Universidad Nacional del Sur

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis de Grado para la Licenciatura en Ciencias Biológicas

“Estudio del efecto del geraniol como antioxidante y su impacto en modelos de Parkinson en *Caenorhabditis elegans*”

Alumno: Romussi, Stéfano

Directora: Dra. De Rosa, María José

ÍNDICE:

1- Resumen……..……..…4

2- Introducción…….…..…6

2.1- Problemática……..……...…6

2.2- Modelo de estudio…….……7

2.3- Potencial terapéutico del geraniol……...10

2.4- Resultados previos……...…….……..12

3- Hipótesis…….15

4- Objetivos……16

5- Materiales y métodos…….17

5.1- Cepas de *C. elegans*……17

5.2- Preparación de los medios de cultivo…….17

5.3- Sincronización de los ejemplares……17

5.4- Ensayos de movilidad o locomoción……..18

5.5- Evaluación del número de progenie……18

5.6- Ensayos de microscopía: Determinación del número de agregados proteicos…….19

5.7- Análisis estadístico…….19

6- Resultados……..21

6.1- El geraniol mejora los fenotipos afectados por la agregación de proteínas en los modelos de Parkinson……21

6.2- El geraniol afecta el número de agregados presentes en los modelos de Parkinson?....26

6.3- Conclusión……..31

7- Discusión……33

8- Bibliografía……..37

RESUMEN:

El objetivo general de este proyecto fue evaluar la actividad antiproteotóxica del aceite esencial geraniol, componente natural de diversas plantas aromáticas. Utilizamos modelos establecidos de enfermedad de Parkinson (EP) en *Caenorhabditis elegans*, para estudiar el efecto de este aceite en el desarrollo y la progresión de dicha patología.

La prolongación de la longevidad es uno de los logros más notables de la ciencia. De la mano de estos avances surgen nuevos desafíos como el aumento en la prevalencia de patologías asociadas a la edad como son los trastornos neurodegenerativos (ND). Actualmente no existen tratamientos farmacológicos curativos para estas enfermedades.

Si bien los mecanismos subyacentes a la muerte celular propia de las distintas enfermedades ND podrían ser múltiples (1), el común denominador parece ser la alteración en la proteostasis con acumulación de proteínas mal plegadas, que de no resolverse, conduce a la disfunción y muerte celular. Este es el caso de la EP donde alteraciones en la proteína α-sinucleína (α-sin) forma agregados que se vuelven tóxicos para la célula, estos agregados son conocidos como cuerpos de Lewy (2, 3, 4). Diversos factores, especialmente el estrés oxidativo y el daño mitocondrial han sido identificados como factores críticos en la patogénesis de las enfermedades ND (5). Por razones aún desconocidas, los sistemas de protección celulares resultan insuficientes para detener la agregación proteica. Estos mecanismos se encuentran altamente conservados en todo el reino animal (6).

El nematodo de vida libre *C. elegans* es ampliamente utilizado en investigación biomédica en todo el mundo (7, 8). Este organismo presenta numerosas ventajas ya que es posible realizar ensayos genéticos, farmacológicos, de microscopía y de ARN de interferencia (ARNi), para el silenciamiento específico de genes de manera muy sencilla. Además, existe un banco de cepas (*Caenorhabditis Genetic Center*, CGC) donde se puede acceder fácilmente a animales transgénicos y *knock-out*. El alto nivel de homología entre los genes de *C. elegans* y mamíferos (incluyendo proteínas involucradas

en la respuesta a estrés, autofagia, etc.) sugiere que la gran mayoría de los procesos estudiados en este organismo son universales (9, 10, 11).

En esta tesis aprovechamos las ventajas de *C. elegans* para evaluar el potencial antiproteotóxico del geraniol en modelos de enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados obtenidos indican que el geraniol, en concentraciones adecuadas, tiene un efecto protector sobre el estrés oxidativo sin presentar efectos deletéreos sobre los animales. Además, se determinó que el geraniol presenta una mejoría en el fenotipo descoordinado de gusanos modelos de EP y que puede disminuir la presencia de agregados de α-sin protetóxicos mediante mecanismos desconocidos y sobre los cuales es necesario ahondar posteriormente.

Este plan es parte del proyecto general del laboratorio de Neurobiología de Invertebrados. Nuestro objetivo a largo plazo es entender los mecanismos moleculares involucrados en la formación de agregados proteotóxicos y su modulación farmacológica en un organismo completo como *C. elegans*. Teniendo en cuenta la universalidad de los mecanismos moleculares involucrados, creemos que estos estudios podrían resultar relevantes para entender procesos similares en otros organismos.

INTRODUCCION:

Problemática:

El avance en los conocimientos médicos y tecnológicos permitió prolongar la expectativa de vida, pero también condujo a la aparición de nuevos problemas tales como el aumento en la incidencia de enfermedades asociadas a la edad, entre las cuales se encuentran numerosos trastornos ND. Las enfermedades ND aún no poseen tratamiento curativo por lo que tienen un profundo impacto en la calidad de vida, la salud y la economía de la sociedad. Si bien no existe un mecanismo de muerte neuronal único en estas patologías, en gran parte de ellas se produce una alteración en la proteostasis con acumulación de proteínas que conduce a la disfunción y muerte celular. Las células cuentan con mecanismos celulares de defensa como son el aumento en la síntesis de chaperonas moleculares tales como las *Heat Shock Proteins (HSPs)* y la autofagia para mantener la proteostasis en condiciones desfavorables. Estos mecanismos se encuentran altamente conservados desde nematodos hasta mamíferos. Precisamente, la acumulación de proteínas mal plegadas es una característica común de la mayoría de las enfermedades ND por lo que se las conocen como proteinopatías (2, 3, 4).

La EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, que afecta a más del 1% de la población mayor de 60 años (12). La pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia *nigra* provoca defectos locomotores como rigidez muscular, bradiquinesia, inestabilidad postural y temblores (13). A nivel celular se caracteriza por la acumulación de proteínas en inclusiones llamadas cuerpos de Lewy. La proteína α-sinucleína (α-sin) es el mayor constituyente de estos cuerpos (4). La progresión de la EP implica principalmente agregación anormal de proteínas que se vuelven tóxicas para las neuronas, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial (14). Los mecanismos moleculares que subyacen a estos eventos aún no son claros. Diferentes clases de estresantes, entre ellos el estrés oxidativo, pueden inducir la agregación proteica y culminar en un estado patológico. En este sentido, varios autores postulan que la saturación de las defensas antioxidantes endógenas debido a la generación excesiva de radicales libres y la disfunción mitocondrial representan uno de los factores

más importantes que participan en la progresión de la EP (15). Actualmente no existen tratamientos farmacológicos específicos para tratar la EP. El entendimiento de los procesos moleculares y celulares que modulan mecanismos endógenos de defensa y participan en la dinámica de formación/desintegración de agregados proteotóxicos, podrían contribuir al desarrollo de potenciales intervenciones terapéuticas.

Modelo de estudio:

C. elegans es un pequeño (~1 mm de longitud) nematode terrestre de vida libre que se alimenta de bacterias (16, 17). En su ciclo de vida puede desarrollarse como macho (~0.2% de la población) o hermafrodita (17, 18). Un adulto hermafrodita saludable produce aproximadamente 300 huevos autofecundados y es capaz de dejar cerca de 1.000 descendientes por reproducción sexual con machos. Este animal típicamente vive unas 3 semanas en condiciones de laboratorio a 20°C.

El ciclo de vida de *C. elegans* (**Figura 1**) es de aproximadamente 2,5-3 días, pasando por: embriogénesis (~16hs), cuatro estadios larvales (L1-L4, ~28hs) y la forma adulta (L4-adulto, ~12hs). Condiciones ambientales adversas (hambre, sobrepoblación, altas temperaturas) en el estadio L1 provoca una fase de "arresto en el desarrollo" llamada larva dauer (19, 20). La larva dauer se caracteriza por su capacidad de sobrevivir en condiciones estresantes por meses hasta que las mismas se tornan favorables y se retoma el desarrollo reproductivo normal.

