worms exposed to topic 3. Oxidative stress was more evident in the topics that presented less additives, showing overexpression mainly in the sod-4 and gpx-6 genes. Furthermore, lipid accumulation was noticeable mainly at concentrations 0.01 and 0.1 ppm. However, lipid accumulation was observed in all treatments. This indicates that the topics for androgenic alopecia with the presence of minoxidil affect the vitality of the nematode, altering functions such as growth and lipid metabolism, and also act with stressors by causing over-expression of genes that regulate oxidative stress. The discharge of these topics into the environment can have a negative impact on ecosystems by affecting the life of living things like *C. elegans*

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

El minoxidil es una molécula introducida por primera vez como un medicamento antihipertensivo, posteriormente, dado su efecto adverso denominado la hipertricosis, encamino su uso como formulación tópica para el crecimiento del cabello, en especial como tratamiento de la alopecia androgénica y otros tratamientos fuera de etiqueta para otras afecciones de pérdida de cabello (Messenger y Rundegren, 2004).

Sus efectos biológicos han sido estudiados por varios autores, entre los que destacan: la hipertricosis, el aumento del intervalo anágeno en humanos, específicamente la prolongación de la fase anágena en la papila dérmica, al inducir la actividad de β-catenina y estimular la proliferación y diferenciación folicular (Messenger y Rundegren, 2004). Otros estudios realizados por histología, reportan un aumento en el tamaño del folículo y el porcentaje de folículo anágeno (Abell, 1988). Por otra parte, estudios de velocimetria laser Doppler indicaron que el minoxidil puede tener efectos vasculares.

Estudios de microscopia electrónica con minoxidil al 4% mostraron un aumento de la fenestración en la pared capilar folicular alrededor de los bulbos anágenos y que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células de la papila dérmica (DP) regula la vascularización perifolicular, ya que aumenta notablemente durante la fase anágena y disminuye durante el catágeno y fases telógenas (Lachgar *et al.*, 1998; Yano, Brown y Detmar, 2001).

Por otra parte, el minoxidil también ha sido implicado en el aumento de la expresión de ARNm de VEGF de una manera dependiente de la dosis, donde la expresión de ARNm de VEGF aumento seis veces con la aplicación de minoxidil (Yum *et al.*, 2018).

Estudios realizados por Michelet y colaboradores también mostraron el efecto del minoxidil sobre la producción de prostaglandina E2 al activar el endoperóxido sintetasa 123 de protaglandina, y mejora la expresión del receptor de prostaglandina E2, el gen diana con mayor regulación en la via de β-catenina de las células DP, de

este modo permite que los folículos capilares crezcan continuamente y mantiene la fase anágena (Kvedar, Baden y Levine, 1988; Michelet *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2010)

Los ensayos clínicos en pacientes con alopecia androgénica tratados con minoxidil al 2% o al 5% mostraron un aumento notable en el crecimiento del cabello y una disminución en la pérdida de cabello, y se evidenciaron resultados superiores con la formulación del 5% (Price, Menefee y Strauss, 1999; Olsen *et al.*, 2002).

Ha sido informado, además, que la solución tópica de minoxidil al 2% aumenta el diámetro, la rigidez y el flujo arterial al pene. Como resultado, se ha sugerido como un posible tratamiento para la disfunción eréctil. Un total de 21 pacientes recibieron minoxidil al 2% para el tratamiento de la disfunción eréctil con instrucciones de aplicar 1 cc de la solución lentamente sobre el glande del pene 20 minutos antes del coito. La edad promedio del paciente fue de 52.5 años (rango de 29 a 65 años). La etiología de la impotencia fue neurogénica en 8 pacientes, vascular en 7, psicógena en 4 y otras causas en 2. Dos pacientes también tenían evidencia clínica de incompetencia venosa y 4 eran diabéticos. Un paciente con impotencia psicógena notó una mejoría en la duración de la erección, pero no aumentó la rigidez o el tamaño después de la aplicación de minoxidil. Un paciente con impotencia después de la escisión de la placa de Peyronie informó una erección rígida adecuada para el coito después de usar minoxidil. Posteriormente, este paciente logró erecciones sin usar minoxidil. Los 19 pacientes restantes no mejoraron la rigidez eréctil o la capacidad de obtener o mantener una erección. Un paciente notó algo de ardor leve en el pene del glande después de aplicar el minoxidil. No se observaron otros efectos secundarios en ningún paciente. Estos resultados indican que la solución tópica de minoxidil al 2% no es efectiva cuando se aplica al pene en el tratamiento de la disfunción eréctil. Es posible que una concentración más alta, un medio de suministro diferente o una composición

química diferente pueda producir mejores resultados (Radomski, Herschorn y Rangaswamy, 1994).

Por otra parte, muy poco se sabe acerca de los efectos adversos que estas terapias pueden ocasionar a nivel sistémico en los individuos que se someten a esta variedad de tratamientos. Entre los efectos adversos publicados están aquellos efectos secundarios después de la aplicación, el más común es la dermatitis de contacto irritante con los síntomas de picazón y descamación, dermatitis alérgica debida probablemente a los vehículos que lo acompañan (Messenger y Rundegren, 2004). Una revisión reciente indica que los beneficios de la medicación oral no son suficientes para justificar la exposición al riesgo de posibles efectos secundarios (Suchonwanit, Thammarucha y Leerunyakul, 2019).

A pesar de su aceptación mundial durante más de 30 años, el mecanismo subyacente de los efectos del minoxidil que promueven el crecimiento del cabello y otros efectos aún no se ha aclarado por completo. Es importante la búsqueda de su acción farmacológica, el mecanismo de acción, la eficacia clínica y los eventos adversos del minoxidil tópico entre otros (Suchonwanit, Thammarucha y Leerunyakul, 2019).

1.2. GENERALIDADES

1.2.1. Tratamientos para la alopecia androgénica

La alopecia es una afección dermatológica con opciones terapéuticas limitadas. La FDA sólo aprobó dos medicamentos, el finasteride y el minoxidil, para el tratamiento de la alopecia. Sin embargo, se sabe poco sobre las diferencias en los efectos adversos entre estos dos medicamentos. Según los informes clínicos presentados al Sistema de notificación de eventos adversos de la FDA (FAERS) de 2004 a 2014,

para las mujeres y los hombres, se descubrió que el finasteride está más asociado con la toxicidad para la reproducción en comparación con el minoxidil. A pesar de que la alopecia masculina, el finasteride es más significativa en la disfunción sexual, daños al feto y trastorno dentro del útero, altera vías relacionadas con la señalización de hormonas sexuales y la maduración de los ovocitos. Estos hallazgos podrían proporcionar pistas para la investigación toxicológica posterior. Algunos de estos efectos adversos aún no se han advertido en la etiqueta del medicamento aprobado por la FDA. Esta información puede ayudar a mejorar el régimen de tratamiento de la alopecia y la regulación posterior a la comercialización de los productos farmacéuticos (Wu, Yu y Li, 2016).

En la literatura ha sido reportado varios efectos adversos alrededor del minoxidil en pacientes masculinos que presentan anorexia e hipertensión. Los efectos secundarios asociados con finasterida oral (FT) (1 mg / d) y tópico 5% minoxidil (M5) se han descrito previamente. Los autores evaluaron los efectos adversos a largo plazo y las causas de retirada del tratamiento a largo plazo en pacientes con alopecia androgénica (AGA) tratados con M5 + FT versus M5 sin FT. Un total de 130 pacientes con AGA con un mínimo de 2 años de seguimiento se ofrecieron como voluntarios para completar un cuestionario sobre los efectos secundarios. Las respuestas de los pacientes se clasificaron como "nunca", "raramente", "a veces", "a menudo" y "todo el tiempo". Se consideró un efecto adverso en presencia de una respuesta "a menudo" o "todo el tiempo". Un total de 100 pacientes recibieron M5 + FT combinado y se compararon con 30 pacientes que recibieron M5 de terapia única de acuerdo con los criterios clínicos del médico. La disfunción eréctil (3%), la disminución de la libido (4%) y la reducción de la eyaculación (7%) estaban presentes en pacientes que tomaban M5 + FT, pero estaban ausentes en pacientes que tomaban M5. Solo 1 de 100 pacientes que tomaron M5 + FT abandonaron el

tratamiento a largo plazo debido a los efectos adversos sexuales (disminución de la libido). Las principales causas de retirada de la terapia en el grupo FT fueron la falta de resultados positivos en el 11% y los efectos secundarios del grupo M5 en el 4% (p <0,02). El aumento del vello corporal fue diferente entre los grupos: con 6.6% en el grupo M5 y 4% en el grupo M5 + FT (P <.03). FT demuestra razones sin relación sexual como la principal causa de abstinencia del tratamiento en pacientes con AGA tratados a largo plazo (Perez-Mora, Velasco y Bermúdez, 2015).

1.2.2. Minoxidil

Minoxidil (2,4-diamino-6- (piperidin-1'-il) pirimidina N (3) -óxido; CASRN 38304-91-5), es una molécula bioactiva con varios grupos nitrosables ampliamente utilizado como un antihipertensivo y antialopecia agente (González-Jiménez et al., 2011).

Desde el punto de vista farmacológico, el minoxidil oral es metabolizado a través del hígado mediante conjugación con ácido glucorónico. Este es excretado a través de los riñones de 3 a 4 horas después de la administración, pero la propiedad de vasodilatación puede persistir hasta 72 horas (Campese, 1981).

