



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EFFECTOS DE LA DIETA SOBRE EL DESARROLLO, LA FERTILIDAD Y LA
INTEGRIDAD NEURONAL EN EL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN
BIOTECNOLOGÍA**

DANIELA FERNANDA PONCE MARIPANGUI

PROFESOR GUÍA:
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE
PROFESOR CO-GUÍA:
ALVARO MARÍA OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
ANDREA LEONOR CALIXTO MOHOR
ZIOMARA PATRICIA GERDTZEN HAKIM

SANTIAGO DE CHILE

2017

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
Ingeniera Civil en Biotecnología y grado de Magíster en
Ciencias de la Ingeniería, Mención Química.
POR: Daniela Fernanda Ponce Maripangui
FECHA: 13/01/2017
PROFESOR GUÍA: Oriana Salazar

EFFECTOS DE LA DIETA SOBRE EL DESARROLLO, LA FERTILIDAD Y LA INTEGRIDAD NEURONAL EN EL NEMATODO *CAENORHABDITIS ELEGANS*

La nutrición es un tema muy importante en la sociedad, ya que muchos alimentos consumidos por el ser humano difieren en su aporte nutricional, y se ve reflejado en aspectos físicos, fisiológicos y neurológicos. A partir de esto, se formuló la pregunta ¿cuáles son los efectos sistémicos de la dieta en *C. elegans*? Para responder a esta interrogante se utilizó como modelo de estudio biológico al nematodo bacterívoro *Caenorhabditis elegans* que, con una anatomía simple, posee 6 neuronas responsables de la respuesta al tacto. En el laboratorio, *C. elegans* puede ser alimentado con una serie de cepas y especies de bacterias. Alterando la dieta de *C. elegans* se puede afectar a un número de rasgos, incluyendo esperanza de vida, fecundidad y la tasa de bombeo faríngeo.

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar la actividad *in vivo* de diferentes dietas bacterianas suplementadas con azúcares sobre el desarrollo, la fertilidad y la integridad neuronal del gusano. Para lograr lo anterior se utilizan dos mutantes de *C. elegans*: un modelo de degeneración neuronal (*mec-4d*), que corresponde a un gusano que lleva una mutación en el canal MEC-4, que se expresa sólo en las neuronas del tacto y es responsable de regular el ingreso de sodio. Esta mutación provoca que el canal se abra constitutivamente provocando la muerte progresiva en esas neuronas; y un modelo de *C. elegans* asociado a la vía de señalización de la insulina. En este mutante a 25°C se bloquea el receptor de insulina DAF-2/IGF-1 evitando las fosforilaciones y por tanto, permitiendo la entrada del factor de transcripción DAF-16/FOXO al núcleo incrementando la capacidad celular antioxidativa. Con los mutantes antes mencionados se hicieron ensayos de fecundidad, de crecimiento y para observar la morfología neuronal en presencia de bacterias con diferente calidad nutricional y de azúcares.

Los resultados muestran que los azúcares no alteran los rasgos estudiados, ya que los efectos de las dietas en sí y las mutaciones en *C. elegans* tiene un impacto mayor que no se ve alterado por la presencia de monosacáridos. Por otro lado, se observa que el mutante *mec-4d* en presencia de dietas bacterianas de mejor calidad, la protección contra la degeneración neuronal es mayor, la tasa de desarrollo se ve acelerada y la fertilidad se ve favorecida con el aumento en la deposición de huevos. En cuanto al mutante *daf-2(ts);mec-4d*, se observa que la degeneración neuronal es casi completamente evitada, independiente de la calidad de la alimentación. Pero, la tasa de desarrollo no se ve influenciada, y la fertilidad se ve disminuida con esta mutación.

Finalmente, *C. elegans* permitió estudiar con éxito los rasgos de historia de vida del nematodo influenciados por dietas bacterianas de diferente calidad nutricional. Sin embargo, es necesaria la identificación de los compuestos que hacen la diferencia.

*A mis padres,
María Eliana y Marcos Arturo,
Por su amor incondicional.
Y a mi abuela Luisa y abuelo Nene que están en el cielo.*

Agradecimientos

Al finalizar esta etapa quiero dar las gracias a todas las personas que durante todo este tiempo me han apoyado en lo profesional y lo personal contribuyendo a que este trabajo llegara a su fin.

A la Dra. Andrea Calixto por su implicación, disposición, orientación y permanente apoyo en este proceso, por brindarme su experiencia y ayuda desde el primer momento sin el cual me hubiera sido más difícil terminar este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Calixto, Lidia Verdugo, Fernanda Palominos, Mauricio Contreras, Víctor García y Andrés Fuentes, por su acogida, amistad y apoyo desde el primer momento de este trabajo.

Al Dr. Álvaro Olivera y a la Dra. Oriana Salazar, por su apoyo, experiencia y paciencia a lo largo de toda mi carrera universitaria y durante mi memoria.

Una mención especial a Daniel Llanos, mi novio, por estar conmigo en las buenas y en las malas, ayudándome, dándome su amor y apoyándome desde el primer momento en que nos conocimos.

Un especial agradecimiento a mis amigos y compañeros que siempre han brindado su ánimo, cariño y apoyo a lo largo de este camino: Pamela Díaz, Natalia Vicencio, Nabelka Muñoz, Katy Naranjo, Laura Bono, Luis Salas, Ignacia Gamerre, Carlos Carrasco, Gustavo Pavez, Arturo Castro, M^o José Badinela, Claudia Palma.

Finalmente, agradezco a mi familia, mamá, papá, hermanos, mami Ceci, prim@s, abuelos, tíos y tías, por brindarme su incondicional apoyo y cariño en todos los momentos.

Si se me olvidó alguien que me disculpe, a todos mil gracias!

Tabla de contenido

Índice de tablas	vi
Índice de gráficos	vii
Índice de Figuras	vii
1 Introducción	1
1.1 Motivación	1
1.2 Objetivos	2
1.2.1 Objetivo general	2
1.2.2 Objetivos específicos	2
2 Antecedentes	3
2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
2.1.1 Características	3
2.1.2 Sexo	3
2.1.3 Anatomía.....	4
2.1.4 Ciclo de vida	5
2.1.5 Desarrollo.....	6
2.1.6 Alimentación	6
2.1.7 Búsqueda de alimentos de calidad	8
2.1.8 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo.....	9
2.1.9 Circuito del tacto en <i>C. elegans</i>	10
2.1.10 Complejo mecanotransductor MEC-4.....	11
2.1.11 Modelo de degeneración neuronal MEC-4(d) en <i>C. elegans</i>	12
2.1.12 Impactos metabólicos de la dieta en <i>C. elegans</i>	13
2.2 Rol de la glucosa	15
2.2.1 Transportadores de glucosa.....	16
2.2.2 <i>Xilosa</i>	17
2.3 Revisión Bibliográfica de efectos de la dieta en <i>C. elegans</i>	17
2.3.1 La ciencia del envejecimiento y la extensión de la vida: Estudios en <i>C. elegans</i>	17
2.3.2 Relación entre la dieta, la expresión genética y la fisiológica en <i>C. elegans</i>	22
2.3.3 Integridad neuronal afectada por diapausa y por la dieta	25

3	Materiales y Métodos	28
3.1	Materiales y Equipos	28
3.1.1	Equipos	28
3.1.2	Reactivos y disolventes	28
3.1.3	Material biológico	28
3.2	Métodos	29
3.2.1	Preparación de placas petri NGM.....	29
3.2.2	Preparación de medios de bacterianos	29
3.2.3	Sembrado de placas	29
3.2.4	Transferencia de Gusanos que crecen en NGM	29
3.2.5	Mantenimiento de Gusanos	30
3.2.6	Sincronización de Gusanos	30
3.2.7	Inactivación de bacterias por luz ultravioleta (UV)	31
3.2.8	Protocolo de visualización neuronal de Gusanos	31
3.2.9	Criterios para evaluación de Integridad Neuronal.....	31
3.2.10	Preparación de placas petri para los ensayos con azúcares	32
3.2.11	Caracterización Fenotípica	33
4	Resultados y Discusión.....	35
4.1	La dieta bacteriana afecta la fecundidad de <i>C. elegans</i>	35
4.2	La tasa de desarrollo	39
4.3	Estudio morfológico de la degeneración neuronal gatillada por MEC-4d	42
5	Conclusiones.....	47
6	Recomendaciones para el trabajo futuro	49
	Glosario	50
	Bibliografía	52
	ANEXOS	62
A.	Gráficos de los huevos in útero	62
B.	Gráficos de la tasa de desarrollo	64
C.	Datos correspondientes a los gráficos de Resultados	68
D.	Prueba de T de Student.....	74
E.	Análisis a datos relativos a huevos ex-utero	74
F.	Temperatura de crecimiento	76