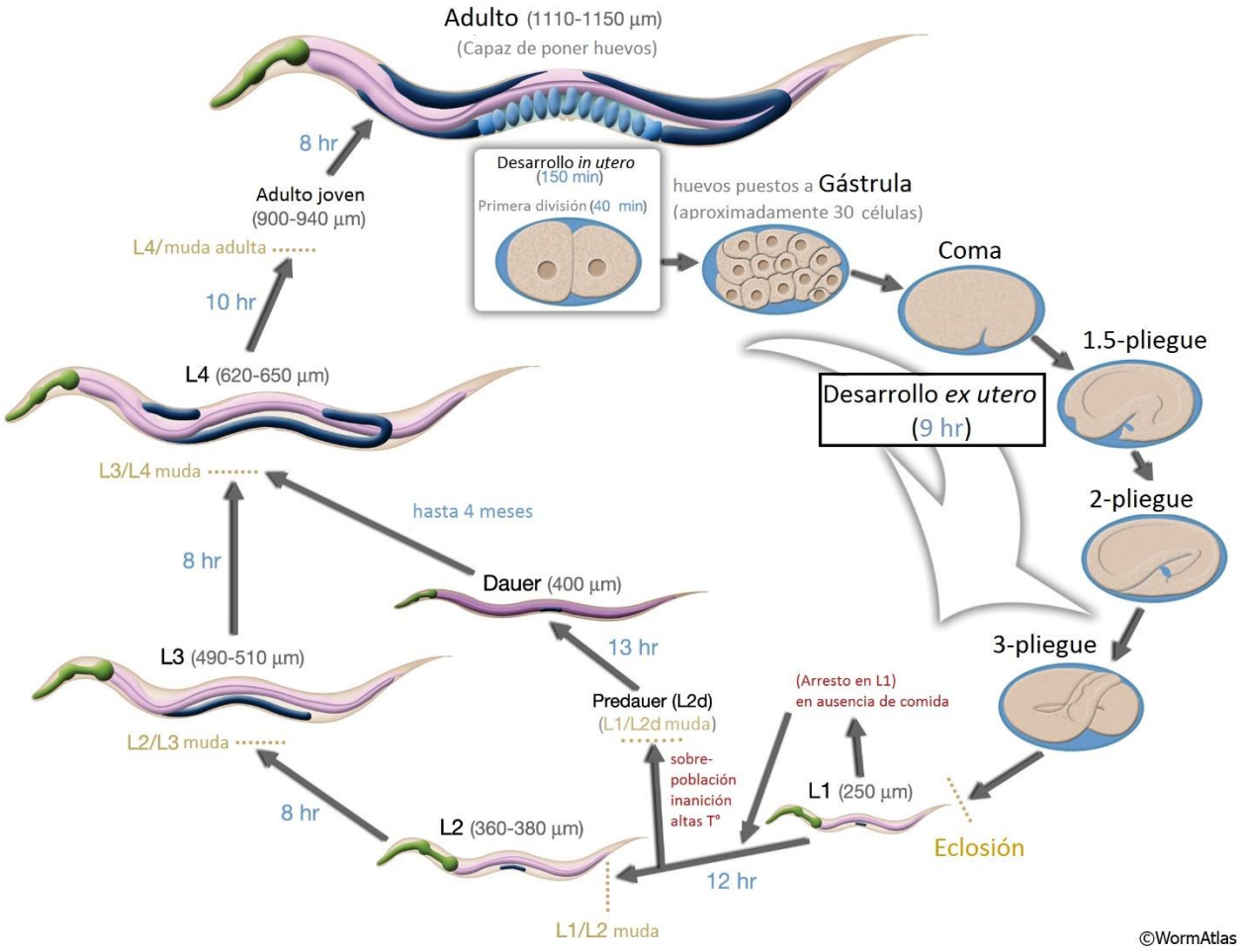

Figura 1: Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. En azul se indica el tiempo que el animal se mantiene en cada estadio. En gris se indica el largo del animal en cada estadio. Imagen tomada del WormAtlas y traducida al español.

C. elegans se ha propuesto como un buen modelo para estudios *in-vivo*, ya que su mantenimiento en laboratorio es fácil y de bajo costo. En condiciones de laboratorio, se alimenta de cepas no patógenas de *Escherichia coli*, las cuales son fáciles de mantener en cultivo. Debido a que este nematodo se ha utilizado como modelo animal desde hace mucho tiempo, existen numerosos protocolos de diversas áreas de estudio y está disponible una cantidad considerable de información sobre la especie en línea. Además, existe un banco de cepas (*Caenorhabditis Genetic Center*, CGC) que se encarga de obtener, mantener y distribuir un gran número de cepas genotípicamente y fenotípicamente caracterizadas.

A diferencia de otros representantes del filo Nematoda, *C. elegans* no es una especie peligrosa ni patogénica, por lo que puede ser manipulada bajo condiciones de seguridad estándar. Un beneficio importante de usar este animal en laboratorio es que puede tolerar perfectamente condiciones de congelado en nitrógeno líquido (-80°C) (17). Además, su uso no implica problemas éticos como si ocurre con vertebrados.

Las características que le confieren a *C. elegans* un valor extra como modelo de estudio de proteinopatías relacionadas a la edad incluyen, entre otras: (i) grandes similitudes neuronales con vertebrados a nivel molecular y celular, (ii) el desarrollo continuo de modelos mutantes y transgénicos de enfermedades neurodegenerativas humanas, (iii) el ampliamente estudiado conectoma neuronal, el cual puede ser visualizado empleando reporteros fluorescentes en el organismo vivo, (iv) su corto ciclo de vida, ideal para estudiar enfermedades asociadas a la edad y (v) las recientemente desarrolladas plataformas de alto rendimiento de *screening* de drogas (del inglés, *high-throughput screening*, HTS) (21).

Se estima que alrededor de un 50% de los genes humanos presentan un ortólogo en *C. elegans*, lo que indica un alto grado de conservación (9, 10, 11). Además, el uso de un **organismo completo permite no solo la disección de vías moleculares sino también estudiar su modulación sistémica.**

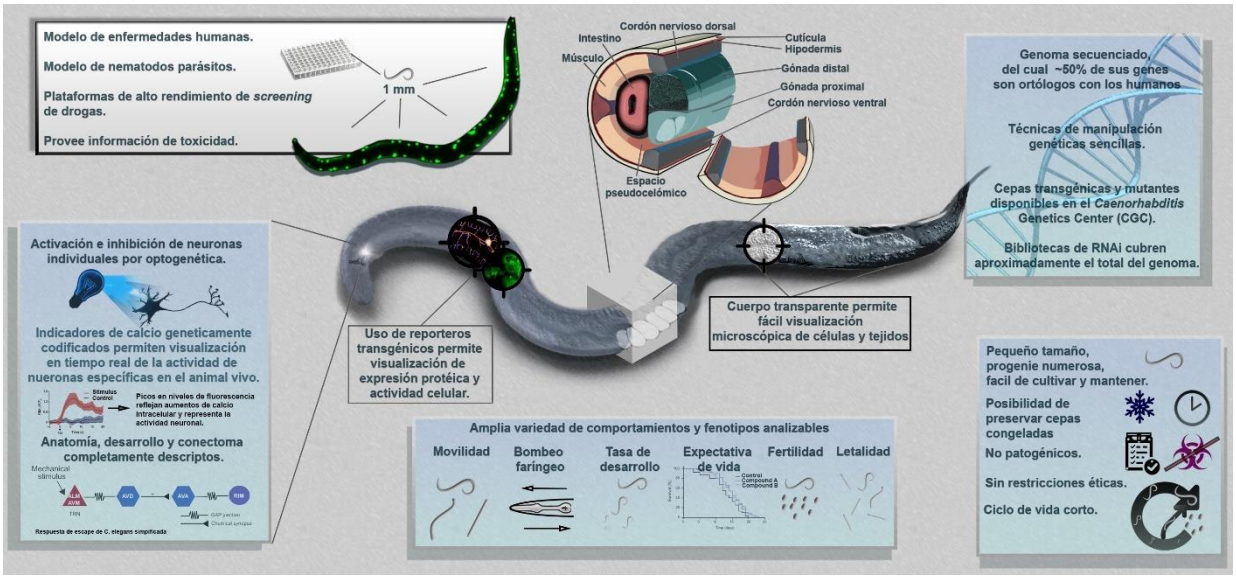

Figura 2: Resumen de ventajas de *C. elegans* como modelo (tomado de Giunti *et al* 2021 y traducida al español).

Para el estudio de la EP en *C. elegans* se generaron diversos modelos utilizando distintas estrategias. Se encuentran disponibles cepas transgénicas que sobreexpresan la proteína α-sin humana en neuronas dopaminérgicas, causando degeneración selectiva de estas últimas (22, 23). Otros investigadores, generaron cepas que expresan α-sin en células musculares (24). Dado que en *C. elegans* existen solamente 8 neuronas que sintetizan dopamina, la evaluación de genes y compuestos promotores o supresores de la proteotoxicidad y neurodegeneración es muy sencilla.

Potencial terapéutico del geraniol:

Los extractos de hierbas con potencial antioxidante juegan un rol importante contra el daño oxidativo. Los Aceites esenciales (AE) son extractos vegetales compuestos por terpenos y otras sustancias que han sido reconocidos por sus diversas propiedades benéficas tales como, efectos antiinfecciosos, antitusivos, de mejora de la memoria, conciliación del sueño, entre otros (25). Debido a su capacidad antioxidante, ciertos AE se han propuesto como estrategias preventivas y de tratamiento para patologías que cursan con daño oxidativo e inflamación, tal como las enfermedades

ND (26, 27). Los mecanismos moleculares que expliquen esta potencialidad terapéutica no se conocen con claridad.

El geraniol es un monoterpenoide acíclico (**Figura 3**), importante componente del AE de jengibre, limón, lima, lavanda, nuez moscada, naranja y rosa (28, 29). Esta molécula se utiliza ampliamente en las industrias cosmética, farmacológica y alimentaria debido a sus propiedades aromáticas, repelentes, antibióticas y antiparasitarias (30). Por otro lado, se reportó que el aceite esencial de rosa, del cual el geraniol es uno de sus componentes principales, posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas (31, 32, 33, 34). Gracias a sus propiedades biológicas, junto a su baja toxicidad, resulta un compuesto sumamente atractivo para evaluar su potencial aplicación en el tratamiento de diversas patologías que cursan con daño oxidativo e inflamación tal como las enfermedades ND (26, 35).

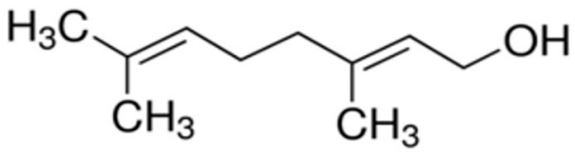

Figura 3: Estructura química del geraniol.

En este trabajo, evaluamos el potencial antiproteotóxico del geraniol en modelos de Parkinson en *C. elegans* mediante ensayos de locomoción y recuento de progenie, ambos indicadores de la viabilidad, y, adicionalmente, se complementaron con ensayos de microscopía de fluorescencia que permitieron el recuento de agregados proteotóxicos. El laboratorio contaba con datos preliminares obtenidos en el animal salvaje sobre el efecto antioxidante, concentraciones tóxicas e impacto en el desarrollo del nematodo que sirvieron como base y orientaron la investigación.

Resultados previos:

En primer lugar, es necesario mencionar brevemente los resultados previos obtenidos en el laboratorio de Neurobiología de Invertebrados sobre los cuales se construyó la hipótesis de esta tesis de grado.