Entre los efectos adversos graves más relevante se incluyen la retención de sodio y líquidos lo cual un aumento del peso corporal y, en casos graves, puede producir insuficiencia cardiaca congestiva. Por otra parte, ha sido asociado a hipertensión pulmonar y el alto gasto cardíaco del minoxidil, se relaciona con dolor de cabeza pulsátil ocasional, picazón en los ojos, erupciones cutáneas como erupciones ampollosas y polimenorrea (Earhart *et al.*, 1977; Lowenthal y Affrime, 1980). También puede causar enfermedad cardiaca isquémica, que podría deberse a una mayor demanda de oxigeno como frecuencia cardiaca y salida cardiaca aumentada (Gogtay y Panda, 2009).

1.2.3. Estudios Toxicológicos

Durante mucho tiempo, el hombre ha tratado con enfermedades e incapacidades como la esterilidad, osteoporosis, envejecimiento e impotencia sexual que afectan su desarrollo sociocultural. Una de sus preocupaciones más importantes es los últimos reportes que asocian en un 50% de los casos de esterilidad atribuidos al hombre, expuesto frecuentemente a contaminantes y tóxicos que promueven su esterilidad e impotencia sexual (Manfo, Nantia y Mathur, 2015).

Varios estudios han puesto su interés en determinar las causas biológicas del envejecimiento, así como los factores externos que también influyen en el aceleramiento de este, ya que representa el principal factor de riesgo para muchas enfermedades crónicas no trasmisibles (Gao *et al.*, 2018).

Se han encaminado muchos de los trabajos científicos y académicos a conocer la biología y dar solución a la esterilidad, impotencia sexual, envejecimiento y enfermedades crónicas no transmisibles; por ello se ha acudido a modelos animales, los cuales le permiten verificar la eficacia o invalidez de un producto antes de ser aplicado en humanos (Gao *et al.*, 2018). En modelos animales que utilizan los roedores, tales como ratón, estos estudios suelen ser costosos, dado el mantenimiento, principalmente, y porque su ciclo de vida puede durar hasta dos años. Por ello se hace necesario el uso de modelos animales con ciclos de vidas menos complejos que permitan obtener resultados en el menor tiempo posible (Tejeda *et al.*, 2015).

El minoxidil es un medicamento común útil en problemas relacionados con la pérdida de cabello, y proporciona beneficios a pacientes con trastornos del cabello. Sin embargo, hasta la fecha, la FDA lo ha aprobado solo para la alopecia androgenica; pero su uso por fuera de etiqueta para tratar varios trastornos del cabello, así como para aumentar el crecimiento del vello corporal. Aunque el

minoxidil tópico se considera una opción de tratamiento efectiva y segura para varios trastornos del cabello, se necesitan datos adicionales basados en evidencia para algunas aplicaciones y el daño que el ocasiona al ambiente y a los medios acuáticos donde es vertido por parte de los usuarios.

1.2.4. Principales características de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

El gusano nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*, coloniza hábitats ricos en microorganismo como suelos con abundante materia vegetal en descomposición, siendo su principal fuente alimenticia las bacterias. Se encuentra distribuido por todo el mundo, predominantemente en áreas templadas húmedas (Dirksen *et al.*, 2016). En 1965 fue propuesto como organismo modelo por Sydney Brenner y se ha relacionado con descubrimientos biológicos en las últimas dos décadas (Andersen *et al.*, 2012). Entre los años 1970 y 1980, con ayuda de microscopía electrónica se logró caracterizar la línea celular completa de este nematodo, desde el huevo fecundado hasta el adulto (Sulston *et al.*, 1983), finalmente la reconstrucción del sistema nervioso de *C. elegans* y los datos genéticos y genómicos han consolidado a este organismo como una herramienta eficaz para el descubrimiento y caracterización funcional de genes eucariotas (Tejeda *et al.*, 2015).

El cuerpo de un adulto de *C. elegans* tiene forma de cilindro no segmentado que se estrecha en los extremos con un plan corporal compuesto por un tubo externo, un espacio pseudocelmico y un tubo interno. Mide aproximadamente un 1mm de longitud y es transparente lo que permite la visualización de todos los tipos de células en sus distintas etapas de desarrollo (Altun y Hall, 2012).

El núcleo de cada célula de *C. elegans* contiene 5 pares de cromosomas autosómicos y un par sexual. La mayoría de los individuos son hermafroditas con cromosomas sexuales XX y poseen dos ovarios, un oviducto, una cavidad para almacenar esperma, llamada espermateca y un útero, estos hermafroditas se reproducen por autofecundación y no pueden fertilizar a otros hermafroditas. Por otra parte, los machos, con cromosomas sexuales XO, surgen con baja frecuencia (0,3 %) y tienen la capacidad de fertilizar a hermafroditas, este cruce aumenta la frecuencia en la que aparecen los machos en la población a 50%. La auto-fertilización de la hermafrodita garantiza una progenie genéticamente idéntica, mientras que el apareamiento masculino facilita el aislamiento y el mantenimiento de cepas mutantes (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015).

A pesar de su tamaño pequeño *C. elegans* cuenta con órganos y sistemas bien definidos, tales como los sistemas epitelial, nervioso, excretor muscular, alimenticio y reproductivo. El sistema nervioso es el más complejo compuesto por 302 células organizadas y distribuidas en ganglios, principalmente en la cabeza y la cola. Estos órganos y sistemas le permiten contar con un amplio repertorio de comportamientos que incluye locomoción, alimentación, defecación, puesta de huevos, respuestas sensoriales al tacto, olfato, gusto y temperatura; también presenta algunos comportamientos complejos como apareamiento, comportamiento social, aprendizaje y memoria (Dirksen *et al.*, 2016).

Las características biológicas y bioquímicas del nematodo *C. elegans* lo hacen adecuado como modelo para diversidad de estudios. El ciclo de vida de este nemátodo es de aproximadamente tres días, es capaz de autofecundarse y su progenie se encuentra entre 200 y 300 crías, por lo cual su mantenimiento en el laboratorio es económico. La genética de este organismo está muy bien establecida al encontrarse su genoma completamente secuenciado y se conoce a detalle su linaje celular completo (Frézal y Félix, 2015).

La trasparencia del cuerpo de este nematodo es otra ventaja que ha permitido que proteínas transgénicas utilizadas como marcadores fluorescentes, sean visibles en experimentos *in vivo* (Corsi, Wightman y Chalfie, 2015). *C. elegans* es ideal para estudios de mecanismos moleculares, ya que pueden ser manipulados genéticamente con facilidad, esto ha permitido el desarrollo de miles de mutantes y bibliotecas de ARN de interferencia (ARNi), utilizados para silenciar la expresión de genes específicos e inferir su efecto (García-Sancho, 2012).

La cepa de *C. elegans* más ampliamente utilizada es N2 Bristol Wilde-type, ya que es fácilmente cultivable en el laboratorio utilizando platos o cajas de Petri que contengan medio de crecimiento para nematodos (MGN), compuesto por NaCl, agar, peptona, Colesterol, K3PO4, KH2PO4, K2HPO4 y MgSO4. También se utiliza el medio K, al cual se le adiciona KCl. Este medio está disponible en agar o líquido. El medio K líquido, es también utilizado para trasferir los gusanos a platos frescos y para realizar distintos ensayos. A los platos también se le adiciona la bacteria *Escherichia coli* OP50, como fuente de alimento para los nematodos, ya que al igual que el nematodo a esta cepa bacteriana es ampliamente conocido, desde sus rutas metabólicas hasta su genoma completo (Parada Ferro, Gualteros Bustos y Sánchez Mora, 2017).

1.2.5. Ciclo de Vida

C. elegans atraviesa diferentes estadios de desarrollo: embrionario, cuatro estadios larvarios y adulto. El final de cada etapa larval está marcado por una muda, donde se sintetiza una nueva cutícula específica para cada etapa (*Figura 1*) (Altun y Hall, 2012).

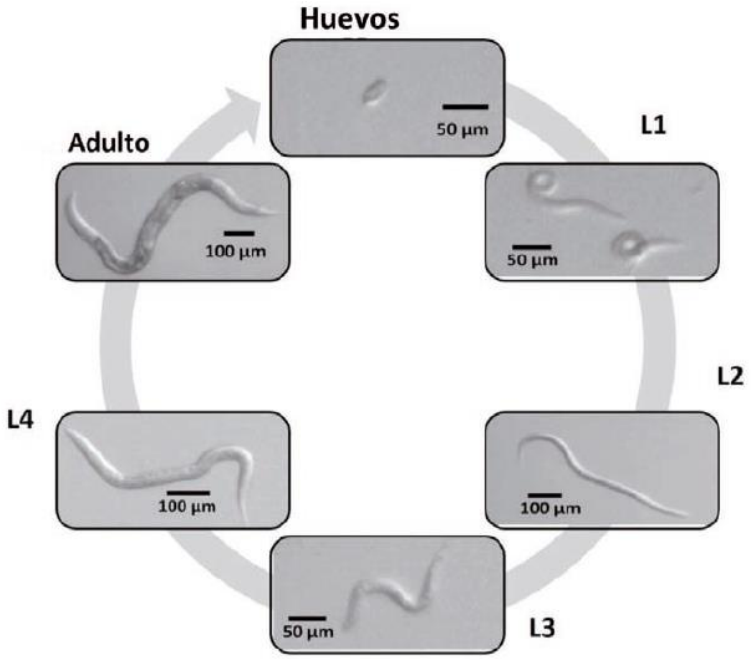


Figura 1. *Ciclo de vida de C. elegans. (Adaptado de Tejeda et al., 2015)*

La embriogénesis se divide en dos etapas: proliferación y organogénesis. La primera ocurre entre los 0 y 350 minutos después de la fecundación, abarca desde las primeras divisiones hasta la formación de las tres capas germinales. La organogénesis o morfogénesis ocurre entre las 6 y 14 horas después de la fecundación y se caracteriza por la elongación del embrión y el inicio de la diferenciación de órganos (Altun y Hall, 2012).