G. Anatomía de estados larvarios y hermafrodita adulto de <i>C. elegans</i>	77
---	----

Índice de tablas

Tabla 1. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d. Comparación de una condición (control, d-glucosa, d-xilosa) en animales alimentados con bacterias distintas.....	37
Tabla 2. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.....	38
Tabla 3. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes daf-2(ts);mec-4d. Comparación de una condición (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.....	39
Tabla 4. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes daf-2(ts);mec-4d. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.....	39
Tabla 5. Datos correspondientes al Gráfico 8.....	68
Tabla 6. Datos correspondientes al Gráfico 2.....	68
Tabla 7. Datos correspondientes al Gráfico 10:	69
Tabla 8. Datos correspondientes al Gráfico 11.....	69
Tabla 9. Datos correspondientes al Gráfico 3.....	70
Tabla 10. Datos correspondientes al Gráfico 13	70
Tabla 11. Datos correspondientes al Gráfico 1 y 7.....	71
Tabla 12. Datos correspondientes al Gráfico 2 y 8	71
Tabla 13. Datos correspondientes al Gráfico 5	72
Tabla 14. Datos correspondientes al Gráfico 6	73
Tabla 15. Datos reales para ejemplificar el análisis de t de student.	74
Tabla 16. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d. Comparación de una condición (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.	75
Tabla 17. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.....	75
Tabla 18. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d;daf-2. Comparación de una condición (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.	76

Tabla 19. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes mec-4d;daf-2. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucos, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.....	76
Tabla 20. Temperatura de crecimiento.	76

Índice de gráficos

Gráfico 1. Diferentes dietas bacterianas afectan la fecundidad de C. elegans mec-4d.	38
Gráfico 2. El desarrollo de C. elegans se ve acelerado con una dieta bacteriana de buena calidad.	41
Gráfico 3. Tasa de desarrollo de C. elegans en mutantes daf-2(ts);mec-4d.	42
Gráfico 4. La calidad de la dieta bacteriana influye en la prevención de la degeneración neuronal en C. elegans desencadenada por mec-4d.....	45
Gráfico 5. La regulación negativa de la vía tipo Insulina/IGF-1 previene la degeneración neuronal gatillada por mec-4d.....	45
Gráfico 6. Cantidad de huevos in útero en C. elegans mec-4d.....	62
Gráfico 7. Cantidad de huevos in útero en C. elegans daf-2(ts);mec-4d.....	63
Gráfico 8. Registro del desarrollo del mutante C. elegans mec-4d 24 horas posterior a la eclosión.....	64
Gráfico 9. (Gráfico 2) Registro del desarrollo del mutante C. elegans mec-4d 48 horas posterior a la eclosión.	65
Gráfico 10. Registro del desarrollo del mutante C. elegans mec-4d 72 horas posterior a la eclosión.....	65
Gráfico 11. Registro del desarrollo del mutante C. elegans daf-2(ts);mec-4d 24 horas posterior a la eclosión.	66
Gráfico 12. (Gráfico 3) Registro del desarrollo del mutante C. elegans daf-2(ts);mec-4d 48 horas posterior a la eclosión.	66
Gráfico 13. Registro del desarrollo del mutante C. elegans daf-2(ts);mec-4d 72 horas posterior a la eclosión.	67

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de Vida de C. elegans a 22°C [21].....	6
Figura 2. Movimientos de la faringe de C. elegans que realiza para alimentarse.	7
Figura 3. Circuito del tacto suave.....	10

Figura 4. Modelo molecular del complejo mecanostransductor MEC-4	11
Figura 5. Degeneración neuronal progresiva gatillada por mec-4d.....	13
Figura 6. Vía de señalización DAF-2/DAF-6	15
Figura 7. Localización celular y subcelular de FGT-1 en C. elegans.....	17
Figura 8. Modelo de regeneración en mutante dauer mec-4d.....	26
Figura 9. Espátula esterilizada utilizada para el método Chunking.	29
Figura 10. Selector de gusanos: Pipeta pasteur con alambre de platino.....	30
Figura 11. Pipeta de Boca.....	31
Figura 12. Categorías morfológicas axonales.....	32
Figura 13. Estados Larvarios.....	34
Figura 14. Representación esquemática de las seis neuronas mecanosensoriales de un C. elegans adulto.....	43
Figura 15. Categorías morfológicas	43
Figura 16. Información obtenida en del programa GraphPad Prism al realizar un análisis de t de student a los datos muestrales definidos en la Tabla 15.....	74
Figura 17. Estados larvarios de Desarrollo.	77
Figura 18. Anatomía de un adulto hermafrodita.	77

1 Introducción

1.1 Motivación

Los seres vivos requieren sustancias alimenticias para suministrar los componentes necesarios para construir tejidos, reparar tejidos, para mantener el cuerpo en un buen estado de funcionamiento, y para suministrar combustible para obtener energía. Para una buena nutrición una persona debe comer una dieta bien balanceada, es decir, una que provee una cantidad adecuada de cada clase de nutrientes cada día, suministrar al mismo tiempo una adecuada pero no excesiva cantidad de calorías para la energía que el cuerpo necesita [1].

Por otro lado, en el consumo insuficiente, excesivo o no balanceado de nutrientes provoca una mala nutrición lo que conlleva a un consumo inadecuado de macronutrientes [2], y por ende, a enfermedades como pérdida de agilidad mental, desórdenes mentales (depresión, OCD, bipolaridad, entre otros), cáncer, problemas cardiacos, problemas respiratorios, diabetes, síndrome metabólico, obesidad, entre otros [3].

Es por lo anterior, que hoy en día la nutrición es un tema muy importante en la sociedad, ya que muchos alimentos que consume el ser humano tienen diferente aporte nutricional, ya sea bueno, medio o malo, y se ve reflejado en aspectos físicos, fisiológicos y neurológicos [4]. Además, considerando que la mala nutrición que provoca la obesidad por consumo en exceso de alimentos sin nutrientes es atendida como una pandemia por la OMS [5], es por ello que los gobiernos y gran parte de la población se preocupa cada día más de informarse sobre las propiedades de los alimentos que consume con tal de obtener comidas saludables y, sobre todo, nutritivas.

Con la información anterior, se formuló la pregunta ¿cuáles son los efectos sistémicos de la dieta en *C. elegans*? Y para responder a esta interrogante se decidió utilizar al nematodo bacterívoro *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio biológico para el estudio de los efectos fisiológicos e integridad neuronal que producen dietas con diferentes aportes nutricionales.

En 1963, Sydney Brenner observó que parte del éxito de la biología molecular se basaba en la utilización de organismos muy simples, por ejemplo fagos bacterianos, como sistemas modelos. Consciente de la importancia de estos sistemas sencillos en la investigación biológica, introdujo *C. elegans* como organismo modelo para actividades de investigación en biología y neurología. Desde su introducción por Brenner, este nematodo ha sido ampliamente usado con fines de investigación, desarrollándose una sofisticada infraestructura de conocimientos con protocolos y métodos de experimentación libremente diseminados [6]. En tiempos recientes este modelo ha aumentado su popularidad para la realización de estudios *in vivo* con compuestos de origen vegetal farmacológicamente activos. Existen varias características que hacen de *C. elegans* un modelo ideal para el estudio de la función y regulación de los genes, entre las que se puede destacar [7]:

- Es un organismo eucariota, lo cual significa que comparte estructuras celulares y moleculares tales como la presencia de una membrana nuclear, de organelos, de

ADN organizado en estructuras de orden superior como cromatina y cromosomas, y rutas metabólicas de organismos superiores.

- Es un organismo multicelular que pasa a través de un proceso complejo de desarrollo, incluyendo embriogénesis, morfogénesis y crecimiento a adulto. Así, la información biológica que se obtiene del mismo puede ser aplicable a organismos más complejos, menos manejables de cara a realizar escrutinios en el laboratorio.
- Existen varias técnicas de biología molecular para experimentación en *C. elegans* que no están disponibles para grandes eucariotas, por ejemplo, manipulación del genoma por adición, remoción o alteración de genes específicos, que pueden realizarse por procedimientos relativamente rutinarios.
- El tamaño del genoma de *C. elegans* es relativamente pequeño (9,7 x 10⁷ pares de bases o 97 Mb), comparado con el genoma humano, que se ha estimado que contiene 3 billones de pares de bases (3000 Mb). El genoma entero de *C. elegans* está secuenciado y cerca del 40% de sus genes tienen ortólogos humanos, lo que lo hace atractivo como modelo biológico para estudios de enfermedades humanas.
- *C. elegans* es fácil de mantener en el laboratorio, es pequeño y su anatomía es invariable de un organismo a otro. Además, tiene un ciclo de vida rápido: la embriogénesis ocurre en aproximadamente 12 horas, el desarrollo al estado adulto en 2,5 días, y la vida media es de 2 a 3 semanas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

El objetivo general de esta investigación es evaluar la actividad *in vivo* de la dieta sobre el desarrollo, la fertilidad y los procesos neurodegenerativos utilizando como modelo de estudio al nematodo bacterívoro *Caenorhabditis elegans*, de tal modo de comprobar su impacto sobre estos procesos en este organismo.