1-Estudio del efecto tóxico del geraniol en animales salvajes

Dado que ciertos AE poseen actividad antihelmíntica (38), al emplear estos aceites sobre *C. elegans*, en primer lugar, fue necesario determinar las concentraciones que no afectan su sobrevida y capacidad de dejar descendencia. Este paso es fundamental, ya que dependiendo de las concentraciones que no afecten estos parámetros podremos demostrar el efecto antiproteotóxico deseado, así como posibles efectos adversos. Para esto, mediante curvas de concentración (**Figura 4**) se analizó el efecto del geraniol sobre animales salvajes N2 en estadio L4. Se logró determinar que las concentraciones mayores a 5 mM poseen un potente efecto nematicida y ovicida, mientras que la concentración 2,5 mM afectó solo a los huevos. Finalmente, concentraciones inferiores a 1,5 mM no presentan ningún efecto tóxico sobre los nematodos, por lo que serían las correctas para realizar nuestro estudio y evaluar cualquier efecto biológico que nos interese.

Figura 4: Resultados de los ensayos farmacológicos de exposición a geraniol en animales de la cepa salvaje. Se indican las concentraciones utilizadas y los respectivos controles. Se muestran los resultados obtenidos en animales

adultos (Ad) o en huevos (H). En negro: + (sin efecto negativo en la sobrevida), en rojo: – (efecto negativo en la sobrevida).

2-El geraniol no afecta la velocidad de desarrollo de los animales salvajes

Otra característica importante que evaluar cuando se estudia un compuesto en *C. elegans* es observar si tiene efectos sobre el desarrollo de los animales. Precisamente, para estudiar este efecto se analizó el impacto de la exposición al geraniol en las diferentes etapas del desarrollo del nematodo en la cepa N2. Este ensayo demostró que bajo las condiciones evaluadas (control sin geraniol, control vehículo DMSO y geraniol 10 µM) la cinética de desarrollo de los animales no se veía afectada (**Figura 5**). Es decir, bajo las tres condiciones mencionadas, los animales se desarrollaron y envejecieron al mismo ritmo, sin observarse diferencias significativas.

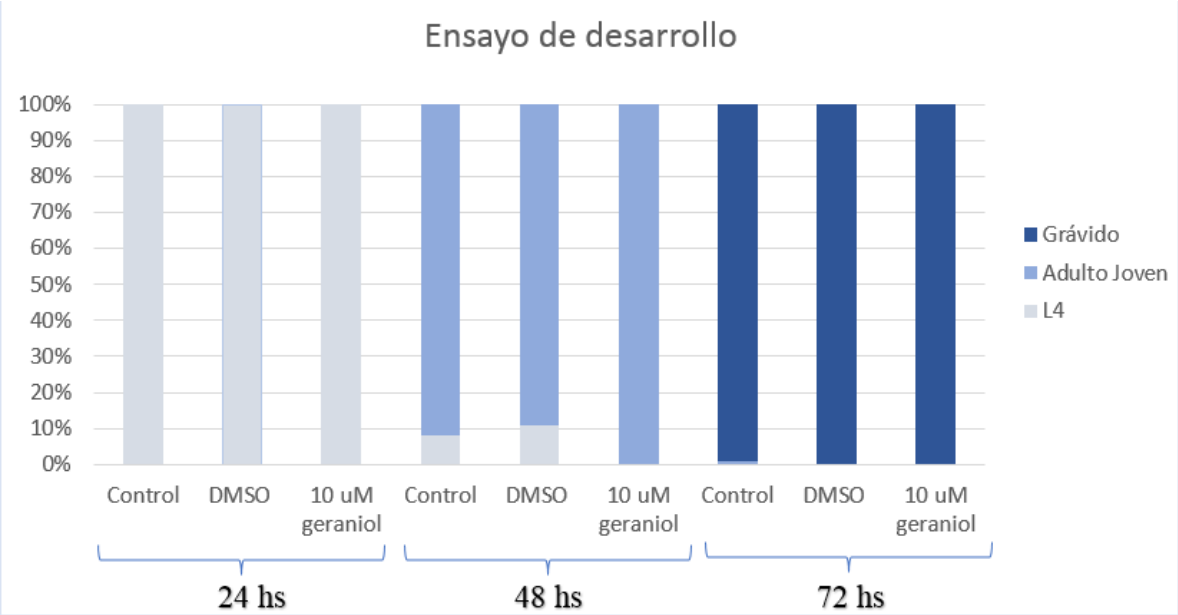

Figura 5: Resultados del ensayo de desarrollo. Se muestra el porcentaje de animales de cada etapa del desarrollo observados a las 24, 48 y 72 horas post L1.

3-Los animales salvajes tratados con geraniol presentan una mayor resistencia al estrés oxidativo

Los AE poseen un amplio rango de actividades biológicas. Entre ellas encontramos la capacidad antioxidante, la cual ha sido reportada por varios autores **(**31, 32, 33, 34). Por lo tanto, se planteó evaluar la capacidad del geraniol de actuar como un antioxidante natural. Para esto se expuso a los animales de la cepa N2 a diferentes concentraciones de geraniol (desde huevos hasta el estadío L4) y luego a un oxidante como es el hierro ($FeSO_4$, 10 mM) (**Figura 6**).

En cuanto a los efectos protectores del geraniol frente al estrés oxidativo, este ensayo demostró que concentraciones de geraniol 10, 100 y 1000 µM mejoraban la supervivencia de los animales salvajes expuestos al factor estresante durante 1 hora. Estos resultados indican que el geraniol posee un efecto protector sobre el estrés oxidativo, pudiendo ser uno de los mecanismos de acción su poder antioxidante.

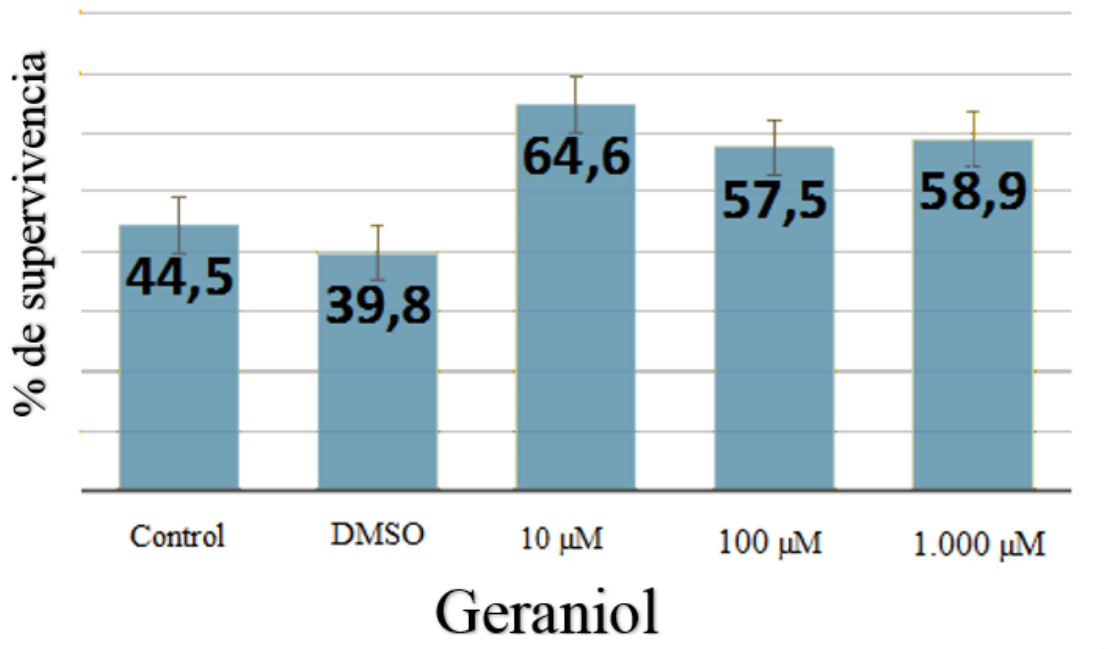

Figura 6: Efecto del geraniol en el estrés oxidativo. Se muestran los porcentajes de supervivencia en animales salvajes expuestos a $FeSO_4$ durante 1 hora, luego de ser crecidos en geraniol o en el vehículo DMSO.

Hipótesis:

El geraniol debido a su efecto en la inducción de la resistencia de los organismos frente al estrés oxidativo, uno de los factores críticos en el curso de enfermedades neurodegenerativas, presenta actividad antiproteotóxica. Este compuesto al proteger del estrés oxidativo estimula los sistemas de defensa celular y su efecto se evidencia en los animales modelos de EP porque su incubación i) mejora la viabilidad alterada en estos modelos (reflejado en los comportamientos de locomoción y progenie) y ii) disminuye el número de agregados proteotóxicos.

OBJETIVOS:

El presente plan de trabajo se propone evaluar el efecto del geraniol en modelos de Parkinson en *C. elegans.*

Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto del geraniol en la viabilidad de organismos modelos de EP usando la cepa NL5901 y el análisis de parámetros tales como la locomoción y el número de progenie dejada.

2. Evaluar el efecto del geraniol sobre la formación de agregados de α-sinucleína usando la cepa NL5901 que posee el reportero fluorescente *Yellow Fluorescence Protein* (YFP) acoplado a la α-sin. Como parámetros analizaremos la cantidad de agregados y la fluorescencia emitida por el marcador YFP.

MATERIALES Y MÉTODOS:

- **Cepas de *C. elegans***

-N2 salvaje

-NL5901 [(unc-54p::α-sinucleína::YFP + unc-119(+))]: Cepa modelo de enfermedad de Parkinson, que sobre-expresa α-sinucleína humana fusionada a YFP en células musculares (24) y presenta un fenotipo descoordinado.

Las cepas utilizadas provienen del *Caenorhabditis Genetic Center* y se encuentran disponibles en el laboratorio de Neurobiología de Invertebrados.

Los nematodos fueron cultivados bajo técnicas de cultivo estándar (17), a 20°C en agar NGM (*Nematode Growth Medium*) sembradas con una gota de un cultivo de *Escherichia coli* OP50 (crecido en medio Luria-Bertani, LB) que sirve como alimento.