Los estadios larvales del nematodo *C. elegans*, van desde L1 hasta L4. El estadio L1 cuenta con 550 células, luego de que 113 mueran por apoptosis. Durante el resto de los estadios ocurre el desarrollo de los sistemas, nerviosos y reproductivo, donde a partir de la etapa L4, los nematodos hermafroditas son capaces de producir espermatozoos. El adulto maduro cuenta con exactamente 959 células, es fértil sólo durante 4 días, luego puede vivir entre 10 y 15 días. Durante sus días fértiles un adulto hermafrodita coloca entre 200 y 300 huevos con intervalos entre puestas de 20 minutos. El ciclo de vida en general es dependiente de la temperatura de

incubación, es decir, los organismos adultos pueden encontrarse entre las 47 y 90 horas, después de la fecundación, dependiendo de la temperatura (García-Sancho, 2012).

Cuando las condiciones ambientales son adversas, como escasez de alimentos, altas temperaturas o grandes densidades de población, es poco probable que ocurra una reproducción exitosa. Para este caso el nematodo *C. elegans* detiene su desarrollo en una etapa L2 alterna llamada fase dauer o larva dauer, caracterizada por el aumento de resistencia de la cutícula y falta de alimentación. Una vez las condiciones de vida son nuevamente favorables, los animales pueden volver a entrar al ciclo de vida reproductivo (Tejeda *et al.*, 2015).

1.2.6. C. elegans transgénicos con proteína verde fluorescente (GFP)

La proteína verde fluorescente es una herramienta popular para ensayos de expresión génica, puesto que es fácil de introducir como marcador genéticamente modificado y puede ser usado en un animal vivo sin necesidad de una preparación de muestra extensa. En consecuencia, las proteínas verdes fluorescentes han surgido como el método de elección para estudiar la expresión génica en *C. elegans*, además, las construcciones informadas para muchos genes están disponibles actualmente (Hutter, 2012). Una de las construcciones más utilizadas son las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y shock térmico, dentro de las que destacan las enzimas SOD, GPx y HSP (Tejeda *et al.*, 2015).

1.2.6.1. Superóxido dismutasa (SOD)

En mamíferos la enzima SOD es la encargada de catalizar la dismutación del radical superóxido a H_2O_2 que posteriormente puede ser transformado a agua por la acción de otras enzimas, dichos radicales se producen naturalmente en la cadena transportadora de electrones. SOD es la única enzima que puede detoxificar el

anión superóxido y está presente tanto a nivel mitocondrial como en el citoplasma y el espacio extracelular. Para cada compartimento celular mencionado existe una isoforma de la enzima. De manera similar a los mamíferos, en *C. elegans* existen seis isoformas de SOD localizadas en diferentes compartimentos celulares. Es uno de los sistemas antioxidantes más importantes en la célula, sin embargo, una baja actividad de las mismas no siempre se relaciona con alguna patología, mientras que una alta actividad tampoco puede considerarse necesariamente como un fenómeno positivo (Delgado-Ciruelos, 2015).

1.2.6.2. Glutatión peroxidasa (GPx)

Se encuentra localizada en el citosol y la mitocondria catalizando la reducción de H_2O_2 a agua utilizando glutatión como donador de electrones. Su importancia reside en que es considerada como el principal sistema antioxidante en niveles bajos de estrés oxidativo (Benner, Daniel y Spanier, 2011). Las distintas isoformas se pueden clasificar en dependientes e independientes de Se. La forma independiente de Se, también conocida como glutatión-S-transferasa (GST), cataliza la destoxificación de varios xenobióticos, y en este caso el átomo de Se no participa en la reacción catalítica. La isoforma dependiente de Se, también conocida como GPx dependiente de Se, está compuesta por cuatro subunidades, y cada subunidad contiene un átomo de Se en el centro activo unido al aminoácido cisteína. En *C. elegans,* de la misma forma que en humanos, existen diversos genes que codifican para GPx (*gpx-1* a *gpx-8*) (Delgado-Ciruelos, 2015).

1.2.6.3. Proteínas de shock térmico (HSP)

También son conocidas como chaperonas moleculares sensibles a estrés y están altamente conservadas evolutivamente. Se encuentran ubicuamente en compartimentos subcelulares, células y tejidos, siendo esenciales para la estabilidad del proteoma en condiciones estresantes. La expresión de muchas

chaperonas moleculares está regulada por tensiones ambientales y fisiológicas que pueden interferir con la estabilidad del plegamiento, lo que conduce a un flujo de proteínas mal plegadas. Las proteínas HSP se clasifican en familias según su masa molecular en Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 y pequeñas Hsps (sHsps).

Los HSP ejercen su efecto fisiológico ayudando a la formación de nuevas proteínas y preservando las estructuras existentes. Sin embargo, también muestran funciones importantes en condiciones patológicas, especialmente a través de la rectificación estructural de proteínas desnaturalizadas y la solubilización de agregados de proteínas que las transportan al sistema de proteasoma (Avila *et al.*, 2016).

1.2.7. Utilidad del modelo en medios estuarinos

Para estudiar el estado de la calidad del agua en los ríos, ha sido muy relevante la determinación del estado de la misma; con el fin de establecer una política de gestión sostenible del agua. Por esta razón, ha sido recomendado la realización de múltiples evaluaciones integradas del agua que incluyen cantidades de agua y pruebas fisicoquímicas, ecológicas y toxicológicas. Sin embargo, la realización de estos exámenes en recursos hídricos son limitados y no es posible realizar determinaciones químicas de contaminantes a gran escala o realizar numerosas pruebas ecotoxicológicas (Clavijo *et al.*, 2016).

Otro estudio muy particular estableció el monitoreo de cambios en la calidad del agua desde el lugar de origen hasta el final del recorrido y el agua del grifo en dos plantas de tratamiento de agua potable convencionales utilizando ensayos de toxicidad con *Caenorhabditis elegans* y la técnica de matrices de emisión de excitación de fluorescencia. A partir de los resultados se concluyó que ambas aguas muestreadas mostraron un potencial letal, genotóxico y reprotóxico; esto indica que es útil recurrir a ensayos de biotoxicidad y espectroscopía de fluorescencia como

herramientas para complementar la evaluación de rutina del agua potable (Han *et al.*, 2020).

Tejeda y colaboradores en 2016, utilizaron este modelo para la evaluación del riesgo ecológico de sedimentos conteniendo metales y HAP y demostraron que los diferentes tipos de eliminación de desechos en el río Magdalena, como resultado de actividades mineras, domésticas, agrícolas e industriales, incorporan contaminantes tóxicos en los sedimentos, que son capaces de generar una respuesta tóxica en *C. elegans* (Tejeda-Benitez *et al.*, 2016).

Otro estudio utilizó bisfenol A, propil parabenos, triclosán presentes en antisépticos desinfectantes o aditivos como modelo biológico para evaluar los efectos tóxicos sobre *Caenorhabditis elegans* y concluyeron que se indujo la expresión de ARNm de genes relacionados con el estrés celular, el control de especies reactivas de oxígeno y la activación del receptor nuclear. Así como fue acotada la acumulación de lípidos en los nemátodos expuestos. Concluyendo que estos productos alteran la fisiología del crecimiento, la acumulación de lípidos y la reproducción en C. elegans, muy probablemente a través de mecanismos de estrés oxidativo (García-Espiñeira, Tejeda-Benítez y Olivero-Verbel, 2018).

Estudios para evaluar triclosán (TCS) y triclocarbán (TCC) utilizados como antimicrobianos en productos para el hogar y el cuidado personal, los cuales ha generado preocupaciones sobre su riesgo para la salud humana y el impacto ambiental.

Fue utilizado un modelo biológico de *Caenorhabditis elegans* utilizando puntos finales desde los niveles organismal a molecular, incluyendo letalidad, reproducción, vida útil, eclosión, toxicidad de la línea germinal y estrés oxidativo. Ambos productos mostraron mostraron toxicidad aguda para *C. elegans*, además de inducir una reducción dependiente de la concentración en la reproducción del gusano, la vida

útil y el retraso en la eclosión. Estos autores también realizaron estudios utilizando la cepa transgénica DAF-16: GFP, encontramos que ambos compuestos indujeron estrés oxidativo en el gusano, indicado por la relocalización de DAF-16: GFP del citoplasma al núcleo tras la exposición. La toxicidad de la línea germinal de los dos compuestos también se demostró usando una cepa transgénica xol-1: GFP. Estos resultados demostraron que ambos productos inducen efectos tóxicos sistémicos en *C. elegans* (Lenz, Pattison y Ma, 2017).