1.2.2 Objetivos específicos

El desarrollo de esta investigación se realizará según los siguientes objetivos específicos:

1. Aprender a manipular poblaciones de *C. elegans*, familiarizándose con su morfología y desarrollo.
2. Estandarizar protocolos para estudiar el efecto de la dieta, consiste en diferentes bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) suplementadas con monosacáridos (D-Glucosa y D-Xilosa), sobre el desarrollo y fertilidad de *C. elegans*.
3. Estandarizar protocolos para estudiar el efecto de la dieta, consiste en diferentes bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) suplementadas con monosacáridos (D-Glucosa y D-Xilosa), sobre la integridad neuronal usando como modelo *in vivo* a *C. elegans*.

2 Antecedentes

2.1 *Caenorhabditis elegans*

2.1.1 Características

Caenorhabditis elegans (*Caeno*, reciente; *rhabditis*, redondo; *elegans*, elegante), es un nematodo redondo, no parásito, no infeccioso, no patogénico, de vida libre, que vive normalmente en el suelo, en todo el intervalo de temperatura de las regiones del mundo, alimentado de microorganismos como bacterias (p.ej., *E. coli*) y hongos. Como únicos requerimientos para su cultivo y reproducción precisa de un ambiente húmedo, temperatura ambiental entre 10 °C y 25 °C, oxígeno atmosférico y bacterias como alimento [8].

Es hermafrodita autofertilizante, un animal generalmente dando lugar a unos 300 descendientes. *C. elegans* pueden ser fácilmente cultivadas en el laboratorio en el césped de bacterias cultivadas en un sustrato de agar. Las mutaciones pueden producirse fácilmente por una variedad de mutágenos y se segregarán como clones como homocigotos sin tener que configurar copias de cruces. Estas características hacen que el animal muy susceptible a los análisis genéticos, y muchos mutantes de comportamiento y morfológicas se han mapeado. Los adultos tienen solamente alrededor de 1 mm de longitud y 80 µm de diámetro, por lo tanto, sólo se requiere un pequeño espacio para su mantenimiento. Sus movimientos están restringidos a suaves ondas sinusoidales, casi enteramente en un simple plano dorsoventral. No emiten olor intenso y su apariencia transparente es bastante atractiva y facilita su manipulación y observación. Un microscopio confocal o una lupa son suficientes para el manejo rutinario. No obstante, la rapidez de crecimiento y capacidad de autofertilización exigen medidas especiales para estabilizar un cultivo sincronizado [9].

El tamaño del genoma de *C. elegans* es de 97 millones de pares de bases, unas 20 veces más grande que el de *E. coli* y aproximadamente un treintavo del humano. Fue el primer organismo multicelular para el que fue completamente secuenciado su genoma [10].

2.1.2 Sexo

Existen dos formas sexuales, macho y hermafrodita, siendo esta última la predominante. Los hermafroditas producen esperma y ovocitos y pueden reproducirse por autofertilización, sin apareamiento. De vez en cuando, a una frecuencia de aproximadamente 1 en 1000, se produce un macho, el cual solo produce esperma y para reproducirse debe aparearse con un hermafrodita. Después del apareamiento, el esperma del macho compite con el propio esperma del hermafrodita en la fertilización de los ovocitos y la mayoría de la progenie es luego resultado de la fertilización cruzada. Los huevos fertilizados son llevados y desarrollados internamente durante varias horas, el periodo exacto aumenta con la edad del hermafrodita. Un hermafrodita simple produce aproximadamente una progenie de 300 individuos hermafroditas por autofertilización, mientras que la fertilización cruzada puede producir más de 1000 gusanos machos y hermafroditas en proporciones iguales. La autofertilización conduce a homocigocidad de

alelos, por lo tanto gusanos individuales que pueden considerarse genéticamente idénticos. [11] [12]

2.1.3 Anatomía

Ambos sexos tiene la misma anatomía general y son de tamaño similar, con el macho adulto ligeramente más pequeño y delgado que el hermafrodita. La boca está en la punta de la cabeza, mientras que el ano de la hermafrodita y la cloaca del macho son ventrales en el extremo posterior. En contraste a la simple punta de la cola de la hermafrodita, la cola del macho es una estructura elaborada con musculatura compleja y nervios asociados necesarios para el apareamiento. La distinción entre ambos sexos se realiza en base a las diferencias en la cola.

El sistema digestivo consta de una faringe y un intestino, que se extiende desde la cabeza hasta la cola y se observa sin dificultad al microscopio por la transparencia del animal. La faringe está compuesta de 20 células musculares, 20 células nerviosas y 18 células epiteliales y está encerrada en una membrana base. A través de contracciones musculares coordinadas, la faringe es responsable de la ingestión de bacterias, cruzando la bacteria el molino en el bulbo terminal y pasando el alimento al intestino a través de la válvula faríngeo-intestinal [13]. El intestino es un tubo grueso de estructura aparentemente sencilla, con 20 células simples organizadas en 9 anillos.

La pared del cuerpo está separada del intestino por el pseudocolon y presenta una parte exterior uniforme, una gruesa hipodermis de células simples que recubre la mayoría de la pared del cuerpo y secreta la cutícula de colágeno, la cual cubre la superficie del gusano [14]. Bajo la epidermis, mononucleada, las células musculares de la pared del cuerpo tienen una forma romboide y están organizadas en 4 bandas longitudinales; cada banda tiene 2 células anchas. Existen 24 músculos celulares en cada banda, salvo la banda ventral izquierda que tiene 23. La contracción coordinada del bloque de músculos subventrales genera las ondas que permiten el desplazamiento del gusano. En la región de la cabeza son posibles movimientos ligeramente más elaborados, para la conducta alimentaria, y también en la región de la cola del macho para el apareamiento [15].

Las células nerviosas están concentradas en el anillo nervioso circunfaríngeo, el cordón nervioso ventral y la cola, con células sensoriales en la cabeza. El sistema nervioso coordina el comportamiento rutinario y responde a estímulos medioambientales. *C. elegans* es sensible a la temperatura y a una variedad de estímulos mecánicos, agresores químicos y repelentes. La existencia de un sistema nervioso simple fue uno de los criterios principales para su elección como organismo modelo.

Los sexos, como se ha señalado anteriormente, difieren fundamentalmente en la disposición de la gónada y en la cola, estas diferencias se establecen predominantemente durante el desarrollo post embrionario. La gónada en ambos sexos es una simple estructura tubular en la cual la línea germinal se replica a través de división nuclear sin un sincitio.

2.1.4 Ciclo de vida

Una de las ventajas de *C. elegans* es que tiene un corto ciclo de vida. Desde huevo a adulto, transcurren 3,5 días a 20°C, con un intervalo que oscila entre 2,5 a 6 días a 25°C y 15°C, respectivamente. La puesta de huevos se produce a lo largo de un periodo de 4 días y cesa alrededor de los 5 días. El promedio de vida varía de 9 a 35 días a 25,5 y 10 °C respectivamente, con una media entre 11 y 17 días a 20 °C [16]. Se ha observado que bajo restricción dietética, es decir, reduciendo la concentración de bacterias, se puede elevar el promedio de vida de 16 a 26 días (20°C), a la vez que se reduce el periodo de fecundidad y el tamaño de la camada hasta incluso niveles del orden 60 individuos [17] [18].

Tras la embriogénesis (periodo desde la fertilización a la nidada) se genera el primer estadio larvario (L1), con una estructura general similar al adulto, aunque más pequeño (250 µm de longitud). El desarrollo post-embriionario implica el crecimiento a través de 4 estados larvarios (L1 a L4) antes de que la muda final produzca el adulto, como se muestra en la Figura 1. A 20 °C la embriogénesis dura 14 horas, y los estados larvarios, señalados por sucesivas mudas, aparecen a las 29, 38, 47 y 59 horas post-fertilización, respectivamente [6] [19]. Se debe considerar que pequeñas variaciones en la temperatura pueden acelerar o retrasar notablemente el desarrollo.