- **Preparación de los medios de cultivo**

Se elaboraron medios de cultivo con las concentraciones finales de geraniol indicadas en cada ensayo disuelto en NGM y los respectivos controles sin geraniol (control 1) y la presencia únicamente del vehículo (control 2) dimetilsulfóxido (DMSO), que permite su solubilización en medio acuoso.

- **Sincronización de ejemplares**

Antes de llevar a cabo los ensayos a continuación descriptos, los animales fueron sincronizados partiendo de huevos de una misma puesta, con el fin de minimizar variaciones debidas a los diferentes estadios de su ciclo de vida. La sincronización se realizó mediante el aislamiento de 5-8 animales grávidos en cápsulas conteniendo el NGM durante 6-8 hs. Finalizado ese periodo, las madres fueron removidas y solo los huevos fueron conservados para realizar los diferentes experimentos.

- **Ensayos de movilidad o locomoción**

La tasa de cambios de curvatura, conocida como *thrashes*, se determina colocando animales individuales en una gota de medio líquido M9 y, después de 1 minuto de recuperación, se cuenta el número de cambios de curvatura que sufre la parte media del cuerpo del animal durante un período de 30 segundos, tal como se describió previamente (36, 37). Se evaluó la movilidad de animales modelos de EP que expresan agregados de α-sin en sus células musculares (cepa NL5901) presentando un fenotipo descoordinado (36) y animales salvajes (cepa N2). Los animales fueron evaluados inicialmente bajo las siguientes condiciones: 0 μM geraniol (Control), DMSO (control vehículo), geraniol 10 μM y 100μM. Debido a que durante el desarrollo de esta tesina se realizó la puesta a punto de este ensayo, conforme se obtenían las primeras observaciones se decidió eliminar el tratamiento de 10 μM geraniol y adicionar uno de geraniol 300μM debido a que la primera parecía no tener efecto alguno.

Para estudiar el efecto en las diversas edades, los animales fueron expuestos desde huevos hasta distintas etapas del desarrollo (L4, Adultos de 1, 4 y 7 días), en las cuales fue evaluada la movilidad. Para cada condición se evaluaron al menos 12 animales. El ensayo fue repetido al menos tres veces.

- **Evaluación del número de Progenie**

Los animales salvajes y modelos de Parkinson fueron expuestos desde huevos a la condición control (sin geraniol) o tratamiento (geraniol 300 μM) y se realizó un recuento de la progenie dejada por cada individuo cada 24 hs, hasta que culminó el periodo fértil de cada cepa. El experimento se realizó por triplicado, una única vez.

- **Ensayos de microscopía: Determinación del número de agregados proteicos**

Para determinar el efecto del geraniol en la modulación de los agregados proteicos se utilizaron técnicas de microscopía. Los animales transgénicos que expresan agregados fluorescentes (α-

sin::YFP) se cultivaron en placas conteniendo las mismas concentraciones utilizadas para ensayos anteriores: 0 μM geraniol, DMSO, y geraniol (10 μM, 100 μM y 300 μM) de igual manera que fue descripto en el ensayo anterior, posteriormente se optó por desestimar el tratamiento de geraniol 10 μM.

Para su observación bajo microscopio, los nematodos fueron montados entre porta y cubreobjetos en soportes de agarosa al 2% e inmovilizados con 10 mM de azida de sodio. Los animales fueron observados a distintas edades (adultos de 1, 2 y 4 días). Se capturaron imágenes de los mismos para su posterior análisis por el programa Image-J. Los datos fueron analizados bajo dos métodos: en primer lugar, se determinó la fluorescencia media emitida por la porción anterior de cada animal (hasta el segundo bulbo faríngeo) y, los valores obtenidos fueron relativizados en base a la media del control sin geraniol. En segunda instancia, se realizó un conteo del número de agregados presentes en la misma región sólo en animales adultos de 2 y de 4 días (ya que en animales más jóvenes el número de agregados es muy bajo). En estas edades es relativamente más fácil visualizar y contar los agregados y se posee un número estadísticamente representantivo. Para cada experimento se analizaron al menos 12 imágenes por condición.

- **Análisis estadístico:**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaPlot 14.0

Para analizar la tasa de curvatura de los animales, debido al fallo en la suposición de normalidad (Test de Normalidad (Shapiro-Wilk): ($P<0,050$)), se optó por comparar las medianas de los datos mediante One-Way 19nálisis of variance on ranks (ANOVA on ranks) debido a su robustez en casos donde el supuesto de normalidad es violado. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con valores de $p<0,05$(*) y altamente significativas con valores de $p<0,01$(**) ó $p<0,001$(***). Si las diferencias en medianas analizadas en los tratamientos eran significativamente

diferentes ($p<0,05$), se realizó un método de comparación múltiple (Dunn's Method) para aislar el grupo que difiere significativamente de los controles (sin geraniol y vehículo DMSO).

Los tratamientos en las curvas de recuento de progenie fueron analizados mediante un t-test de Student.

Para la elaboración de los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS:

Basándose en los resultados previos descriptos y dado la relación que existe entre el estrés oxidativo y la proteotoxicidad continuamos el estudio de la actividad del geraniol en modelos de enfermedades neurodegenerativas en *C. elegans*. Para este estudio se llevaron a cabo los ensayos de la presente tesis de grado, centrándose en los efectos del geraniol sobre la cepa NL5901 modelo de la enfermedad de Parkinson en *C. elegans*.

1- El geraniol mejora los fenotipos afectados por la agregación de proteínas en los modelos de Parkinson

La alteración en la proteostasis y la consecuente acumulación de agregados proteicos son características comunes del envejecimiento y las enfermedades ND. Como se mencionó en los resultados previos el geraniol demostró mejorar la resistencia al estrés oxidativo en animales salvajes. El aumento en la resistencia al estrés oxidativo se relaciona ampliamente con una mayor capacidad de proteostasis (15), por esta razón se analizó si el geraniol puede reducir la protetoxicidad en los modelos de Parkinson en *C. elegans*.

Si bien en *C. elegans* no se ha podido detectar la presencia de α-sinucleína (principal proteína que se vuelve tóxica en la enfermedad de Parkinson) se han podido generar los modelos en base a la expresión transgénica de dicha proteína en las células musculares. La cepa NL5901, utilizada en este trabajo, precisamente presenta agregados de α-sin en músculo y presenta un fenotipo muy claro de movilidad reducida. Por esta razón decidimos utilizar la locomoción como medida de la evolución de la toxicidad de los agregados en diferentes edades del animal.

Primeramente y como era de esperar, en todos los estadios evaluados, se observa una clara diferencia entre la movilidad de las cepas salvaje (N2) y la cepa modelo de Parkinson (NL5901)

siendo esta última la que menor tasa de curvaturas por minuto presenta en todas las condiciones evaluadas.

En la **Figura 7 A** se observan los *thrashes* por minuto de los animales en estadio L4. Se evidencia la marcada diferencia de movilidad entre ambas cepas. El promedio de *thrashes* por minuto del control de la cepa N2 es de 186 ± 27, mientras que la cepa NL5901 realizó en promedio 146 ± 54 curvaturas por minuto. En cuanto al análisis del tratamiento con geraniol, en este estadio solo se encontró diferencia significativa en las medianas en la cepa N2 tratado con 10 µM de geraniol respecto al control sin geraniol (P=0,017) (*). Las diferencias entre los valores de las medianas entre los tratamientos no presentan diferencia significativa en la población NL5901 (P = 0,730).

La **Figura 7 B** muestra los *thrashes* por minuto de los adultos de 1 día de las cepas N2 y NL5901 respectivamente. La diferencia de movilidad entre cepas puede observarse al comparar los controles, donde la cepa N2 presenta en promedio 205 ± 25 curvaturas por minuto, mientras que los animales control de la cepa NL5901 se movieron en promedio 154 ± 24 veces por minuto. El geraniol produce un efecto positivo en la movilidad que se evidencia en los adultos de 1 día de la cepa NL5901 tratados con geraniol 300 µM en comparación con ambos controles (a) Sin geraniol (P=0,004) (**) y (b) DMSO (P<0,001) (***). Por otro lado, no parece tener efecto significativo sobre la movilidad de la cepa salvaje (N2).

Como la acumulación de los agregados tóxicos y el efecto en el deterioro de la movilidad se incrementa con la edad, decidimos prolongar el estudio hasta edades más avanzadas. Estudiamos los días 4 (el cual representa un estadío del animal de adulto mayor) y el día 7 (el cual representa un animal envejecido).

En la **Figura 7 C** se observan los *thrashes* por minuto de los adultos de 4 días. Allí, se observa la misma tendencia de los grupos anteriores de mayor movilidad de la cepa salvaje. Como mencionamos, el aumento de la acumulación de proteoagregados hace que las diferencias de

movilidad entre la cepa salvaje y enferma sean aún más notorias. El control de la cepa N2 tiene un promedio de curvaturas por minuto de 223 ± 35, mientras que el control de la cepa NL5901 tiene un promedio de curvaturas por minuto de 132 ± 30. Las diferencias entre los valores de las medianas entre los tratamientos no presentan diferencia significativa tanto en la población N2 (P = 0,126) como la NL5901 (P = 0,894).

Finalmente, los resultados de *thrashes* por minuto de los adultos de 7 días, es decir un animal muy afectado, se encuentran en la **Figura 7 D**. En estos, es posible observar la diferencia entre ambas cepas. El control de la cepa N2 realizó 227 ± 32 *thrashes* por minuto, mientras que la cepa NL5901 realizó 123 ± 36 *thrashes* por minuto. Por otro lado, las diferencias entre los valores de las medianas entre tratamientos tampoco presentan diferencia significativa tanto en la población N2 (P = 0,228) como la NL5901 (P = 0,156).