C. elegans es un organismo ubicuo útil para la investigación de toxicología acuática y del suelo. Un estudio realizado en Argentina, lo utilizó para la evaluación integrada de la calidad del agua, utilizando el bioensayo toxicológico *C. elegans*. Ahí se determinó parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos. Los bioensayos ayudaron a identificar diferentes calidades de agua en la cuenca del río. La respuesta al crecimiento de *C. elegans*, demostró que los bioensayos ecotoxicológicos son importantes para obtener un escenario realista de amenazas a la calidad del agua. Estos resultados confirman que el bioensayo de *C. elegans* es una herramienta sensata y adecuada para evaluar la toxicidad y debe implementarse en el monitoreo de calidad del agua de rutina (Peralta-Mocha y Cango-Diaz, 2017).

1.2.8. Utilidad del modelo para la identificación de objetivos, detección de drogas y en algunas enfermedades.

Caenorhabditis elegans como organismo modelo de utilidad científica y se ha convertido en un poderoso sistema modelo genético en toxicología genética y biomedicina, permitiendo la investigación rápida y eficaz de enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento y análisis de drogas (Honnen, 2017).

El plegamiento y la agregación de proteínas son características patológicas clave en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis lateral

amiotrófica. Los modelos animales, incluido *C. elegans*, se han utilizado ampliamente para descubrir y validar nuevos fármacos contra las enfermedades neurodegenerativas. El sistema nervioso bien definido y genéticamente manejable de *C. elegans* ofrece un modelo efectivo para explorar las vías mecanicistas básicas de las enfermedades neurodegenerativas. El progreso reciente en la detección de drogas de alto rendimiento también proporciona un enfoque poderoso para identificar moduladores químicos de procesos biológicos, para lo cual *C. elegans* representa un excelente modelo (Ma *et al.*, 2018).

Una de las tareas más desafiantes en la exploración del antienvejecimiento es descubrir medicamentos que puedan promover la longevidad y retrasar la incidencia de enfermedades humanas relacionadas con la edad. Hasta la fecha, se ha descubierto que varios medicamentos, incluidos algunos antioxidantes, metabolitos y compuestos sintéticos, que han permitido prolongar la vida útil de *C. elegans*,. (Liu *et al.*, 2016).

Por otra parte, otros han utilizado fitoquímicos bioactivos de amplio beneficios para la salud, evaluando los efectos de la suplementación con un extracto de arándano sobre la esperanza de vida y la resistencia al estrés utilizando *C. elegans* como modelo, revelando que los extractos puede prolongar la vida útil, mejorar los índices de salud y mejorar la resistencia al estrés (Wang *et al.*, 2018).

Actualmente, muchos estudios han propuesto que este nematodo sea un modelo ideal para la detección de alto rendimiento de drogas naturales y sintéticas contra una variedad de bacterias por ejemplo conllevando a patentar los sistemas experimentales que permiten este examen.

Caenorhabditis elegans, por lo tanto, es uno de los modelos muy efectivos para estudiar los patógenos que infectan a los humanos, entre otros relatados en este ítem (Sorathia y S. Rajadhyaksha, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de los tópicos utilizados para la alopecia androgénica sobre parámetros biológicos y moleculares del modelo biológico *Caenorhabditis elegans*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los tópicos utilizados para la alopecia androgénica sobre la letalidad de *C. elegans.*
- Evaluar el efecto de los tópicos utilizados para la alopecia androgénica sobre el crecimiento de *C. elegans*
- Determinar cambios en la expresión de genes de respuesta a estrés oxidativo por exposición a los tópicos utilizados para la alopecia androgénica en cepas transgénicas de *C. elegans*.
- Determinar la acumulación de grasa en *C. elegans* luego de la exposición a los tópicos utilizados para la alopecia androgénica

3. METODOLOGÍA PROPUESTA

3.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

Tipos de Investigación: Investigación Básica.

3.2. CEPAS

Las cepas de nematodos usadas en los ensayos fueron: Cepas silvestres *de Caenorhabditis elegans* Bristol N2 (donadas por el grupo de investigación Ciencias

biomédicas, toxicológicas y ambientales (Biotoxam) de la facultad de medicina de la universidad de Cartagena). Se utilizó como alimento cepas de *E. coli* OP50.

3.2.1. Mantenimiento de nemátodos.

Cepas de *C. elegans* N2 Brisol Wilde-type y las cepas transgénicas con proteína verde fluorescente (GFP) integrados a los genes que codifican para proteínas de shock térmico (*hsp-3*) y estrés oxidativo *(sod-4, gpx-4, gpx-6*), fueron sembradas en cajas de Petri con medio de crecimiento para nemátodos (MGN), compuesto por NaCl, agar, peptona, Colesterol, KCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$ y la inoculación de la bacteria *Escherichia coli* OP50, como fuente de alimento, se incubaron a 20°C.

Los nematodos fueron sincronizados mediante la suspensión en una solución alcalina compuesta por hipoclorito al 5,25% y 5 lentejas de NaOH, cuya función es oxidar el organismo sin destruir los huevos (Tejeda *et al.*, 2015).

3.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Para llevar a cabo la investigación se utilizaron tres tópicos para la alopecia androgénica comerciales, con composiciones diferentes, las cuales se detallan en la tabla 1. Se realizaron diluciones de 0,01; 0,1; 1 y 10 ppm en agua mili-Q con cada uno de los tópicos especificados.

Tabla 1. *Composición de los tópicos utilizados en el estudio.*

Tópico 1	Tópico 2	Tópico 3
• Minoxidil al 5% • Agua purificada	• Minoxidil al 5% • Alcohol • Glicol propileno • Agua purificada	• Minoxidil al 7% • Biotina • Melatonina • D-Pantenol • Alcohol

		• Ácido láctico • Agua purificada

3.4. BIOENSAYOS

3.4.1. Ensayo de Letalidad

Gusanos en estadio L4 fueron expuestos durante 24 horas a soluciones de tópicos para alopecia androgénica en placas de 96 pocillos (entre 10 y 13 gusanos por pocillo). Posteriormente, se contó el número de gusanos vivos y muertos mediante inspección visual, utilizando microscopio de disección. Los gusanos se clasificaron como muertos al no responder a estímulos físicos. Los resultados se compararon con un grupo control expuesto a agua mili-Q (Wu *et al.*, 2012). El punto final será determinado mediante el conteo de los individuos vivos usando un microscopio de disección. Los valores de CL50 se calcularán usando el método Probit (Tejeda *et al.*, 2015).

3.4.2. Ensayo de crecimiento

Nemátodos en estadio larval L1, fueron expuestos durante 48 horas a diferentes concentraciones de tópicos para alopecia androgénica, con inoculación de *E. coli* OP50, cada 24 horas, como fuente de alimento. Después de la exposición, los nemátodos se calentaron a 50 °C, con el objetivo de hacer que sus cuerpos adoptaran una línea recta. Luego, se midió la longitud del cuerpo de aproximadamente 30 nemátodos por tratamiento, mediante el análisis de una fotografía registrada con un microscopio de disección, utilizando el software Image J (Höss *et al.*, 1999).

3.4.3. Ensayo de acumulación de lípidos con aceite rojo rápido O (qORO).

Los nemátodos de tipo silvestre Bristol N2 sincronizados en la etapa larvaria L4, fueron expuestos durante 24 horas a las soluciones de tópicos para alopecia androgénica. Paralelamente se elaboró la solución del colorante, la cual consistió en la preparación de una solución madre de aceite rojo 0,5% en isopropanol al 100% de alta calidad, se incubó a temperatura ambiente durante un día y luego se filtró a través de un filtro de 0,45 µm de poro.

La solución stock se diluyó al 60% con agua filtrada el día antes de su uso, y luego se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Para realizar el ensayo, se añadió 200 µL isopropanol al 60% de alta calidad a nemátodos en placas de PCR de 96 pocillos. Luego, los gusanos se colocaron en el fondo de los pozos y se aspiró 175 µL de tampón. Después, se añadió 200 µL de solución de trabajo q-ORO recién filtrada (colorante).

Los nemátodos se expusieron al colorante entre 18 y 24 horas a 20° C; posteriormente, se aspiró el sobrenadante. Finalmente, se agregó 100 µL de Triton X-100 al 0.01% para conservar la muestra. Se registraron imágenes de los resultados utilizando un microscopio óptico (Wählby *et al.*, 2014).

3.4.4. Ensayo de expresión génica

Los efectos de tópicos para alopecia androgénica sobre la expresión génica se controlaron utilizando cepas de *C. elegans* transgénicas GFP que contienen los genes *hsp-3, sod-4, gpx-4 y gpx-6*. Alícuotas iguales de nemátodos en todas las etapas larvales se colocaron en microplacas de 96 pocillos expuestos a soluciones de tópicos para alopecia androgénica. Las placas se incubaron a 20 °C, y después

de 24 h, se cuantificó la absorbancia usando un lector de placas (Multiskan FC, Thermo Scientific) con filtro de 620 nm. La absorbancia relativa se calculó como el cociente entre la absorbancia de la solución y la del control (García-Espiñeira, Tejeda-Benítez y Olivero-Verbel, 2018). Aquí se puede verificar la Expresión de proteína verde fluorescente (GFP), con el uso de cepas transgénicas: BC20333 que contiene el gen sod4:gfp para evaluar estrés oxidativo por ejemplo.