La concurrencia de ausencia de alimento y una densidad poblacional suficientemente alta a temperatura de 20 °C conduce a un estado alternativo, denominado *dauer*, formado en la segunda muda, que es morfológicamente distinto de la larva desarrollada en buenas condiciones. Su orificio oral está cerrado por un tapón interno y su faringe está estrangulada y no realiza bombeo. Su cutícula específica y la falta de bombeo le confieren resistencia frente a muchas agresiones medioambientales; el gusano en estado *dauer* está especializado para sobrevivir en condiciones adversas, como desecación. Bajo el microscopio de disección la forma *dauer* aparece más delgada que una larva L3, pero con movimientos más rápidos que ésta cuando es estimulada mecánicamente. La forma *dauer* puede permanecer viable varios meses y cuando el alimento comienza a estar disponible, muda para llegar a larva normal L4 [9] [20].

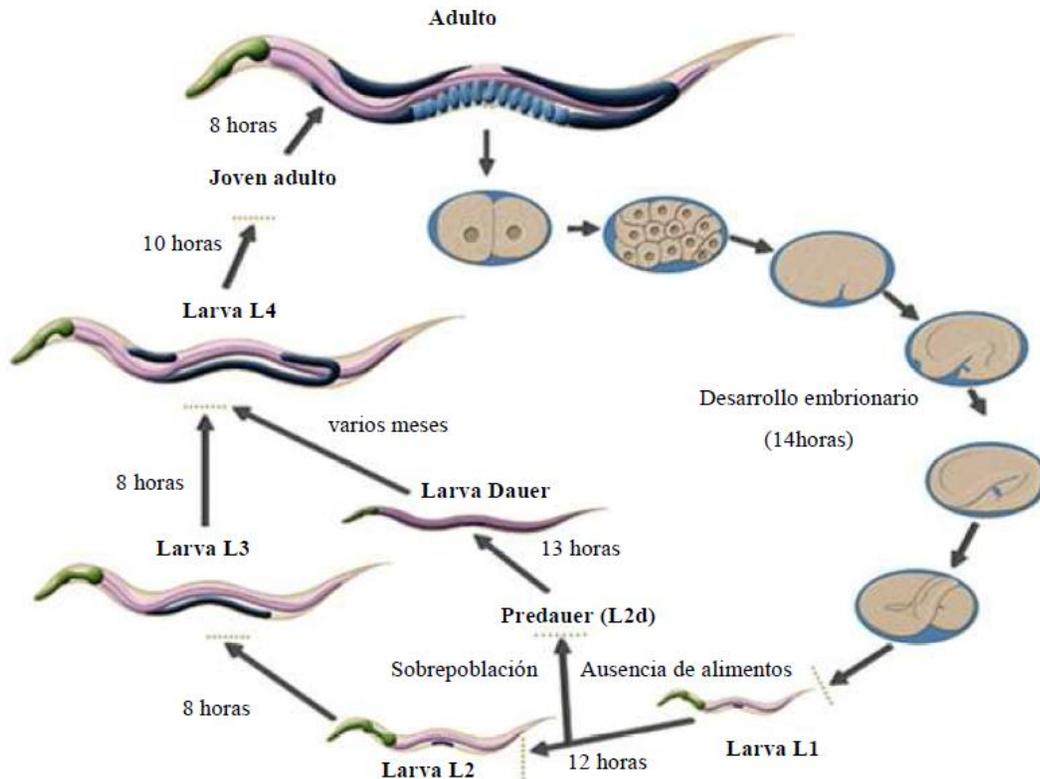


Figura 1. Ciclo de Vida de *C. elegans* a 22°C [21].

2.1.5 Desarrollo

El gusano hermafrodita adulto posee 959 núcleos de células somáticas, 302 de las cuales son nerviosas. El número de células somáticas es algo menor que el de los núcleos, ya que algunas células son multinucleadas (sincitios). El gusano masculino adulto, por su parte, posee 1031 células y cuenta con 79 células nerviosas extra con relación al hermafrodita, pudiendo estar la diferencia en el sistema nervioso de ambos sexos relacionada con el comportamiento sexual. Además hay de 1000 a 2000 células germinales.

El patrón de divisiones celulares a partir del huevo fecundado es casi siempre el mismo. La consistencia en el desarrollo, sumada a la completa transparencia del animal en todos los estados de desarrollo y el relativamente pequeño número de células que componen la totalidad de la forma del individuo, han hecho posible la descripción completa del desarrollo del linaje celular de *C. elegans*. Esta descripción incluye el tiempo y orientación de cada división celular mitótica así como el origen y destino de cada célula creada [22].

2.1.6 Alimentación

La alimentación de *C. elegans* depende de la acción de la faringe, un bombeo neuromuscular que une la boca al intestino. La faringe es un bomba tubular responsable

por succionar bacterias hacia dentro del gusano, concentrándolas, y moliéndolas [23] [24] - y la transporta hasta el intestino. Esto se logra a través de una combinación de dos movimientos, bombeo y peristaltismos del istmo. El bombeo es un ciclo de contracción y relajación que aspira líquido del ambiente circundante, junto con las partículas en suspensión, luego expulsa el líquido, atrapando las partículas (Figura 2). El músculo faríngeo es capaz de bombear sin la participación del sistema nervioso, pero durante la alimentación rápida normal su tiempo es controlado por dos tipos de motoneuronas faríngeas. La peristalsis del istmo, una onda en movimiento posterior de la contracción del músculo del istmo posterior, depende de un tercer tipo de neurona motora [25].

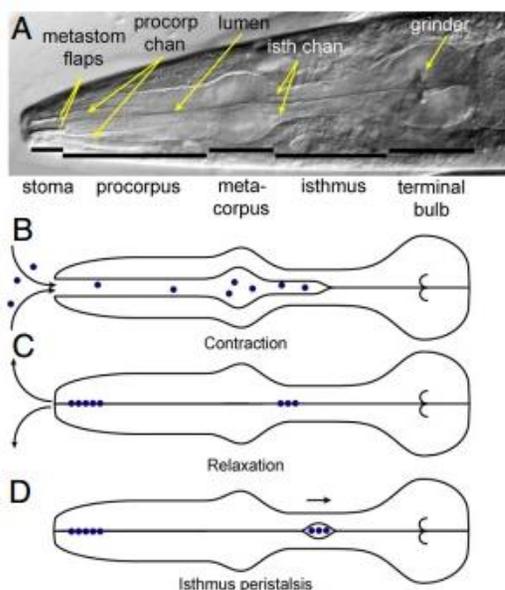


Figura 2. Movimientos de la faringe de *C. elegans* que realiza para alimentarse.

A. Partes de la faringe (sistema alimentario). **B y C.** Bombeo faríngeo. La contracción del músculo faríngeo aspira el fluido que contiene en suspensión a las partículas de alimentos hacia el lumen faríngeo. La relajación expulsa el líquido atrapando las partículas. Las flechas curvas indican el flujo de los fluidos. **D.** Peristaltismo del Istmo acarreando comida desde el Istmo anterior hasta el bulbo terminal y el intestino [25].

El Sistema nervioso faríngeo contiene 20 neuronas de 14 tipos diferentes (8 pares simétricos bilaterales y 6 no pareadas) [26]. Tres de estas 14 son particularmente importantes para una alimentación normal. La M4 es necesaria y suficiente para un peristaltismo normal del istmo, y es esencial para el crecimiento bajo algunas condiciones [27]. La MC y M3 controlan el tiempo de bombeo: MC controla cuando una comienza una contracción [28] [29], y M3 cuando se termina o relaja la contracción [30] [28]. Sorprendentemente estos tres tipos de neuronas son suficiente para un comportamiento casi normal en el laboratorio: incluso cuando los otros 11 tipos de neuronas están muertas, el gusano crece bien y sólo muestra anomalías sutiles en la alimentación.

Por otro lado, los movimientos de alimentación están regulados por la presencia y calidad de los alimentos en el entorno del gusano. Algunos tipos de bacterias son mejores que otros para apoyar el crecimiento. Dada la opción, los gusanos son capaces

de identificar y buscar los alimentos de mayor calidad. La disponibilidad y la calidad de los alimentos también afectan el comportamiento de otras maneras. Por ejemplo, teniendo en cuenta toda la comida de alta calidad que pueden comer los gusanos, finalmente, se sacian y dejan de comer y de moverse, entrando en un estado quiescente [25].