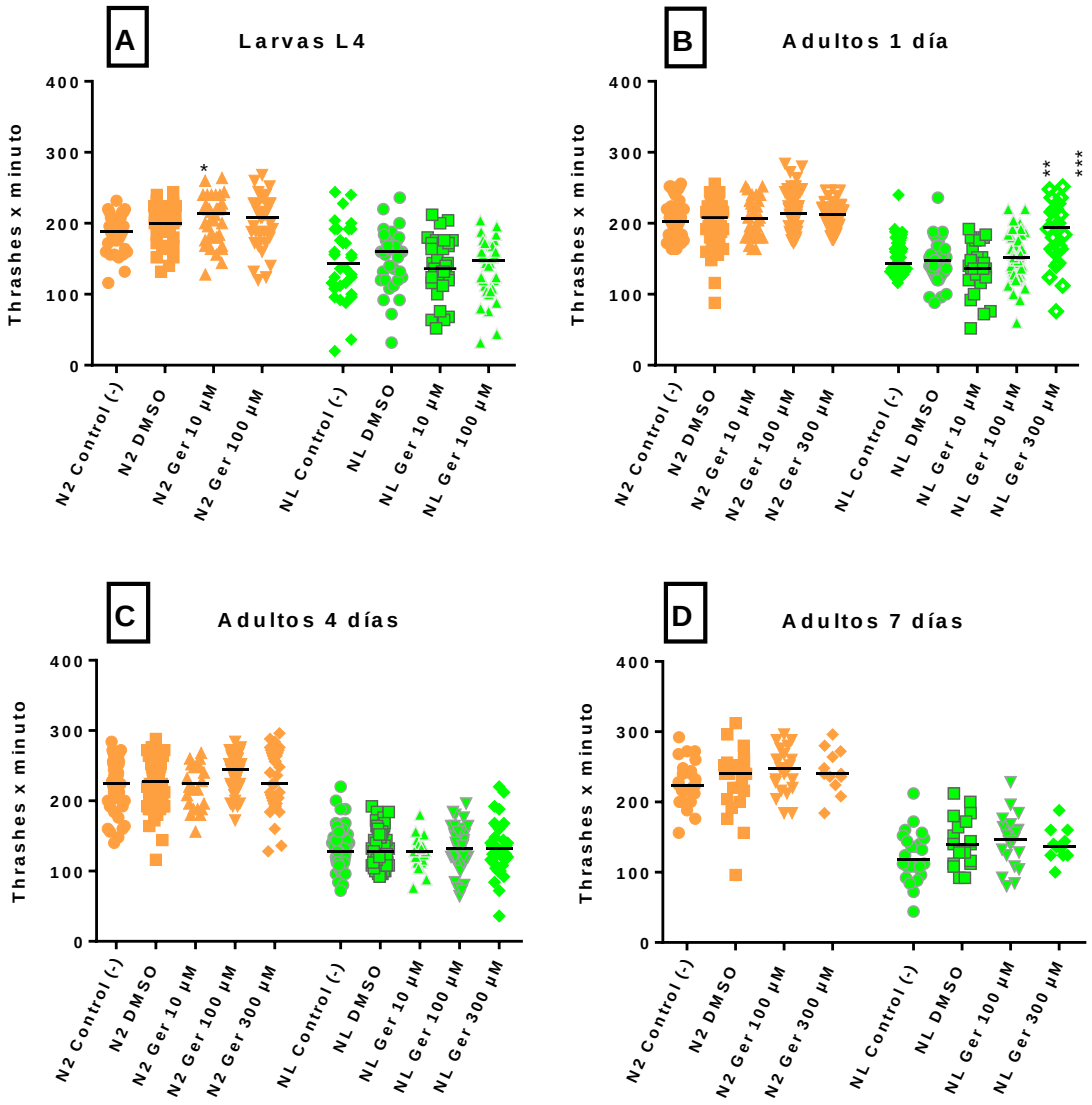

Figura 7: Movilidad de animales salvajes (N2) y modelos de EP (NL5901) tratados con geraniol. La figura detalla los resultados de los *thrashes* por minuto bajo las condiciones evaluadas (control (-) sin geraniol, control DMSO y geraniol (Ger) 10, 100 y 300 µM) en animales L4 (A), adultos de 1 día (B), adultos de 4 días (C) y adultos de 7 días (D) de las cepas N2 (símbolos naranjas) y NL5901 (NL, símbolos verdes). En la figura A se indica con * (p=0,017) la diferencia significativa en los animales de la cepa N2 tratados con geraniol 10 µM respecto al control sin geraniol. En la figura B se indica con ** la diferencia altamente significativa (p=0,004)

respecto al control sin geraniol y con *** ($p<0,001$) la diferencia altamente significativa respecto al control con DMSO. Las líneas indican el valor de la mediana.

Por otro lado, un parámetro muy utilizado para evaluar el bienestar de un animal es su fecundidad y capacidad para dejar descendencia. Al igual que la movilidad, el recuento de progenie que deja un individuo puede ser informativo acerca de su viabilidad, la **Figura 8** muestra el recuento de progenie de animales N2 (sin geraniol y geraniol 300 µM) y los mismo para animales NL5901. Como se ve en la figura, la puesta de huevos de los animales posee una cinética definida. Los animales salvajes producen en total unos 300 huevos principalmente en los primeros 5 días de alcanzado el estadio adulto. En el día 2 los animales salvajes presentan el pico máximo en el número de huevos puestos, siendo este valor cercano al 50% de la puesta total, es decir alrededor de 140 ± 10. Para los animales NL5901, en este día también se observa un pico en el número de huevos. Sin embargo, en este caso el número es inferior al salvaje siendo alrededor de un 68,5% del anterior (96 ± 7 huevos). En este punto, el geraniol no parece tener ningún efecto en los animales N2 o en los NL5901, ya que ambas curvas (control y geraniol 300 µM) muestran el mismo comportamiento. Siguiendo con el análisis, es interesante observar lo ocurrido en el día 3 del ensayo. Los animales N2 presentan un descenso del alrededor del 57% en la oviposición. Similar a lo ocurrido en el punto anterior, el tratamiento con geraniol parece no afectar este comportamiento. Cuando analizamos la cepa enferma podemos observar que los animales NL5901 de la condición control pusieron en promedio un 22% menos huevos, notándose un descenso en la puesta similar al animal salvaje. De manera interesante, los animales enfermos tratados con geraniol mostraron un ascenso en la misma, elevando la puesta de huevos un 15%. Estos resultados nos podrían sugerir un desplazamiento de la curva de oviposición hacia tiempos más prolongados, lo que indicaría una mejora en la viabilidad de los animales enfermos tratados con geraniol.

A pesar de la tendencia mencionada en los animales NL5901 no se encontraron diferencias significativas que respalden dicha observación y esto puede ser debido a que el ensayo fue realizado en una oportunidad (por triplicado) y resulta necesario realizar más repeticiones.

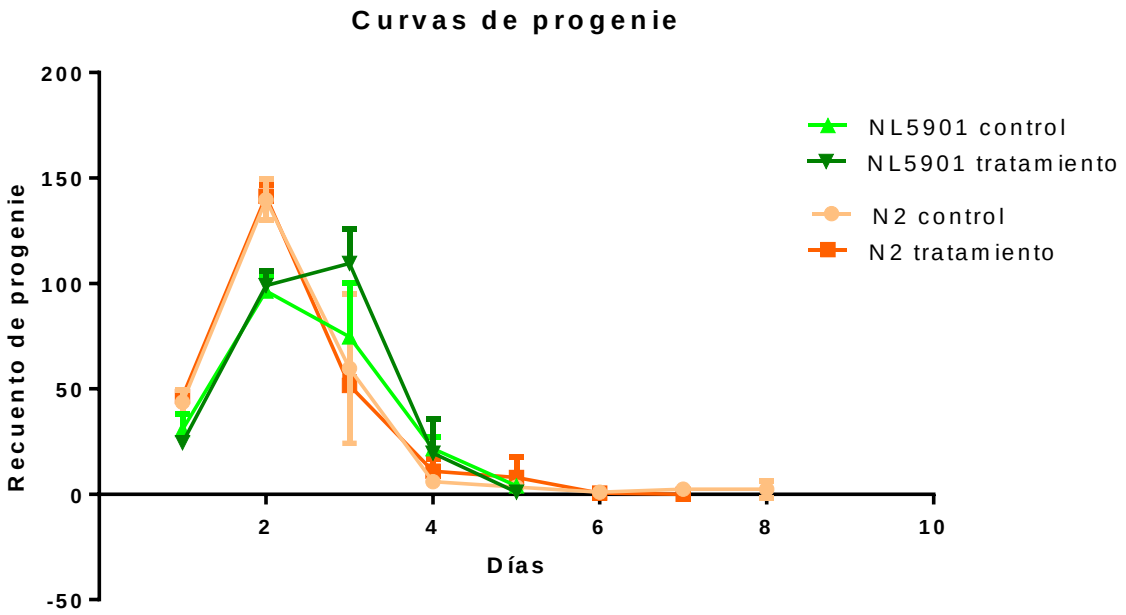

Figura 8: Curvas de progenie de animales salvajes (N2) y modelos de EP (NL5901). Se muestran los resultados del recuento de huevos puestos por individuo de las cepas N2 (líneas naranjas) y NL5901 (NL, líneas verdes) para el control (sin geraniol) y el tratamiento (geraniol 300 µM). Se indican valor medio y desvío estándar.

2-El geraniol afecta el número de agregados presentes en los modelos de Parkinson?

Numerosa evidencia científica sugiere que la inducción de la degradación de la proteína patológica o la prevención de su agregación puede ser una estrategia efectiva frente a enfermedades proteotóxicas (36, 39, 40).

Como el modelo de EP expresa la proteína patológica fusionada al marcador YFP (**Figura 9**), es posible cuantificar fácilmente la agregación proteica midiendo la intensidad de fluorescencia y/o el número de agregados proteicos.