3.4.5. Operacionalización de las variables.

Tabla 2. *Operacionalización de las variables*

Código	Variable	Definición	Tipo	Categorías	Rango
NA	Mortalidad	Letalidad de los nematodos por exposición a tópicos para la Alopecia 1,2,3.	Dependiente	NA	NA
NA	Obesidad	Grado de obesidad del nematodo al exponerse exposición a tópicos para la Alopecia 1,2,3.	Dependiente	NA	NA
NA	Crecimiento	Crecimiento de los nematodos por exposición exposición a tópicos para la Alopecia 1, 2, 3.	Dependiente	NA	NA
NA	Expresión génica	Expresión de genes exposición a tópicos para la Alopecia 1,2,3.	Dependiente	NA	NA

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó el programa GraphPad Prisma 6, para determinar las diferencias significativas entre las medias mediante ANOVA de dos vías. Además, se aplicó la prueba de Dunnett para comparar cada dilución con el control. El nivel de significancia establecida fue p <0,05.

RESULTADOS

3.6. ENSAYOS DE MORTALIDAD

Los resultados de los ensayos de mortalidad de *C. elegans* frente a las distintas soluciones de tópicos para alopecia androgénica se muestran en la Figura *2*.

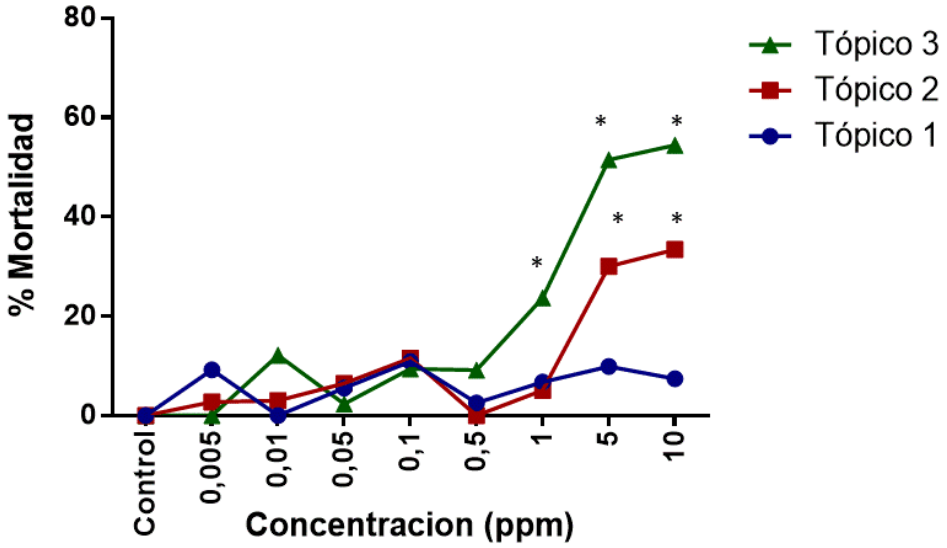


Figura 2. *Mortalidad de C. elegans expuesto a tópicos para la alopecia androgénica. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05).*

En el eje de las ordenadas se presenta el porcentaje de mortalidad y en el eje de las abscisas se consignan las concentraciones en valores crecientes de los distintos

tópicos. Se puede identificar que, a concentraciones de 0,005 ppm hasta la concentración de 0,5 ppm, no se aprecia una diferencia significativa en la mortalidad en relación con el control. Sin embargo, a partir de la concentración de 1,0 ppm el tópico 3 empieza a aumentar el porcentaje de mortalidad hasta alcanzar, aproximadamente, un 20% de mortalidad, mostrando significativa discrepancia con el control, no siendo así, el tópico 2 y tópico 1 se mantienen sin mostrar gran variación. El porcentaje de mortalidad del tópico 3 continúa subiendo a partir de una concentración de 5,0 ppm hasta alcanzar valores de porcentaje de mortalidad cercanos al 55%, además, se observa un aumento adicional de mortalidad a esta misma concentración con el tópico 2, que llega hasta aproximadamente un 30%. A pesar de esto, el tópico 1 se mantiene sin mostrar marcada distinción, teniendo en cuenta el control. A concentraciones de 10 ppm el tópico 3 y el tópico 2 continúan subiendo en mortalidad, no obstante, esta vez el aumento no varía mucho con respecto a los valores de mortalidad registrados a concentraciones de 5 ppm, aproximadamente 55% y 30% respectivamente, es decir, se mantienen los porcentajes de mortalidad, exhibiendo una evidente diferencia en cuanto al control. Con todo, el tópico 1 no varía a pesar de encontrarse a concentraciones de 10 ppm.

3.7. ENSAYO DE CRECIMIENTO

Los cambios en la longitud del cuerpo de los nematodos luego del tratamiento con tópicos para la alopecia androgénica se observan en la Figura 3.

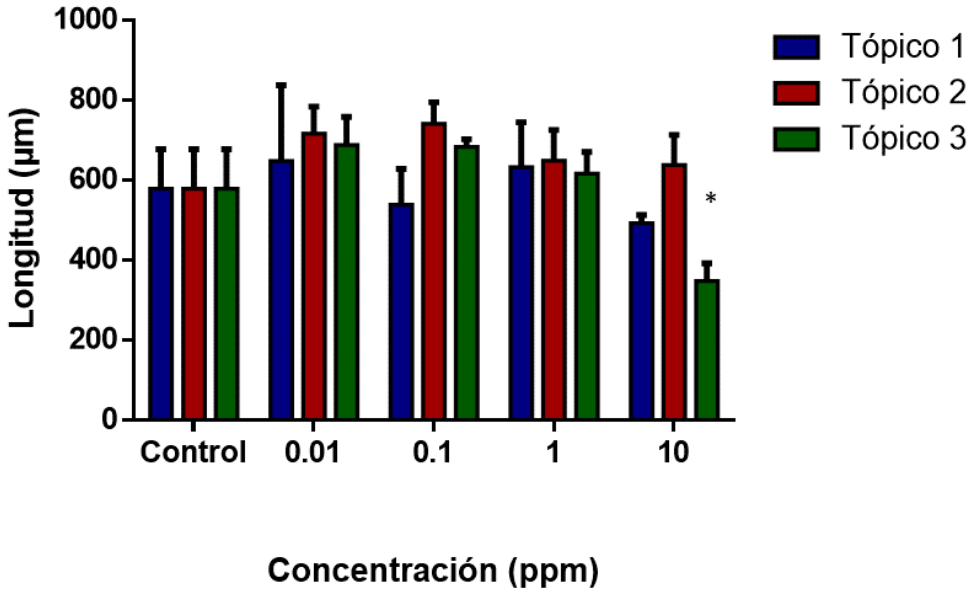


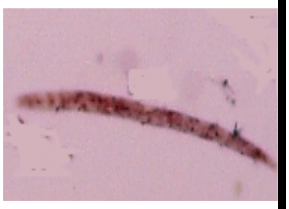
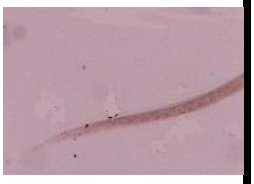
Figura 3. *Longitud corporal de C. elegans expuesto a tópicos para la alopecia androgénica. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05).*

En el eje de las ordenadas se muestra la longitud en µm y en el eje de las abscisas se señalan las concentraciones crecientes de los tópicos. Se puede reconocer, que, aunque existen pequeñas variaciones en la longitud entre los tres tópicos en el rango de concentración que va desde 0,01 ppm hasta 1 ppm, las diferencias no se encuentran significativas en relación con el control. Sin embargo, a concentraciones de 10 ppm, el tópico 3 expone una marcada disminución de la longitud, alcanzando valores de longitud aproximados a 350 µm, expresando así significativa distinción con relación al control. No obstante, los tópicos 1 y 2 se mantienen sin mostrar variación relevante en la longitud con relación al control a esta misma concentración, 10 ppm.

3.8. ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS CON ACEITE ROJO RÁPIDO O (qORO)

Los resultados de la tinción con el colorante q-oro luego de la exposición a tópicos para el tratamiento de alopecia se muestran en la *tabla 3*

***Tabla 3**. Acumulación lipídica en C. elegans, luego de la exposición a tópicos para la alopecia androgénica.*

Concentraciones ppm	Tópico 1	Tópico 2	Tópico 3
0			
0,01			
0,1			
1			
10			

Las gráficas asignadas para el tópico 1 muestran el marcado número de inclusiones lipídicas que aparecen a concentraciones de 0,01 ppm. A partir de concentraciones mayores que van desde 0,1 ppm hasta 10 ppm la cantidad de acúmulos lipídicos disminuyen, sin embargo, no desaparecen y se mantienen similares en el rango de 0,1 ppm a 10 ppm. En cuanto al tópico 2, a concentraciones de 0,01 ppm no se

muestran agregados de lípidos, no obstante, a valores de 0,1 ppm aparecen inclusiones lipídicas, aunque en número bajo. Al aumentar la concentración hasta 1 ppm disminuyen notoriamente y a 10 ppm hay un aumento significativo en cantidad de acúmulos lipídicos. Con respecto al tópico 3, a bajas concentraciones de 0,01 ppm se aprecian significativas cantidades de agregados lipídicos que disminuyen a 0,1 ppm sin desaparecer, manteniéndose en baja cantidad en el rango de concentraciones de 1 ppm a 10 ppm.