2.1.7 Búsqueda de alimentos de calidad

Los gusanos son capaces de distinguir la comida basada en la calidad y buscar alimento de mayor calidad [31], medido como la tasa de crecimiento: el inverso al tiempo que le El definió la calidad de la comida como la habilidad de un alimento de apoyar el crecimiento de *C. elegans* toma a un gusano para crecer desde la eclosión hasta la adultez. (Rangos de tasa de crecimiento es de aproximadamente 0.48/día con la mejor comida hasta 0) [32] [31].

Los animales han evolucionado diversos comportamientos que sirven el propósito de encontrar alimentos en el medio ambiente. Se investigó la estrategia del nematodo del suelo bacterívoro *Caenorhabditis elegans* para buscar alimento. La comida bacteriana de *C. elegans* varía en calidad: algunas especies son fáciles de comer y apoyan el crecimiento del gusano, mientras que otras no lo hacen. Por ejemplo, *Comamonas sp.* y *E. coli HB101* son consideradas como comida de alta calidad; *E. coli DA837* y *B. simplex* son comida mediocre; y *B. megaterium* es comida de baja calidad. Se demuestra que los gusanos exhiben elección de la dieta: ellos cazan los alimentos de alta calidad y dejan las bacterias difíciles de comer. Este comportamiento de búsqueda de comida se mejora en los animales que ya han experimentado la buena comida. Cuando cazan por una buena comida, los gusanos alternan entre dos modos de movimiento, conocidos como *dwelling* (vivienda): movimientos con frecuentes paradas y retrocesos; y *roaming*: movimiento recto rápido. En la buena comida, el roaming es muy raro, mientras que en la mala comida es común [31].

Por otro lado, Shtonda y Avery [31] caracterizaron dos comportamientos que permiten a los gusanos encontrar alimentos de alta calidad: (1) *leaving*, en el que un gusano deja una mala comida en busca de otra mejor, y (2) *preference*, en la que los gusanos se les da a elegir entre dos alimentos ellos elegirán el de mejor calidad.

Los gusanos modifican su comportamiento dependiendo de su experiencia previa de alimentos de calidad [32] [31]. Los gusanos crecidos por 3 horas en comida de alta calidad luego presentados con comida de mediana calidad estaban insatisfechos – ellos dejaban con mayor frecuencia la comida mediocre. Pero cuando los gusanos eran presentados con la misma comida mediocre después de condicionarlos con comida de baja calidad ellos estaban satisfechos – dejaban la comida mediocre con baja frecuencia.

El descubrimiento de Shtonda de que los gusanos responden a la calidad de los alimentos llevó al descubrimiento de otra conducta de alimentación llamado “saciedad quiescente” [33] porque: (1) La quiescencia depende de la calidad de los alimentos - los gusanos se vuelven quiescentes con una buena comida, pero no con la mala alimentación; (2) la disminución de la ingesta de alimentos (en la alimentación de los

mutantes tales como *eat-2*) o una disminución en la absorción de alimentos en el intestino (en los mutantes de la absorción tales como *ACT-5*) se reduce la quiescencia; y (3) el comportamiento depende de la experiencia pasada de hambruna del animal – los gusanos que han experimentado el hambre muestran una mayor saciedad quiescencia en comparación con gusanos que no la tienen.

2.1.8 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

En los últimos años, diversos grupos de investigación han comenzado a utilizar el nematodo *C. elegans* como organismo modelo para desarrollar estudios *in vivo* relacionados con obesidad, envejecimiento, longevidad de vida, neurodegeneración, entre otros. Como ya se ha visto, se trata de un modelo con múltiples posibilidades, que ofrece una serie de ventajas respecto a otros modelos animales. Es el animal multicelular mejor caracterizado a nivel genómico, embriológico, neurobiológico y celular. Su fácil manejo, su bajo costo y su ciclo de vida corto permiten la rapidez y facilidad de trabajo de un microorganismo, pero con las ventajas de un modelo animal real. Además, *C. elegans* tiene un sistema de órganos completo, incluyendo sistema sensorial, y las casi 1000 células que lo componen mantienen una posición conocida y constante. Este modelo animal fue el primero de los eucariotas multicelulares para los que se ha secuenciado completamente el genoma, que se encuentra organizado en 6 cromosomas cuya anotación representa aproximadamente unos 20.000 genes. Se dispone además de una librería de clones bacterianos que expresan dsRNAi (ácido ribonucleico de interferencia de doble cadena) para casi la totalidad de los genes y de una amplia colección de mutantes. La morfología, desarrollo y función de cada una de sus células ha sido mapeada con gran detalle. Se ha demostrado que existe una gran conservación entre *C. elegans* y los mamíferos tanto a nivel celular como molecular y se ha confirmado que existen más de un 40% de genes ortólogos entre este gusano y humanos [19] [6] [34] [35].

C. elegans ha sido especialmente examinado en relación con las cascadas de señalización de insulina, cuya inactivación ('knock-out') confiere una mayor duración de vida en los gusanos promoviendo el estado *dauer*. La acumulación de grasa y la alteración del metabolismo son características de las formas *dauer* longevas y con mayor resistencia al estrés. En general, estos cambios son predecesores de los ajustes metabólicos encaminados a favorecer la conservación y eficiencia energética que tienen lugar en mamíferos sometidos a restricción calórica. Por ello, *C. elegans* constituye un buen modelo para estudios relacionados con estrés oxidativo, metabolismo calórico y longevidad, particularmente útil en estudios sobre envejecimiento. Hay que tener en cuenta que algunos aspectos del envejecimiento son similares entre nematodos y mamíferos, incluido el hombre. Por ejemplo, el estrés oxidativo es uno de los principales factores implicados en el envejecimiento en ambos y la restricción calórica se muestra como un factor que permite alargar la duración de vida tanto en *C. elegans* como en algunos sistemas mamíferos.

La red del metabolismo intermedio está bien conservada entre los eucariotas y la mayoría de rutas metabólicas encontradas en organismos heterotróficos están también presentes en *C. elegans* [36]. Las bases de datos, como Wormbase, Reactome y KEGG, muestran que existen ortólogos en *C. elegans* para la mayoría de las enzimas involucradas en las principales rutas del metabolismo intermedio.

2.1.9 Circuito del tacto en *C. elegans*

C. elegans posee un total de 1062 células somáticas de las cuales 302 son neuronas [22], de estas 6 componen el circuito neuronal del tacto suave, el cual responde a estímulos mecánicos como la composición del terreno, la presencia de otros animales o depredadores [37], [38]. El circuito del tacto suave está compuesto por las neuronas Anterior Lateral Microtubule ALM (R/L) y Anterior Ventral Microtubule AVM, en la mitad anterior del cuerpo, y en la parte posterior por las neuronas Posterior Ventral Microtubule PVM y Posterior Lateral Microtubule PLM (R/L) (Figura 3). Las 6 neuronas inervan la totalidad del cuerpo en *C. elegans* y al ser activadas mecánicamente generan la respuesta aversiva del animal, modificando la dirección de su movimiento generalmente en dirección contraria al estímulo presentado [37].

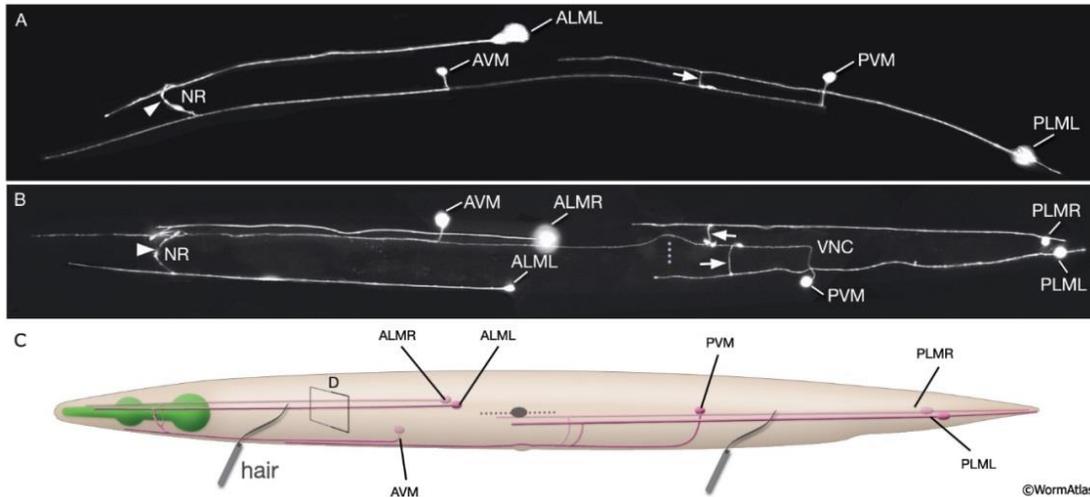


Figura 3. Circuito del tacto suave.