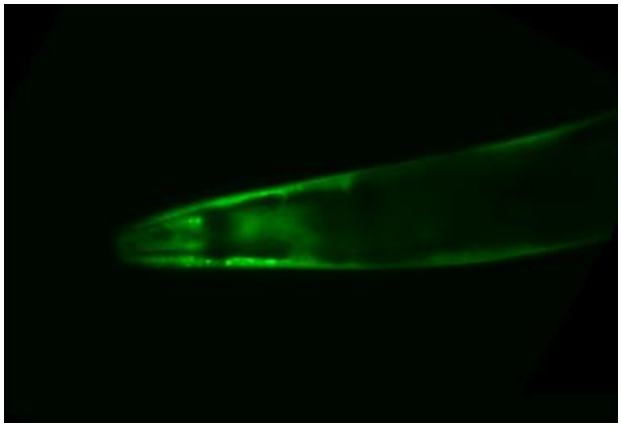

Figura 9: Imagen obtenida por microscopía de fluorescencia de la región anterior de los animales de la cepa NL5901, modelo de enfermedad de Parkinson. Se observa la fluorescencia emitida por el marcador YFP asociado a los agregados de α-sinucleína.

En una primera instancia, se procedió a medir la fluorescencia media emitida por la región comprendida por los primeros dos bulbos faríngeos en los animales NL5901 bajo las condiciones mencionadas (control, DMSO, geraniol 10, 100 y 300 µM).

Decidimos evaluar los días 1 y dia 4 de adulto, para correlacionar si la mejora en la movilidad observada en los adultos de 1 día podía atribuirse a un descenso en la agregación tóxica.

En la **Figura 10** se observan los valores de fluorescencia media emitida (relativizada al control de cada ensayo). Tanto en la imagen **A** (adultos de 1 día) como **B** (adultos de 4 días), se observa la misma tendencia de aumento en la fluorescencia media en animales tratados con geraniol 300 µM, siendo solo significativa la diferencia en los animales adultos de 1 día respecto al control sin geraniol (P= 0,044) (*) y el control DMSO (P= 0,003) (**). Estos resultados se oponen a lo esperado inicialmente.

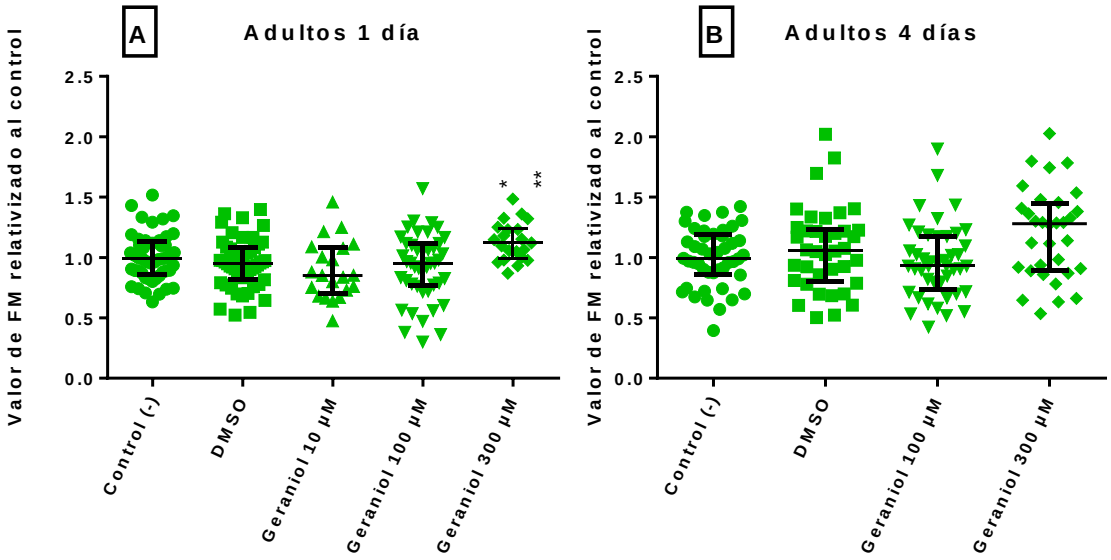

Figura 10: Cuantificación de la fluorescencia de animales de la cepa NL5901. En la figura se detallan los resultados obtenidos al medir la fluorescencia media (FM) en animales adultos de 1 día (A) y 4 días (B), la misma se expresa relativizada al control (-) sin geraniol de cada experimento. En la figura A se indica con * (P=0,044) la diferencia significativa del tratamiento con geraniol 300 µM respecto al control sin geraniol y con ** (P=0,003) la diferencia altamente significativa respecto al control DMSO. Las líneas indican valor de la mediana y rango intercuartil.

Debido al resultado inesperado del aumento de la intensidad de la fluorescencia en los animales tratados con geraniol, decidimos cambiar la forma de análisis de los agregados. Nos planteamos una segunda metodología y se procedió a contar manualmente la cantidad de agregados de α-sinucleína presentes en cada uno. Este tipo de análisis es reconocido en otros modelos de neurodegeneración de *C. elegans* tal como se lleva a cabo en los modelos de Huntington con los agregados de poli-glutamina (41).

Si bien al cuantificar la intensidad de fluorescencia trabajamos con los días 1 y 4, al contabilizar los agregados en adultos de 1 día, no pudimos realizar ningún tipo de análisis ya que en promedio suelen verse menos de 10 agregados y de forma difusa (lo cual dificulta su cuantificación). Por esta razón, decidimos continuar con el estudio del día 4 ya que en este estadio la cantidad de datos obtenidos era estadísticamente representativo (promedio de 62 ± 20 agregados/animal) y, al haber un progreso en el tiempo (que se correlaciona con un progreso en la enfermedad) los agregados son más fáciles de observar al microscopio (**Figura 11**).

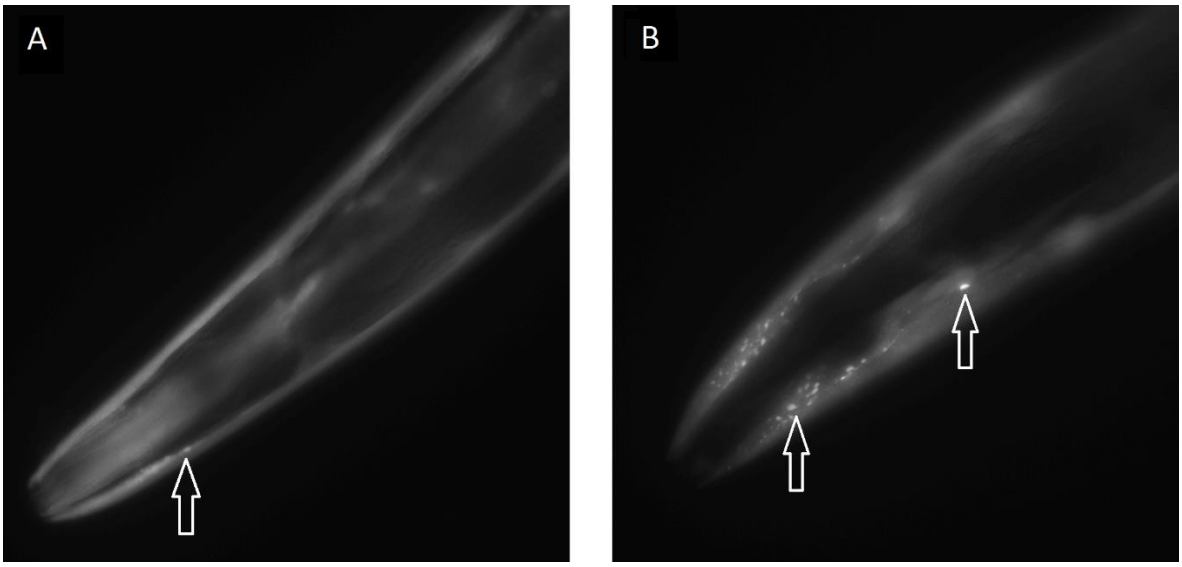

Figura 11: Imágenes obtenidas de la porción anterior de animales de la cepa NL5901. Se estudiaron animales adultos de 1 día (A) y adultos de 4 días (B). Las flechas marcan distintos agregados de α-sinucleína para su observación.

En la **Figura 12** se observa el recuento de agregados de las condiciones control, DMSO y geraniol 100 y 300 µM. A pesar de que los tratamientos muestran una tendencia a disminuir el número de agregados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P = 0,296).

Estos resultados nos indican en primer lugar que la intensidad de la fluorescencia no estaría indicando proporcionalmente el número de agregados patológicos.

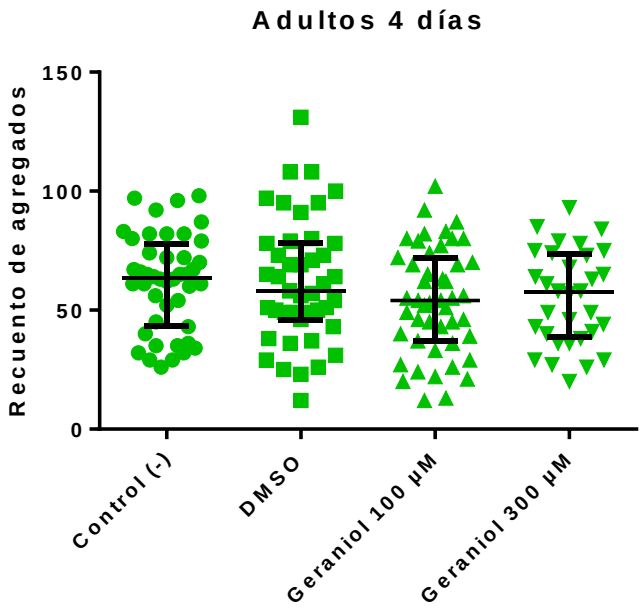

Figura 12: Recuento de agregados de α-sin en los animales NL5901. En la figura se indica la cantidad de agregados presentes en animales adultos de 4 días bajo los tratamientos indicados. Se muestra el valor de la mediana y rango intercuartíl.