3.9. EXPRESIÓN GÉNICA

Las expresiones de genes de las cepas transgénicas expuestas a tópicos para el tratamiento de alopecia

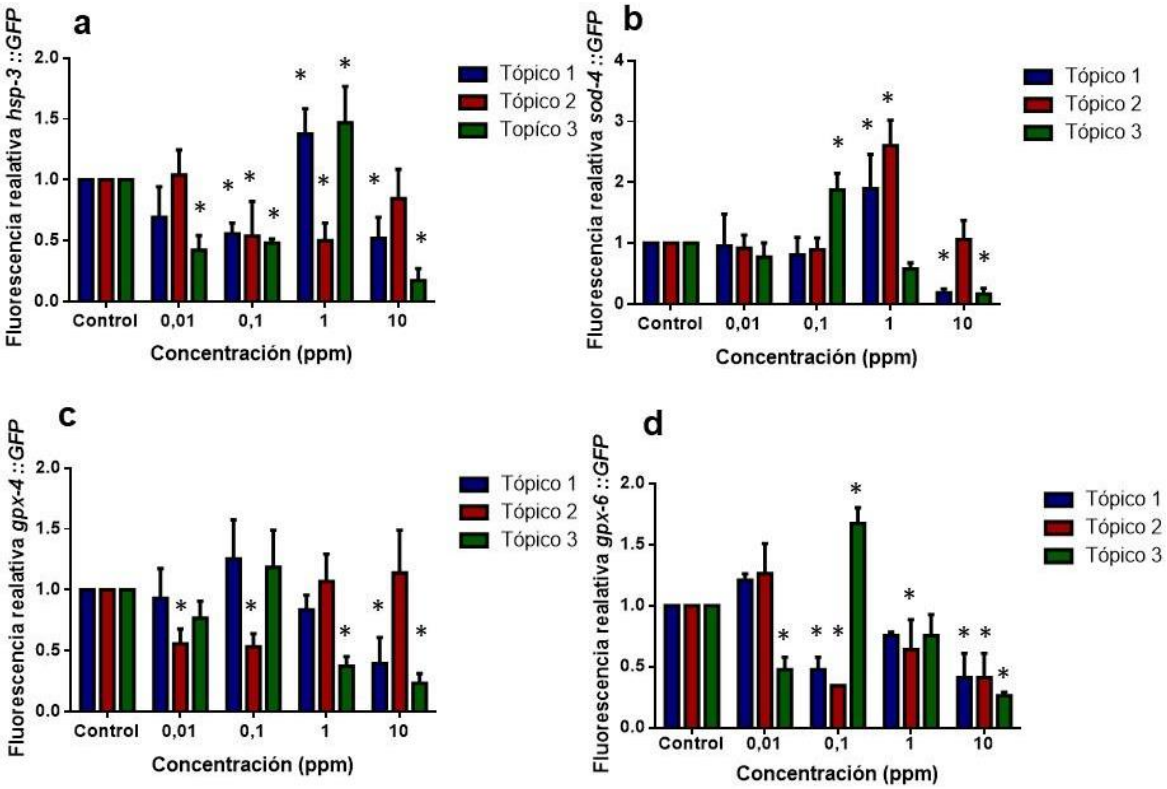


Figura 4. *Fluorescencia relativa de C. elegans transgénicos expuestos a tópicos 1, 2 y 3. a) Fluorescencia relativa de hsp-3. b) Fluorescencia relativa de sod-4. c) fluorescencia relativa de gpx-4. d) fluorescencia relativa de gpx-6. *Diferencia significativa en comparación al control (p <0,05).*

Los gusanos expuestos al tópico 1 mostraron una la sobre expresión, respecto al control, en los genes hsp-3 y sod-4 a la concentración de 1 ppm, por otro lado, los nematodos expuestos al tópico 2 provocaron la sobreexpresión del gen sod-4 a la concentración de 1ppm, respecto al control, mientras que causó la disminución de la expresión de los genes hsp-3, gpx-4 y gpx-6 principalmente en las concentraciones superiores a 0,1 ppm. Los *C. elegans* expuestos al tópico 3 mostraron una alta a expresión de los genes hsp-3 a 1ppm y gpx-6 a 0,1 ppm, respecto al control.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

C. elegans es un nemátodo parásito, cuyas características lo han catalogado como uno de los modelos biológicos útiles para la investigación a nivel de la toxicología. Lo anterior es debido a que actualmente su genoma ha sido secuenciado de manera completa (Frézal y Félix, 2015).

Dada sus características de transparencia es posible visualizar todos los tipos de células en sus distintas etapas de desarrollo. Su sistema nervioso posee 302 neuronas y es Hermafrodita. Su ciclo reproductivo es de 2,5 a 4 días a temperatura ambiente y su esperanza de vida entre 12 y 20 días lo que facilita estudios donde puedan analizarse características o efectos transgeneracionales y ser una ventaja en comparación con otros modelos biológicos (Hunt, 2017).

En toxicología, ha sido ampliamente utilizado desde estudios con el animal completo, células individuales, utilizando sus características bioquímicas y biológicas, convirtiéndolo en un modelo apetecido para diversas investigaciones actuales (Tejeda *et al.*, 2015). Además la interpretación de sus puntos finales son útiles como es el caso de la letalidad, crecimiento, locomoción, y reproducción,

estrés oxidativo, cambio en la expresión genética o de proteínas, daño al ADN, e inducción de fluorescencia entre otros (García-Espiñeira, Tejeda-Benítez y Olivero-Verbel, 2018).

En este estudio, al utilizar los tópicos para la Alopecia, los resultados mostraron mayores efectos adversos en las concentraciones más altas (1 y 10 ppm), al causar los porcentajes más altos de mortalidad y reducción de la longitud corporal, principalmente en aquellos gusanos expuestos al tópico 3. Estos resultados están apoyados a lo propuesto por Han *(*2020), acerca del potencial letal, genotóxico y reprotóxico de tóxicos genotóxicos / reproductivos presentes en agua potable en modelos de *C. elegans* cuando ensayos de biotoxicidad y espectroscopía de fluorescencia son utilizados (Han *et al.*, 2020).

Algunos estudios publicados han reportado que *C. elegans* puede usarse como modelo experimental para obtener resultados rápidos en estudios de toxicidad para compuestos farmacológicos (Dengg y Van Meel, 2004), debido a que es un organismo multicelular con una alta tasa de reproducción y un ciclo de vida corto, lo que lo convierte en un modelo *in vivo* para complementar sistemas basados en cultivo celular*.*

En cuanto a la reducción corporal, *C. elegans* es eutélico, y en su estado adulto, posee un número fijo de células somáticas. Aunque su crecimiento no depende del número de células somáticas. En los nemátodos experimentales bajo condiciones de laboratorio estándar, el tamaño es severamente reducido cuando los nutrientes se vuelven limitantes. Por consiguiente, la escasez de nutrientes puede afectar el crecimiento celular y la división celular. Esto podría ser el resultado de los efectos autónomos de las células durante el crecimiento celular. Sin embargo, análisis genético acerca del tamaño del cuerpo, han revelado otro control sistémico vía de señalización que regula el crecimiento y el tamaño corporal de manera no autónoma en respuesta a estado de nutrientes (Tain *et al.*, 2008).

Por otra parte, la longitud del cuerpo en *C. elegans* está regulada por un miembro de la familia TGFbeta, DBL-1. Mutaciones de pérdida de función en dbl-1, o en genes que codifican componentes de la vía de señalización que activa, hacen que los gusanos sean más cortos que los de tipo salvaje y ligeramente más delgados (Nyström *et al.*, 2002).

Sin embargo, para explicar la reducción de la longitud corporal, principalmente en aquellos gusanos expuestos al tópico 3; en la literatura varios estudios que han utilizado el modelo biológico, y que los han expuestos a Uranio (1,1 mM), demostraron adaptación de los individuos a las condiciones experimentales de aumento de la longitud máxima y disminución de la fecundidad (Goussen *et al.*, 2013) y un incremento de los efectos adversos reflejado en la reducción del crecimiento y la fertilidad en función de la concentración de uranio (Dutilleul *et al.*, 2013; Goussen *et al.*, 2013). Incluso estos efectos fueron vistos en las crías afectando la reproducción, sin embargo pruebas de ecotoxicidad multigeneracionales serán necesarios en el futuro, para ampliar esto (Goussen *et al.*, 2015).

Otros estudios sobre la toxicidad de los inhibidores de la quinasa EGFR BIBU1361 y BIBX1382 han sido evaluados en *C elegans*, sugiriendo el potencial de usar este modelo biológico como una herramienta para la detección de drogas en la vía anti-EGFR (Dengg y Van Meel, 2004). En algunos estudios de drogas contra el cáncer ha sido observado que la expresión una proteína quimérica en el tejido de la vulva *C. elegans* denominada el fenotipo Muv, y en especial cuando los gusanos jgIs25 se alimentaban con harmina, el fenotipo Muv se suprimió marginalmente. Estos estudios muestran las posibilidades que existen en la utilidad de este modelo.