El circuito del tacto suave está formado por las neuronas AVM, ALM, PVM y PLM. Las imágenes de microscopía de fluorescencia representan: **A**. El circuito del tacto. **B** Las interconexiones entre neuronas del circuito del tacto. Las neuronas ALM y PLM son neuronas bilaterales. **C** Puntos de estimulación mecánica utilizados para medir la funcionalidad del circuito del tacto suave. Imagen extraída de wormatlas.org [39].

2.1.10 Complejo mecanotransductor MEC-4

Para que el estímulo mecánico externo sea percibido por el animal es necesaria la acción del complejo mecanotransductor MEC-4. MEC-4 se expresa únicamente en las 6 neuronas mecanotransductoras del tacto [39] [40], y media la transducción de señales mecánicas externas, generando la respuesta aversiva del animal [37]. Para ubicar espacialmente el complejo MEC-4, la proteína MEC-5, isoforma de colágeno, MEC-1 y MEC-9 ambas con sitios múltiples de EGF anclan la sección transmembrana del complejo MEC-4 a la matriz extracelular [41]. El canal mecanotransductor está conformado por las proteínas MEC-4 y MEC-10, y es activado por la deformación de la matriz extracelular por un estímulo mecánico externo [42]. Otras proteínas que conforman el complejo mecanotransductor son MEC-6 y MEC-2. MEC-6 es una proteína de transmembrana tipo-peroxidasa [43], mientras que MEC-2 es una proteína tipo-estomatina ubicada hacia el citosol [44]. MEC-7 y MEC-12 alfa y beta tubulina respectivamente, generan microtubulos de 15 protofilamentos requeridos para la sensación del tacto [39] [40] [45].

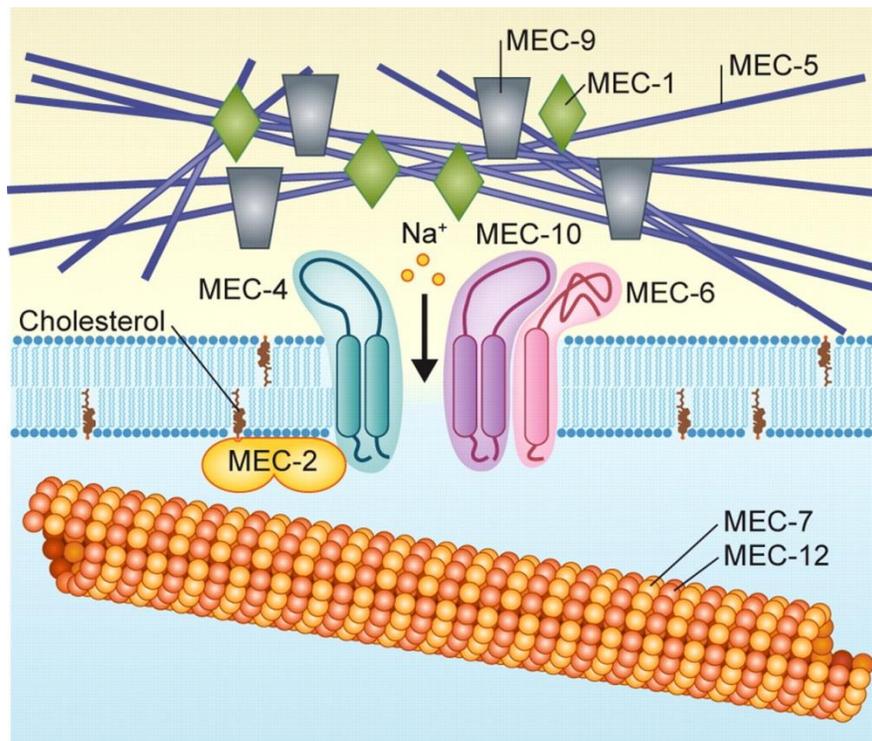


Figura 4. Modelo molecular del complejo mecanotransductor MEC-4

MEC-4 y MEC-10 funcionan como subunidades formadoras del canal iónico. Los canales funcionales poseen dos unidades MEC-4 y MEC-10 [46] [47]. MEC-2 y MEC-6 son subunidades accesorias que permiten la actividad del canal, MEC-2 es una proteína tipo-estomatina, la cual se encuentra en la sección interior de la membrana, mientras que MEC-6 es una proteína de transmembrana, tipo paraoxidasa [43]. MEC-5, isoforma de colágeno, MEC-1 y MEC-9 ambas con múltiples sitios de EGF, sirven para anclar el complejo a la matriz extracelular permitiendo la respuesta ante el estímulo mecánico. MEC-7 y MEC-12 son monómeros de alfa y beta tubulina respectivamente, que generan microtúbulos de 15 protofilamentos requeridos para la sensación del tacto [48].

2.1.11 Modelo de degeneración neuronal MEC-4(d) en *C. elegans*

En el año 1991 en trabajos generados en el laboratorio de Martin Chalfie, se descubrió que las mutaciones *e1611*, *u231*, y *u56* en el gen *mec-4* producen la muerte progresiva en la neuronas del tacto, mediante necrosis [49]. Al ser producida la mutación *u231* (valina-treonina) en MEC-4, el canal epitelial de sodio (ENaC), se abre constitutivamente, permitiendo la entrada de altas cantidades de iones de sodio y generando permeabilidad hacia iones de calcio [50]. La entrada de iones de calcio (Ca^{2+}) en grandes cantidades, genera la liberación de iones Ca^{2+} por parte del retículo endoplasmático (ER), produciendo el aumento de iones de Ca^{2+} a niveles tóxicos y la subsecuente activación de proteasas, tales como calpainas y finalmente la muerte neuronal por necrosis [50]. Este modelo de degeneración neuronal ha permitido la visualización *in vivo* de procesos degenerativos neuronales focalizados en neuronas específicas (circuito del taco suave) utilizando microscopia de fluorescencia [51]. Además de permitir estudios enfocados en como impactan los cambios metabólicos sobre los procesos neurodegenerativos (

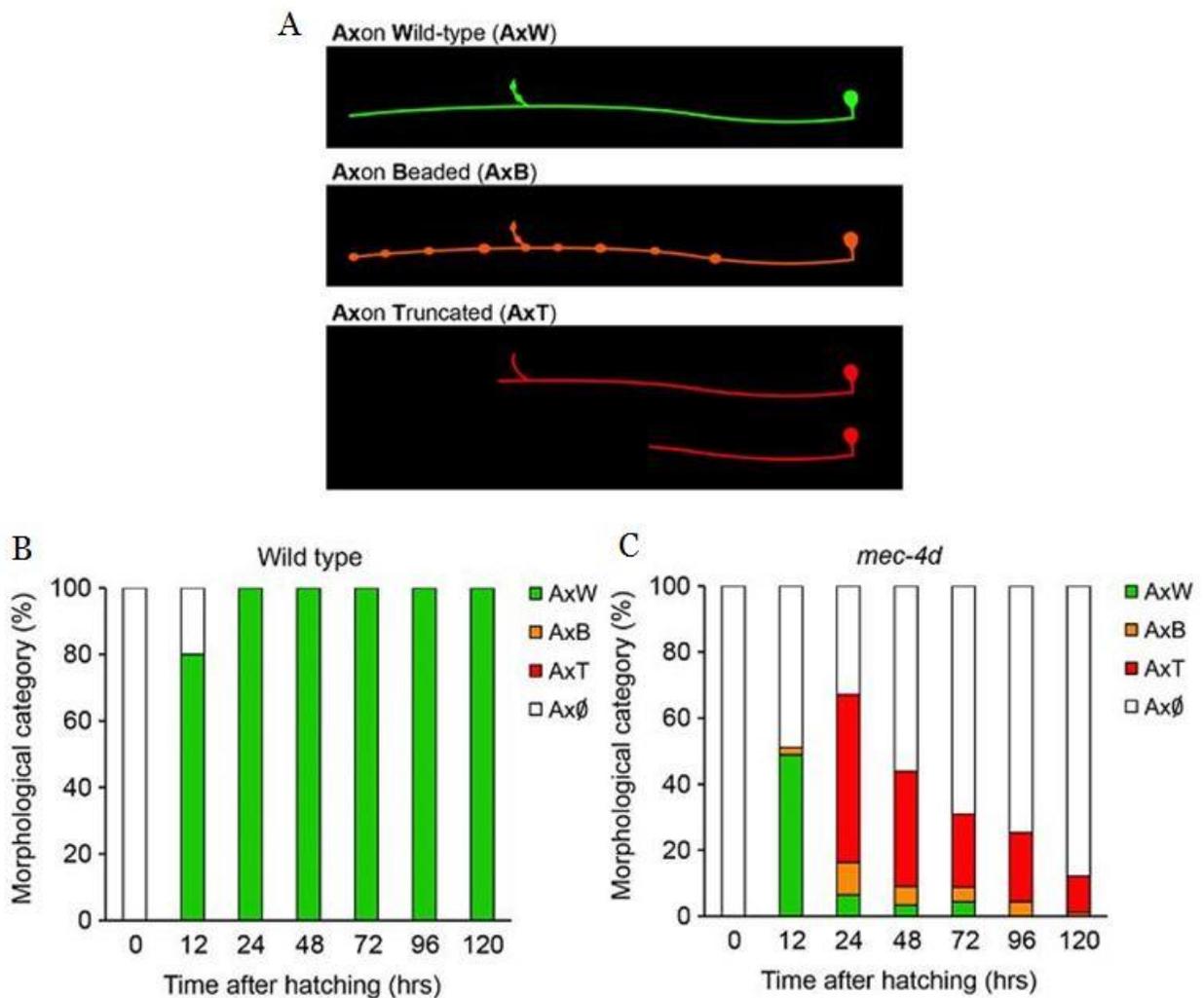


Figura 5).