Debido a que en la evaluación del número de agregados en el día 4 no logramos detectar una mejora, replanteamos el experimento buscando analizar un día más cercano al día en el cual la movilidad en los animales tratados con geraniol se mostró mejorada. Como mencionamos que el día 1 no presenta un número representativos de agregados (**Figura 8**) decidimos realizar la cuantificación de agregados en adultos de 2 días.

Como muestra la **Figura 13** en los animales adultos de 2 días se observó un marcado descenso en el número de agregados en los animales tratados con geraniol. Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con geraniol 10 µM (P<0,001) (***) y 100 µM (P=0,001) (**) respecto al control sin geraniol. Respecto al DMSO se observa una tendencia a disminuir los

agregados presentes, pero no se hallaron diferencias significativas respecto al control sin geraniol (P=0,063). Si bien estos resultados son auspiciosos, son preliminares, ya que se realizó una única vez y en un rango de concentraciones diferente a los estudiados en otros días.

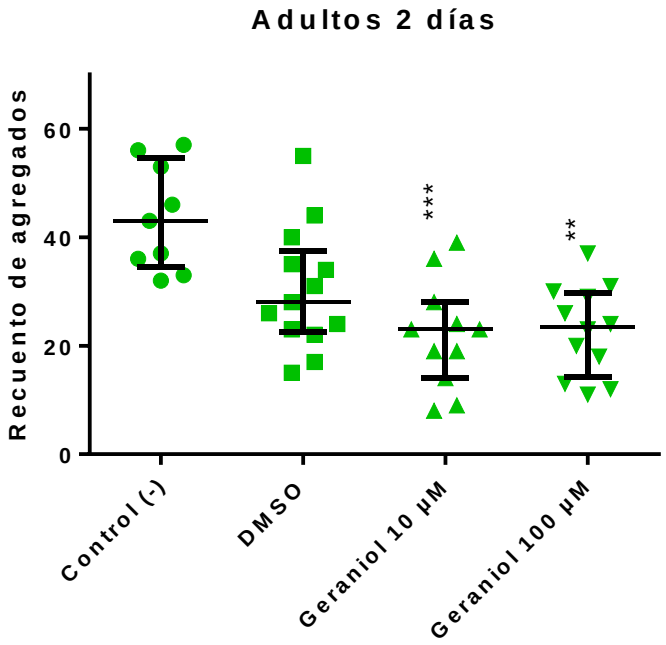

Figura 13: Recuentos de agregados de α-sin en animales modelos de EP. En la figura se indica la cantidad de agregados presentes en animales adultos de 2 días de la cepa NL5901 bajo los tratamientos indicados. Se indica valor medio y desvío estándar. Los *** (P<0,001) indican diferencias altamente significativas del tratamiento con geraniol 10 µM respecto al control (-) sin geraniol. Los ** (P=0,001) indican diferencias altamente significativas del tratamiento con geraniol 100 µM respecto al control (-) sin geraniol. Se muestran medianas y rango intercuartil.

Conclusión:

Nuestros resultados en cepas modelo de la enfermedad de Parkinson indican que, en las etapas más tempranas de la progresión en el acúmulo de agregados proteotóxicos, el geraniol puede

disminuir el deterioro de la movilidad característico de estos modelos. Por otro lado, esta mejora podría deberse a una disminución en el número de agregados, ya que en estas mismas etapas se pudo determinar un descenso en el número de proteoagregados en los animales tratados con este aceite.

DISCUSIÓN:

La prolongación de la longevidad conlleva al aumento en la prevalencia de patologías asociadas a la edad como son las ND. Hoy en día este tipo de desórdenes afecta a alrededor del 1% de la población mundial. En 2019 el Consorcio Internacional de Demencia para América Latina y el Caribe (LAC-CD) estimó que este número se cuatriplicará para el año 2050.

La enfermedad de Parkinson es la segunda ND más común (12) y en la actualidad no existen tratamientos farmacológicos específicos para tratarla. Por esta razón, resulta necesario fomentar enfoques innovadores para el desarrollo de terapias para este tipo de patologías.

En este punto *C. elegans* se erige como modelo idóneo para el desarrollo de terapias, ya que, entre las numerosas ventajas de su uso, podemos mencionar que este organismo presenta grandes similitudes neuronales con vertebrados, un conectoma neuronal ampliamente conocido, un ciclo de vida corto que permite tiempos de investigación cortos y con un gran número de ejemplares. También posibilita el empleo de un organismo entero que permite seguimiento *in vivo* de la patología sin desestimar la modulación sistémica. Además, se puede acceder a cepas modelos de enfermedades ND.

En este trabajo se utilizó la cepa NL5901 modelo de Parkinson en *C. elegans* que expresa a nivel muscular la proteína α-sin que caracteriza la enfermedad (24). En ella se estudiaron los efectos del geraniol, componente principal del AE de rosas por sus amplios beneficios reportados como antioxidante natural.

Para el desarrollo se utilizaron resultados de análisis previos del laboratorio de Neurobiología de Invertebrados en los cuales se evaluó el efecto del geraniol sobre la cepa salvaje de *C. elegans*. Estos resultados indican, en primer lugar, que el geraniol suministrado en altas concentraciones (más de 8 veces la concentración utilizada en los experimentos posteriores) presenta un efecto deletéreo tanto en animales adultos como en huevos. Esto concuerda con lo reportado por Abdel-Rahman *et al*

en 2013 (38), donde se confirmó el rol nematicida dependiente de dosis del geraniol. En ensayos posteriores se emplearon concentraciones que demostraron no tener efecto sobre la sobrevida ni tampoco afectar los tiempos de desarrollo del animal salvaje.

También se habían puesto a prueba los efectos antioxidantes del geraniol reportados en numerosas investigaciones (26, 31, 32, 33, 34), y se observó que los animales salvajes tratados con geraniol demuestran mayor resistencia ante el factor estresante ($FeSO_4$). Esta observación es de gran importancia al evaluar drogas con potencial efecto terapéutico frente a NDs, ya que el estrés oxidativo puede inducir la agregación proteica y culminar en un estado patológico.

Existen varios mecanismos por los cuales se puede aumentar la resistencia al EO. Muchos implican la regulación positiva de mecanismos que se han descripto también como involucrados en el mantenimiento de la homeostasis proteica. La altamente conservada via de la insulina DAF-2/IGF-1 juega un rol clave en la respuesta al estrés desde gusanos a mamíferos. La activación de DAF-2 conduce a la fosforiliación y secuestro citoplasmático de numerosos factores de transcripción conservados como DAF-16 (FOXO en mamíferos), SKN-1 (NFR-2 en mamíferos) y HSF-1. (42, 43, 44). El mecanismo molecular por el cual el geraniol induce esta protección asi como la/s vía/s involucrada/s en el aumento de la resistencia al EO será determinada en ensayos posteriores empleando animales mutantes deficientes en las respectivas vías.

El aumento en la resistencia al estrés oxidativo se relaciona ampliamente con una mayor capacidad de proteoestasis (15), por esta razón se analizó si el geraniol puede reducir la protetoxicidad en la cepa NL5901 modelo de Parkinson en *C. elegans*. Esta cepa expresa los agregados de α-sin en las células musculares (24) y presenta un fenotipo descoordinado, fácil de ser evaluado. En los ensayos de movilidad en la cepa modelo de enfermedad, el geraniol demostró mejorar el fenotipo descoordinado en animales adultos de 1 día. Resultados similares se reportaron en modelos de Parkinson en *Drosophila melanogaster*, en los cuales el suministro de geraniol mejoraba la habilidad de escalar respecto al control (45) En animales de mayor edad no se detectaron mejoras en el fenotipo.

Esto puede entenderse al considerar que el principal factor causante del progreso de las enfermedades ND es la edad, con el concomitante incremento de los agregados proteotóxicos, y conforme esta avanza, es probable que el efecto del geraniol se vea sobrepasado.

La otra medida de viabilidad analizada en esta tesis fue la progenie dejada por individuos sanos y modelos de EP. El comportamiento de puesta de huevos posee una cinética definida y ésta se ve afectada en los animales modelos de EP. Los resultados preliminares obtenidos indican que el geraniol parece desplazar la curva en animales enfermos evidenciándose un alza en el número de huevos puestos al día 3 del estudio. Esto se podría relacionar con una mejora en la viabilidad de los animales, siendo resultados muy interesantes que merecen ser profundizados. Como se mencionó anteriormente, es necesario repetir el ensayo para obtener resultados concluyentes.

El foco actual en el desarrollo de drogas terapéuticas para NDs se centra en disminuir la presencia de agregados proteotóxicos (36, 39, 40). Por esta razón procedimos a medir la fluorescencia media emitida por la porción anterior de los animales. Inesperadamente, nuestros resultados muestran que el geraniol aumenta significativamente la fluorescencia emitida por la proteína marcadora YFP ligada a la α-sinucleína en adultos de 1 día, la misma tendencia parece darse en adultos de 4 días, pero sin ser significativa. Podría pensarse que la fluorescencia depende de la cantidad de agregados presentes y en parte esto es así, ya que la misma depende del marcador YFP ligado a los agregados proteotóxicos. Pero este aumento de fluorescencia puede no deberse a aumentos en los mismos, si no a otras características de los agregados como su densidad o su tamaño. A raíz de los resultados anteriores decidimos cambiar la metodología y realizar la cuantificación de agregados en animales enfermos. En adultos de 1 día no es posible cuantificar agregados por microscopía debido al corto tiempo de transcurso de la enfermedad y el poco desarrollo de los agregados. Debido a esto, en primer lugar, se optó por cuantificar agregados en adultos de 4 días debido a su mayor presencia y fácil visualización. Los resultados obtenidos de cuantificar la presencia de agregados en adultos de 4 días indican que no hay una correlación directa del aumento de fluorescencia media con la cantidad de

agregados. Si bien no se hallaron diferencias significativas en el número de agregados, puede estimarse un descenso y en consecuencia una tendencia incluso inversa entre los resultados obtenidos al analizar la intensidad de la fluorescencia y el número de agregados. Por otra parte, los resultados preliminares obtenidos en adultos de 2 días, muestran un descenso significativo en el número de agregados, lo que apoya la relación opuesta entre intensidad de fluorescencia y número de agregados. De nuevo, la edad parece ser crucial en el progreso de la enfermedad y el efecto positivo del geraniol observado en adultos jóvenes podría verse sobrepasado al avanzar el curso de la proteinopatía. Como mencionamos anteriormente, existen diversas razones (vinculadas directamente a la conformación del agregado) por las cuales los valores de fluorescencia media y número de agregados pueden no correlacionarse. Será necesario realizar ensayos posteriores para esclarecer la causa de estos resultados.