El estrés oxidativo fue más evidente en los tópicos que presentaron menos aditivos, mostrando sobreexpresión principalmente en los genes sod-4 y gpx-6. Múltiples estudios han permitido predecir medicamentos con efectos que prolongan la vida útil de *C. elegans* (Liu *et al.*, 2016).

Bioactivos fitoquímicos de amplio beneficios para la salud, han sido evaluados (extracto de arándano) sobre la esperanza de vida y la resistencia al estrés utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo, revelando que los extractos puede prolongar la vida útil, mejorar los índices de salud y mejorar la resistencia al estrés (Wang *et al.*, 2018). Por otro lado, en estudios de toxicidad de algunas muestras ambientales, tales como lodos, suelos y sedimentos han sido útiles con el uso de este modelo identificar los efectos en la biología del organismo, incluyendo en cepas transgénicas (Tejeda-Benitez *et al.*, 2016).

También ha sido utilizado en estudios para valorar los efectos adversos a contaminantes ambientales tales como el BPA, PPB y TCS, donde se ha demostrado que estos alteran la fisiología de *C. elegans* en términos de mortalidad, crecimiento, reproducción, acumulación lipídica y genes relacionados con estrés oxidativo y shock térmico (García-Espiñeira, Tejeda-Benítez y Olivero-Verbel, 2018).

Además, la acumulación lipídica fue notoria principalmente en las concentraciones 0,01 y 0,1 ppm. En los estudios de Corrales *et al*., 2018, el modelo fue expuesto a diferentes tipos de edulcorantes comerciales se observó alteración de la fisiología de *C. elegans* en términos de letalidad y acumulación lipídica. La letalidad a la exposición a edulcorantes calóricos y no calóricos se presentó en todas las concentraciones de edulcorantes estudiadas. Siendo más alta en los calóricos en todas las concentraciones estudiadas (1000 ppb). Así como fue observada la formación de depósitos lipídicos con una tendencia creciente de acumulación lipídica relacionada con la concentración utilizada y en una mayor medida con la sacarosa. Finalmente, *C. elegans* es útil y es interesante como en el modelo edulcorantes, los resultados podrían ser afectados por factores externos tales como las características metabólicas del edulcorante, la dosis administrada y el momento del inicio de la exposición.

Sin embargo, en todos los tratamientos se observó acumulación lipídica. Lo anterior indica que los tópicos para alopecia androgénica con presencia de minoxidil afectan la vitalidad del nematodo alterando funciones como el crecimiento y el metabolismo de lípidos, además actúan con agentes estresores al causar sobre expresión de genes reguladores de estrés oxidativo. La descarga de estos tópicos al ambiente y al agua podrían ser dañinos para los ecosistemas acuáticos. En esta investigación el uso del *C. elegans* permitió estudiar diferentes efectos tóxicos adversos, estrés oxidativo, entre otros frente a los tópicos.

Lo anterior, nos pone en evidencia la utilidad de este modelo en términos de costos, en mamíferos son más costosos, algunos metanálisis realizados en modelos de roedores predicen efectos tóxicos específicos en humanos solo alrededor del 50% del tiempo. El uso de más de una especie de mamífero puede aumentar la predictividad pero también aumentará el costo y disminuirá el rendimiento (Hartung, 2009).

La toxicología actual busca utilizar métodos alternativos para mejorar los resultados humanos al tiempo que reduce el costo, el tiempo y el uso de mamíferos en las evaluaciones de toxicidad. Los productos químicos de interés pueden analizarse mucho más rápidamente y en un rango de concentraciones mucho mayor si se usan ensayos in vitro para evaluar perturbaciones en las vías de toxicidad. Si bien el uso de células humanas primarias tiene el potencial de reflejar con mayor precisión el metabolismo y los modos de acción específicos del ser humano que las pruebas en animales de laboratorio, los resultados no pueden usarse para predecir una respuesta a nivel organismal utilizando las técnicas actuales. Además, las pruebas que usan líneas celulares inmortalizadas pueden tener altas tasas de falsos positivos o falsos negativos dependiendo del tipo de ensayo. Por lo tanto, el uso de pruebas in vitro sólo para la evaluación de riesgos da lugar a la posibilidad de que los compuestos inofensivos in vivo se restrinjan innecesariamente y que los compuestos dañinos se presuman incorrectamente como seguros (Hunt, 2017).

Algunos investigadores demostraron mediante la ayuda de puntos finales subletales y múltiples que el nemátodo *C. elegans* es un sistema de ensayo útil in vivo para estudios de evaluación de la toxicidad y el mecanismo toxicológico de los contaminantes ambientales (Hartung, 2009; Tejeda *et al.*, 2015; Hunt, 2017)

Finalmente, algunas consideraciones son importantes a tener en cuenta al evaluar estos tópicos: El minoxidil según la FDA contienen un agente antihipertensivo, y puede producir efectos adversos graves. Que incluyen el derrame pericárdico, taponamiento, y angina de pecho. Así como también, en animales de experimentación, causa varios tipos de lesiones miocárdicas, efectos cardíacos adversos.

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) informa a la ciudadanía que se está comercializando de forma fraudulenta Minoxidil Kirkland, el cual no cuenta con registro sanitario Invima por lo que su comercialización en Colombia es ilegal. Se advierte a la ciudadanía que ya se reportó una reacción dermatológica severa asociada a su uso. Minoxidil Kirkland está siendo promocionado para “el crecimiento de la barba y el cabello (alopecia)”, se desconoce su contenido real. Es importante recordar que los productos sin registro sanitario pueden contener ingredientes que ponen en riesgo la salud de quienes los consumen. El minoxidil debe administrarse bajo estrecha supervisión. Estudios más avanzados deben realizarse en el futuro (Alerta Invima No. 127-2018).

El minoxidil es un medicamento común recetado para tratar problemas relacionados con la pérdida de cabello. Proporciona beneficios notables a pacientes con trastornos del cabello. Hasta la fecha, la FDA ha aprobado el minoxidil solo para AGA. Sin embargo, el minoxidil se usa fuera de etiqueta para tratar varios trastornos del cabello, así como para aumentar el crecimiento del vello corporal. Aunque el minoxidil tópico se considera una opción de tratamiento efectiva y segura para varios trastornos del cabello, se necesitan datos adicionales basados en evidencia para algunas aplicaciones (Suchonwanit, Thammarucha y Leerunyakul, 2019).

5. CONCLUSIONES

- Los tópicos para la Alopecia y sus presentaciones afectan la vitalidad del nematodo alterando funciones como el crecimiento y el metabolismo de lípidos.
- Los tópicos para la Alopecia y sus presentaciones pueden posiblemente actuar con un agente estresores al causar sobre expresión de genes reguladores de estrés oxidativo.
- La descarga de estos tópicos al ambiente, en especial al ambiente acuático puede generar un impacto negativo sobre los ecosistemas al afectar la vitalidad de algunos seres vivos en estos estuarios.
- Estudios moleculares, epigenéticos y utilización de cepas transgénicas serán necesarios para seguir en la búsqueda del daño toxicológico que estos medicamentos podrían ocasionar a los seres vivos.
- Estudios multigeneracionales en el futuro serán necesarios para la evaluación de los riesgos ambientales de algunos tóxicos en el ambiente.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abell, E. (1988) “Histologic response to topically applied minoxidil in male-pattern alopecia”, *Clinics in Dermatology*, 6(4), pp. 191–194. doi: 10.1016/0738-081X(88)90086-7.

Altun, Z. y Hall, D. (2012) “Handbook of C. elegans Anatomy”, *WormAtlas*, pp. 1–16. Disponible en: http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm.

Andersen, E. C. *et al.* (2012) “Chromosome-scale selective sweeps shape

Caenorhabditis elegans genomic diversity", *HHS Public Access*, 44(3), pp. 285–290. doi: 10.1038/ng.1050.Chromosome-scale.

Avila, D. S. *et al.* (2016) "Involvement of heat shock proteins on Mn-induced toxicity in Caenorhabditis elegans", *BMC Pharmacology and Toxicology*. BMC Pharmacology and Toxicology, 17(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s40360-016-0097-2.

Campese, V. M. (1981) "Minoxidil: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use", *Drugs*, 22, pp. pages257–278.

Clavijo, A. *et al.* (2016) "The nematode Caenorhabditis elegans as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution", *Science of the Total Environment*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.06.057.

Corsi, A. K., Wightman, B. y Chalfie, M. (2015) "A Transparent Window into Biology : A Primer on Caenorhabditis elegans", *GENETICS*, 200(2446), pp. 387–407. doi: 10.1534/genetics.115.176099.

Delgado-Ciruelos, L. (2015) *Mecanismos de acción implicados en la bioactividad de flavonoides. Caenorhabditis elegans y líneas celulares como sistemas modelo*. UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

Dengg, M. y Van Meel, J. C. A. (2004) "Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds", *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. doi: 10.1016/j.vascn.2004.04.002.

Dirksen, P. *et al.* (2016) "The native microbiome of the nematode Caenorhabditis elegans: Gateway to a new host-microbiome model", *BMC Biology*. BMC Biology, 14(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12915-016-0258-1.

Dutilleul, M. *et al.* (2013) "Rapid phenotypic changes in Caenorhabditis elegans under uranium exposure", *Ecotoxicology*. doi: 10.1007/s10646-013-1090-9.