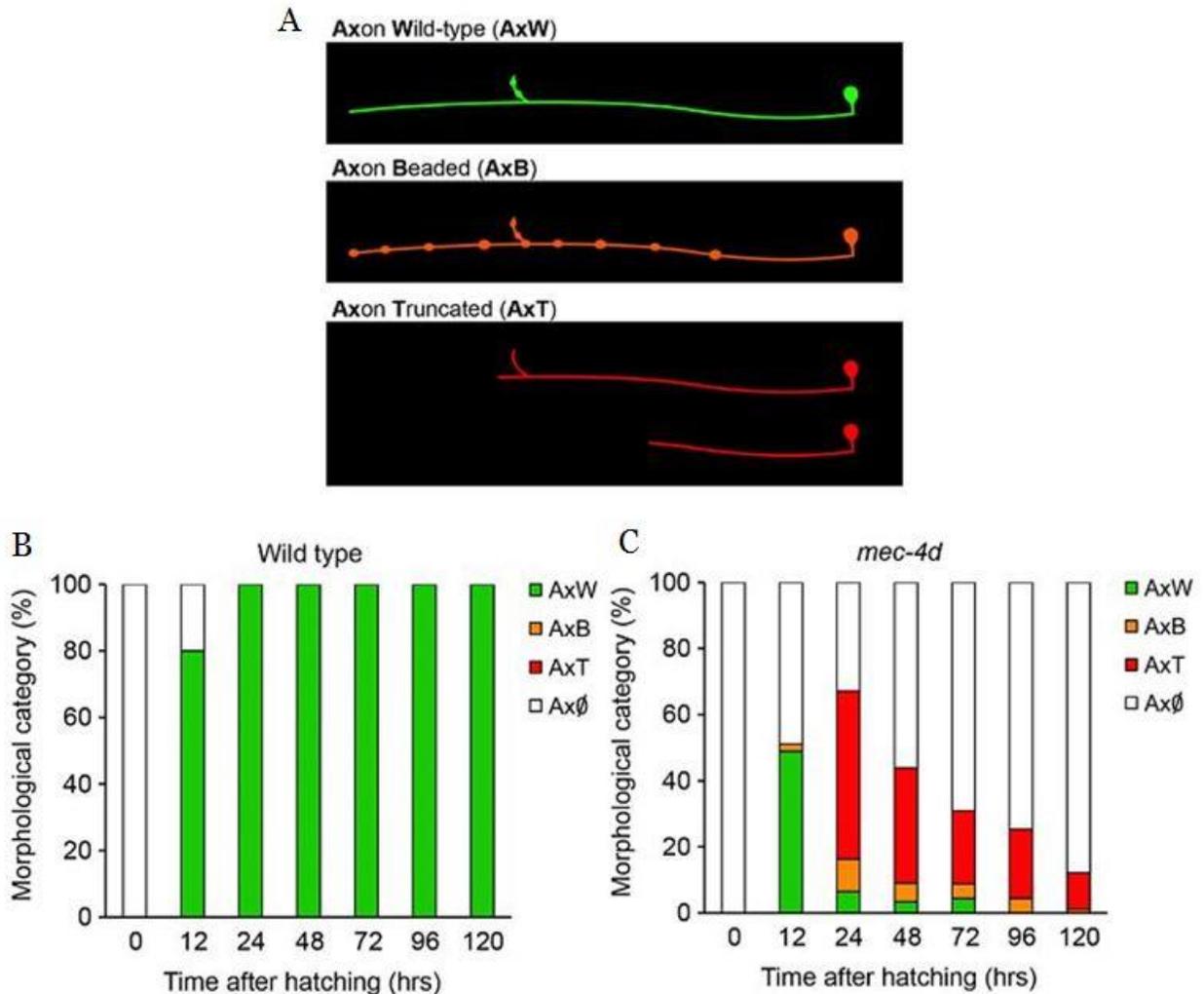


Figura 5. Degeneración neuronal progresiva gatillada por *mec-4d*.

Gráficos demuestran el proceso neurodegenerativo generado en animales mutantes *mec-4d* (A) Etapas morfológicas neuronales visibles durante la progresión degenerativa causada por *mec-4d*, axón salvaje (VERDE), axón con cuentas (AMARILLO), axón truncado (ROJO) y axón degenerado (BLANCO). (B) Análisis morfológico neuronal de animales *mec-4d* en intervalos de 12, 24, 48, 72 y 120 horas. (C) Análisis morfológicos neuronales de animales de tipo salvaje en intervalos de 12, 24, 48, 72 y 120 horas. Datos extraídos de Calixto et al., 2012. [51]

2.1.12 Impactos metabólicos de la dieta en *C. elegans*

Desde su descubrimiento, uno de los pilares fundamentales de la investigación en *C. elegans* se ha basado en la expectativa de vida del animal, utilizando distintas drogas o tratamientos que generan fluctuaciones en la longevidad de la vida de *C. elegans*. A partir del año 1997 en trabajos realizados por el laboratorio de Gary Ruvkun, se asocia el aumento de la longevidad en *C. elegans* con la disminución de la acción del receptor de

insulina DAF-2 y el concepto de restricción dietaria [52]. DAF-2 es un receptor tirosina quinasa, ortólogo del receptor de insulina en humanos, el cual regula procesos relacionados con el desarrollo, respuesta al estrés y la longevidad [53]. En condiciones de restricción dietaria, (bajo consumo calórico) en *C. elegans*, disminuye la función del receptor DAF-2 aumentando la longevidad del animal [54]. DAF-2 regula negativamente al factor de transcripción DAF-16/FOXO, activando las proteínas quinasas AKT-1 y AKT-2, estas añaden grupos fosfato al factor DAF-16 impidiendo su translocación al núcleo de la célula y la posterior transcripción de genes asociados a longevidad, desarrollo y respuesta a estrés [55] (Figura 6).

No obstante, la restricción dietaria se basa solamente en la reducción calórica en la alimentación, no en el impacto de distintas dietas en el metabolismo de *C. elegans*. En este ámbito, grupos como el de Leon Avery han utilizado como alimentación distintas bacterias, analizando la tasa de crecimiento de *C. elegans* en función a su alimentación [32]. También se han analizado metabolitos que generan cambios en el desarrollo de *C. elegans* [56]. Sin embargo el efecto de la dieta sobre procesos más específicos, tales como la generación o degeneración neuronal, no había sido descrito. Ante esta situación, estudios realizados en el laboratorio de la Dra. Andrea Calixto, exponen una relación directa entre la restricción dietaria, la vía DAF-2/DAF-16 y la protección neuronal en el modelo neurodegenerativo *mec-4d* [51]. Estos descubrimientos evidencian que la influencia de la dieta afecta procesos sistémicos más allá de la longevidad o el desarrollo, sino que también procesos complejos como lo son la protección neuronal ante estímulos degenerativos inducidos genéticamente.