En conjunto, durante el desarrollo de esta tesina obtuve el entrenamiento básico para trabajar con el modelo *C. elegans*. Me capacité en el cultivo, en la realización de ensayos comportamentales y de microscopía, más allá de adquirir las herramientas necesarias para diseñar un experimento y analizar los datos obtenidos con rigurosidad científica. Los resultados de esta tesina son prometedores respecto a un efecto benéfico del geraniol en las enfermedades que cursan con proteotoxicidad (tal como es la enfermedad de Parkinson) y sientan las bases para la proyección de nuestros futuros experimentos. En los próximos ensayos profundizaremos nuestras observaciones en adultos jóvenes, ya que en ellos se observan mejoras significativas en el curso de la enfermedad tanto en la sintomatología como a nivel molecular. También tenemos como objetivos dilucidar los mecanismos moleculares implicados en el efecto antioxidante del geraniol y desarrollar modelos de ND en *C. elegans* que permitan la inducción temporal de la enfermedad, lo cual representa más fielmente la condición observada en las las patologías ND.

BIBLIOGRAFÍA:

1-Gorman, A. M. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. J. Cell Mol. Med 12, 2263-2280, (2008).

2-Morfini, G., Pigino, G. & Brady, S. T. Polyglutamine expansion diseases: failing to deliver. Trends in molecular medicine 11, 64-70, (2005).

3-Vila, M. & Przedborski, S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. Nature medicine 10 Suppl, S58-62, (2004).

4- Spillantini, M.G., R.A. Crowther, R. Jakes, M. Hasegawa, and M. Goedert. 1998. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6469-6473.

5- Moneim, A. E. Oxidant/Antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res 12, 335-349, (2015).

6- Sala, A. J., Bott, L. C. & Morimoto, R. I. Shaping proteostasis at the cellular, tissue, and organismal level. J Cell Biol 216, 12311241, (2017).

7- Kaletta, T. & Hengartner, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. Nat Rev Drug Discov 5, 387-398, (2006).

8- Markaki, M. & Tavernarakis, N. Modeling human diseases in Caenorhabditis elegans. Biotechnol J 5, 1261-1276, (2010).

9- Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS, & Lin W (2000) Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics. Genome Res 10(5):703-713.

10- Kim W, Underwood RS, Greenwald I, & Shaye DD (2018) OrthoList 2: A New Comparative Genomic Analysis of Human and Caenorhabditis elegans Genes. Genetics 210(2):445-461.

11- Shaye DD & Greenwald I (2011) OrthoList: a compendium of C. elegans genes with human orthologs. PLoS. One 6(5):e20085.

12- Feigin VL, N.E., Alam T, Bannick MS, Beghi E, Blake N, et al. 2019. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet. Neurology*. 18:459-480.

13- Lees, A.J., J. Hardy, and T. Revesz. 2009. Parkinson's disease. *Lancet*. 373:2055-2066.

14- Lim, K.L., and C.H. Ng. 2009. Genetic models of Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta*. 1792:604-615.

15- Blesa, J., I. Trigo-Damas, A. Quiroga-Varela, and V.R. Jackson-Lewis. 2015. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*. 9:91.

16- Samuel BS, Rowedder H, Braendle C, Félix M- A, Ruvkun G. Caenorhabditis elegans; responses to bacteria from its natural habitats. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(27):E3941. https://doi.org/10.1073/pnas.1607183113.

17- Brenner S. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics. 1974;77(1):71- 94.

18- Girard LR, Fiedler TJ, Harris TW, et al. WormBook: The online review of Caenorhabditis elegans biology. Nucleic Acids Res. 2007;35(Database):D472- D475. https://doi.org/10.1093/nar/gkl894.

19- Cassada RC, Russell RL. The dauerlarva, a post- embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev Biol. 1975;46(2):326-342. https://doi.org/10.1016/00121606(75)90109-8

20- Golden JW, Riddle DL. A pheromone influences larval development in the nematode Caenorhabditis elegans. Science. 1982;218(4572):578- 580. https://doi.org/10.1126/science.6896933

21- Giunti, S., Andersen, N., Rayes, D., & De Rosa, M. J. (2021). Drug discovery: Insights from the invertebrate Caenorhabditis elegans. *Pharmacology Research & Perspectives*, *9*(2), e00721.

22- Cao, S., C.C. Gelwix, K.A. Caldwell, and G.A. Caldwell. 2005. Torsin-mediated protection from cellular stress in the dopaminergic neurons of Caenorhabditis elegans. J Neurosci. 25:3801-3812.

23- Gaeta, A.L., K.A. Caldwell, and G.A. Caldwell. 2019. Found in Translation: The Utility of C. elegans Alpha-Synuclein Models of Parkinson's Disease. *Brain sciences*. 9.

24- van Ham, T.J., K.L. Thijssen, R. Breitling, R.M. Hofstra, R.H. Plasterk, and E.A. Nollen. 2008. C. elegans model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS Genet*. 4:e1000027.

25- Mancianti, F. & Ebani, V. V. Biological Activity of Essential Oils. Molecules 25, (2020).

26- Mączka, W., Wińska, K. & Grabarczyk, M. One Hundred Faces of Geraniol. Molecules 25, 3303, (2020).

27- Ayaz, M. et al. Neuroprotective and Anti-Aging Potentials of Essential Oils from Aromatic and Medicinal Plants. Front Aging Neurosci 9, 168, (2017).

28- Banu, F., N. Dawood, Y.S.L. Lakshmi, G. Sivaraman, and V. Brinda. 2014. Antioxidant activity of Geraniol on Nnitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in wistar albino rats. Ind. J. Oncol. Radiat. Biol. 2:4-9.

29- Chen, W., and A. Viljoen. 2010. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. South African Journal of Botany - S AFR J BOT. 76:643-651.

30- Kumar, M., and T. Devaki. 2015. Geraniol, a component of plant essential oils-a review of its pharmacological activities. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 7:67-70

31- Basim, E., and H. Basim. 2003. Antibacterial activity of Rosa damascena essential oil. Fitoterapia. 74:394-396.

32- Hajhashemi, V., A. Ghannadi, and M. Hajiloo. 2010. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Rosa damascena Hydroalcoholic Extract and its Essential Oil in Animal Models. Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR. 9:163-168.

33- Wei, A., and T. Shibamoto. 2007. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 55:1737-1742.

34- Yassa, N., F. Masoomi, S.E. Rankouhi, and A. Hadjiakhoondi. 2009. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Extract and Essential oil of Rosa damascena from Iran, Population of Guilan. Daru. 17:175-180.

35- Cuenca, L., A.L. Gil-Martinez, L. Cano-Fernandez, C. Sanchez-Rodrigo, C. Estrada, E. Fernandez-Villalba, and M.T. Herrero. 2019. Parkinson's disease: a short story of 200 years. Histology and histopathology. 34:573-591.

36- Cooper, J.F., D.J. Dues, K.K. Spielbauer, E. Machiela, M.M. Senchuk, and J.M. Van Raamsdonk. 2015. Delaying aging is neuroprotective in Parkinson's disease: a genetic analysis in C. elegans models. NPJ Parkinson's disease. 1:15022.

37- De Rosa, M.J., T. Veuthey, J. Florman, J. Grant, M.G. Blanco, N. Andersen, J. Donnelly, D. Rayes, and M.J. Alkema. 2019. The flight response impairs cytoprotective mechanisms by activating the insulin pathway. Nature. 573:135-138.

38- Abdel-Rahman, F. H., Alaniz, N. M., & Saleh, M. A. (2013). *Nematicidal activity of terpenoids. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 48(1), 16 22*. doi:10.1080/03601234.2012.716686

39- Bieschke, J. Natural compounds may open new routes to treatment of amyloid diseases. *Neurotherapeutics* **10**, 429–439 (2013).,

40- David, D. C. *et al*. Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **8**, 47–48 (2010).,

41- James F. Morley, Heather R. Brignull, Jill J. Weyers, and Richard I. Morimoto*Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Aug 6; 99(16): 10417–10422. Published online 2002 Jul 16. doi: 10.1073/pnas.152161099

42- Chávez, V., A. Mohri-Shiomi, A. Maadani, L.A. Vega, and D.A. Garsin. 2007. Oxidative stress enzymes are required for DAF-16-mediated immunity due to generation of reactive oxygen species by Caenorhabditis elegans. Genetics. 176:1567-1577.

43- Park, S.K., P.M. Tedesco, and T.E. Johnson. 2009. Oxidative stress and longevity in Caenorhabditis elegans as mediated by SKN-1. Aging Cell. 8:258-269.

44- Servello, F., and J. Apfeld. 2020. The heat shock transcription factor HSF-1 protects Caenorhabditis elegans from peroxide stress.

45- Siddique, Y. H., Naz, F., Jyoti, S., Ali, F., Fatima, A., Rahul, & Khanam, S. (2016). *Protective effect of Geraniol on the transgenic Drosophila model of Parkinson's disease. Environmental Toxicology and Pharmacology, 43, 225–231.* doi:10.1016/j.etap.2016.03.018