Earhart, R. N. *et al.* (1977) "Minoxidil-induced hypertrichosis: Treatment with calcium thioglycolate depilatory", *Southern Medical Journal*. doi: 10.1097/00007611-197704000-00023.

Frézal, L. y Félix, M. A. (2015) "C. elegans outside the Petri dish", *eLife*, 4, pp. 1–14. doi: 10.7554/eLife.05849.

Gao, A. W. *et al.* (2018) "Forward and reverse genetics approaches to uncover

metabolic aging pathways in Caenorhabditis elegans", *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. The Author(s). Published by Elsevier B.V, 1864(9), pp. 2697–2706. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.09.006.

García-Espiñeira, M. C., Tejeda-Benítez, L. P. y Olivero-Verbel, J. (2018) "Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on caenorhabditis elegans", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4). doi: 10.3390/ijerph15040684.

García-Sancho, M. (2012) "From the genetic to the computer program: The historicity of 'data' and 'computation' in the investigations on the nematode worm C. elegans (1963-1998)", *Studies in History and Philosophy of Science Part C :Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 43(1), pp. 16–28. doi: 10.1016/j.shpsc.2011.10.002.

Gogtay, J. A. y Panda, M. (2009) "Minoxidil topical foam: A new kid on the block", *International Journal of Trichology*, 1(2), p. 142. doi: 10.4103/0974-7753.58560.

Goussen, B. *et al.* (2013) "Consequences of a multi-generation exposure to uranium on Caenorhabditis elegans life parameters and sensitivity", *Ecotoxicology*. doi: 10.1007/s10646-013-1078-5.

Goussen, B. *et al.* (2015) "Transgenerational Adaptation to Pollution Changes Energy Allocation in Populations of Nematodes", *Environmental Science and Technology*. doi: 10.1021/acs.est.5b03405.

Han, X. *et al.* (2020) "An investigation of changes in water quality throughout the drinking water production/distribution chain using toxicological and fluorescence analyses", *Journal of Environmental Sciences (China)*. Elsevier B.V., 87, pp. 310–318. doi: 10.1016/j.jes.2019.07.015.

Hartung, T. (2009) "Toxicology for the twenty-first century", *Nature*, 460(7252), pp. 208–212. doi: 10.1038/460208a.

Honnen, S. (2017) "Caenorhabditis elegans as a powerful alternative model organism to promote research in genetic toxicology and biomedicine", *Archives of Toxicology*. doi: 10.1007/s00204-017-1944-7.

Höss, S. *et al.* (1999) "GROWTH AND FERTILITY OF CAENORHABDITIS

ELEGANS (NEMATODA) IN UNPOLLUTED FRESHWATER SEDIMENTS: RESPONSE TO PARTICLE SIZE DISTRIBUTION AND ORGANIC CONTENT", *Environmental Toxicology and Chemistry*. doi: 10.1897/1551-5028(1999)018<2921:gafoce>2.3.co;2.

Hunt, P. R. (2017) "The C. elegans model in toxicity testing", *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), pp. 50–59. doi: 10.1002/jat.3357.

Hutter, H. (2012) *Fluorescent Protein Methods: Strategies and Applications*. Second Edi, *Methods in Cell Biology*. Second Edi. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-394620-1.00003-5.

Kvedar, J. C., Baden, H. P. y Levine, L. (1988) "Selective inhibition by minoxidil of prostacyclin production by cells in culture", *Biochemical Pharmacology*, 37(5), pp. 867–874. doi: 10.1016/0006-2952(88)90174-8.

Lachgar, S. *et al.* (1998) "Minoxidil upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in human hair dermal papilla cells", *British Journal of Dermatology*, 138(3), pp. 407–411. doi: 10.1046/j.1365-2133.1998.02115.x.

Lenz, K. A., Pattison, C. y Ma, H. (2017) "Triclosan (TCS) and triclocarban (TCC) induce systemic toxic effects in a model organism the nematode Caenorhabditis elegans", *Environmental Pollution*. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.036.

Liu, H. *et al.* (2016) "Screening lifespan-extending drugs in Caenorhabditis elegans via label propagation on drug-protein networks", *BMC Systems Biology*. doi: 10.1186/s12918-016-0362-4.

Lowenthal, D. T. y Affrime, M. B. (1980) "Pharmacology and pharmacokinetics of minoxidil", *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. doi: 10.1097/00005344-198000022-00002.

Ma, L. *et al.* (2018) "Caenorhabditis elegans as a model system for target identification and drug screening against neurodegenerative diseases", *European Journal of Pharmacology*. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.11.051.

Manfo, F., Nantia, E. y Mathur, P. (2015) "Effect of Environmental Contaminants on Mammalian Testis", *Current Molecular Pharmacology*. doi: 10.2174/1874467208666150126155420.

Messenger, A. G. y Rundegren, J. (2004) “Minoxidil: mecanisms of action on hair growth”, *British Journald of dermatology*, 150, pp. 186–194. doi: 10.1001/jama.1985.03350320055016.

Michelet, J. F. *et al.* (1997) “Activation of cytoprotective prostaglandin synthase-1 by minoxidil as a possible explanation for its hair growth-stimulating effect”, *Journal of Investigative Dermatology*. doi: 10.1111/1523-1747.ep12334249.

Nyström, J. *et al.* (2002) “Increased or decreased levels of Caenorhabditis elegans lon-3, a gene encoding a collagen, cause reciprocal changes in body length”, *Genetics*.

Olsen, E. A. *et al.* (2002) “A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(3), pp. 377–385. doi: 10.1067/mjd.2002.124088.

Parada Ferro, L. K., Gualteros Bustos, A. V. y Sánchez Mora, M. R. (2017) “Caracterización fenotípica de la cepa N2 de Caenorhabditis elegans como un modelo en enfermedades neurodegenerativas”, *Nova*, 15(28), p. 69. doi: 10.22490/24629448.2080.

Peralta-Mocha, M. y Cango-Diaz, L. (2017) “La investigación universitaria y los proyectos de vinculación con los sectores productivos: Caso UTMACH”, *Conference Proceedings UTMACH*, 2, pp. 301–310.

Perez-Mora, N., Velasco, C. y Bermúdez, F. (2015) “Oral finasteride presents with sexual-unrelated withdrawal in long-term treated androgenic alopecia in men”, *SKINmed*.

Price, V. H., Menefee, E. y Strauss, P. C. (1999) “Changes in hair weight and hair count in men with androgenetic alopecia, after application of 5% and 2% topical minoxidil, placebo, or no treatment”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41(5 I), pp. 717–721. doi: 10.1016/S0190-9622(99)70006-X.

Radomski, S. B., Herschorn, S. y Rangaswamy, S. (1994) “Topical minoxidil in the treatment of male erectile dysfunction”, *Journal of Urology*. doi: 10.1016/S0022-5347(17)35217-5.

Shin, H. R. *et al.* (2010) “Identification of transcriptional targets of Wnt/β-catenin signaling in dermal papilla cells of human scalp hair follicles: EP2 is a novel transcriptional target of Wnt3a”, *Journal of Dermatological Science*. Japanese Society for Investigative Dermatology, 58(2), pp. 91–96. doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.02.011.

Sorathia, N. y S. Rajadhyaksha, M. (2016) “Caenorhabditis elegans: A Model for Studying Human Pathogen Biology”, *Recent Patents on Biotechnology*. doi: 10.2174/1872208310666160727151853.

Suchonwanit, P., Thammarucha, S. y Leerunyakul, K. (2019) “Minoxidil and its use in hair disorders: A review”, *Drug Design, Development and Therapy*, 13, pp. 2777–2786. doi: 10.2147/DDDT.S214907.

Sulston, J. E. *et al.* (1983) “The embryonic cell lineage of the nematode {\lcel}”, *Developmental Biology*, 100(1), pp. 64–119.

Tain, L. S. *et al.* (2008) “Dietary regulation of hypodermal polyploidization in C. elegans”, *BMC Developmental Biology*. doi: 10.1186/1471-213X-8-28.

Tejeda-Benitez, L. *et al.* (2016) “Pollution by metals and toxicity assessment using Caenorhabditis elegans in sediments from the Magdalena River, Colombia”, *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 212, pp. 238–250. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.057.

Tejeda, L. *et al.* (2015) *Caenorhabditis elegans, a Biological Model for Research in Toxicology Article in Reviews of environmental contamination and toxicology*. doi: 10.1007/978-3-319-23573-8.

Wählby, C. *et al.* (2014) “High- and low-throughput scoring of fat mass and body fat distribution in C. elegans”, *Methods*. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.04.017.

Wang, H. *et al.* (2018) “Blueberry extract promotes longevity and stress tolerance via DAF-16 in Caenorhabditis elegans”, *Food and Function*. doi: 10.1039/c8fo01680a.

Wu, M., Yu, Q. y Li, Q. (2016) “Differences in reproductive toxicology between alopecia drugs: An analysis on adverse events among female and male cases”, *Oncotarget*, 7(50), pp. 82074–82084. doi: 10.18632/oncotarget.12617.

Yano, K., Brown, L. F. y Detmar, M. (2001) “Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis”, *Journal of Clinical Investigation*, 107(4), pp. 409–417. doi: 10.1172/JCI11317.

Yum, S. *et al.* (2018) “Minoxidil induction of VEGF is mediated by inhibition of HIF-prolyl hydroxylase”, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1). doi: 10.3390/ijms19010053.