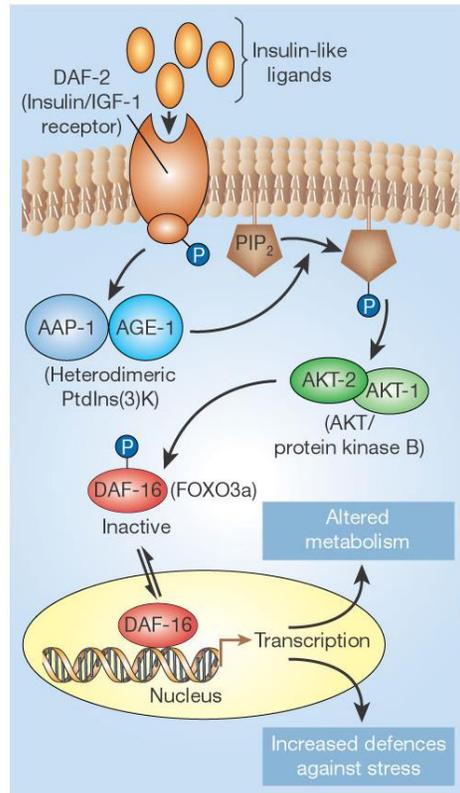


Figura 6. Vía de señalización DAF-2/DAF-6

La unión de moléculas tipo-insulina al receptor DAF-2 en la membrana celular activan una serie de proteínas quinasa con función enzimática: AAP-1 y AGE-1, las que añaden grupos fosfato PIP₂ activando a AKT-1 y AKT-2. Estas enzimas finalmente fosforilan al factor transcripcional DAF-16, previniendo su entrada al núcleo de la célula. Ante la inactivación de DAF-2, DAF-16 es traslocado al núcleo iniciando la transcripción de genes relacionados con el metabolismo y la adaptación al estrés [57].

2.2 Rol de la glucosa

La glucosa es un azúcar con la forma molecular $C_6H_{12}O_6$. Debido a que tiene 6 átomos de carbono es una hexosa (monosacáridos) y además como su isómero D-glucosa es la que se encuentra normalmente en la naturaleza es conocida como dextrosa. La glucosa se obtiene durante la fotosíntesis que realizan las plantas a partir de agua y dióxido de carbono, usando la energía de la luz solar. De este modo, las plantas y vegetales guardan la glucosa hecha por ellos hilando las moléculas de glucosa y formando carbohidratos, lo que hace más fácil su almacenamiento [58].

Los seres vivos que no producen su propia glucosa tienen que conseguirla a partir de las plantas y vegetales, convirtiéndose la glucosa es la aldohexosa más utilizada por los seres vivos, debido a que tiene la tendencia más baja a reaccionar no-específicamente con grupos aminos de proteínas [59].

La glucosa es un combustible ubicuo en biología, es usada como fuente de energía (3,75 kcal/gr) por la mayoría de los seres vivos, desde bacterias hasta humanos, a través de respiración anaeróbica, respiración aeróbica o la fermentación. Además, juega un rol

importante en el metabolismo y la homeostasis celular [60]. Cuando se necesita energía química, la glucosa se oxida a piruvato a través del proceso glicólisis, que es la fuente de energía para ciertos organismos llamados anaeróbicos estrictos que no pueden utilizar oxígeno para el metabolismo. En organismos aeróbicos, el piruvato se oxida a acetil-CoA, su oxidación completa se realiza en el ciclo de Krebs, formando CO₂ y agua, y la transferencia de los electrones obtenidos a la cadena de transporte electrónica y finalmente al oxígeno para obtener energía (en la fosforilación oxidativa). Esta segunda reacción genera cerca de 18 veces más energía que la glicólisis, mayormente en forma de ATP. La reacción de la insulina, y otros mecanismos, regulan la concentración de glucosa en el organismo [61].

Por otro lado, la glucosa es la fuente primaria de energía para el cerebro (y otros tejidos), por lo que la disponibilidad de ésta influye en procesos psicológicos. Cuando la glucosa es baja, los procesos que requieren un esfuerzo mental, como autocontrol o toma de decisiones, se deterioran [62] [63], además, puede causar convulsiones, pérdida de la conciencia y daño celular irreversible. Si el sistema de obtención, creación y utilización de la glucosa se interrumpe, ocurre la diabetes y se desencadenan problemas como neuropatías, enfermedades cardiovasculares, ceguera, falla renal, y pérdida de una extremidad, entre otras cosas [64].

2.2.1 Transportadores de glucosa

La glucosa entra a las células eucariotas vía 2 tipos diferentes de proteínas transportadoras asociadas a la membrana, los transportadores de glucosa acoplados a Na⁺ (SGLT) y los transportadores de glucosa facilitadores (GLUT). Tres miembros de la familia de los SGLT funcionan como transportadores de azúcar (SGLT1 y SGLT2) o sensores (SGLT3). La familia humana de GLUT consiste en 14 miembros, de los cuales 11 han mostrado catalizar transporte de azúcar [64].

Los transportadores de la glucosa SGLT y GLUT participan en el control hormonal del metabolismo al ser mediadores de la entrada, utilización y almacenamiento de la glucosa. Permiten un transporte de la glucosa altamente regulado al expresarse de manera diferencial en los tejidos y al depender de estímulos humorales diversos para regular su función [65].

Al igual que en humanos *C. elegans* posee transportadores de glucosa facilitados (GLUT), el cual es llamado FGT-1 siendo principalmente un transportador de glucosa intestinal mamífero del tipo GLUT-2 (transportador del tipo bidireccional) y está involucrado en el metabolismo de lípidos [66]. Este transportador se expresa en el músculo faríngeo y en las células intestinales (Figura 7).

Por otro lado, no se ha encontrado evidencia genética de que exista un transportador de glucosa del tipo SGLT en *C. elegans*, como el que está presente en humanos [66].

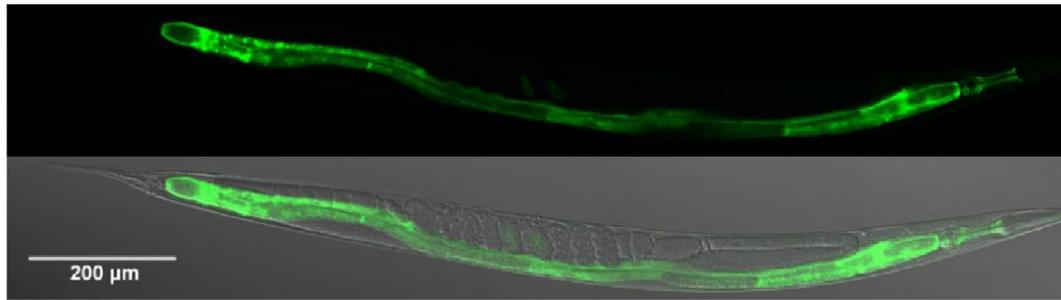


Figura 7. Localización celular y subcelular de FGT-1 en *C. elegans*.

El constructo fusionado *fgt-1::egfp* bajo el control del promotor *fgt-1* fue inyectado en *C. elegans* y la expresión de la proteína fusión FGT-1::eGFP es visualizada con microscopio laser confocal en todo el animal [66].

2.2.2 Xilosa

La xilosa es una azúcar primeramente aislada desde la madera. Es clasificada como un monosacárido del tipo aldopentosa, ya que contiene cinco átomos de carbono e incluye un grupo funcional formil. Este monosacárido se deriva de la hemicelulosa, uno de los principales constituyentes de la biomasa, lo cual comprende alrededor del 30 % de algunas plantas [67].

En humanos, la xilosa es absorbida por los mismos transportadores (SGLT) de glucosa y galactosa, también es metabolizada, aunque no es un nutriente principal y es ampliamente excretada por los riñones [68]. Las personas deben obtener xilosa de sus dietas. En ellas existe una enzima llamada xilosiltransferasa, la cual transfiere xilosa desde UDP a una serina en la proteína principal de los proteoglicanos. Además, es una azúcar de bajo contenido energético (2,4 cal/gr) [69].

Por otro lado, en medicina la xilosa se utiliza para realizar pruebas de la correcta absorción de nutrientes en el intestino. Al ser una sustancia que se absorbe de forma incompleta en el intestino, se emplea para el diagnóstico de algunas enfermedades del tracto digestivo relacionadas con la absorción intestinal [70].

Finalmente, debido a que la xilosa es una pentosa, y el transportador de glucosa que se encuentra en *C. elegans* FGT-1 es del tipo GLUT-2, el cual es un transportador de difusión facilitada para hexosas, no puede ser absorbida por éste método, disminuyendo la probabilidad de su utilización como fuente de carbono.

2.3 Revisión Bibliográfica de efectos de la dieta en *C. elegans*

2.3.1 La ciencia del envejecimiento y la extensión de la vida: Estudios en *C. elegans*.

En el laboratorio la Dra Cynthia Kenyon [71] se realizan estudios relacionados con los mecanismos de extensión de la vida de *C. elegans*, los que también son aplicados a mamíferos y que se podrían aplicar para generar terapias para humanos. A continuación se presentan los diferentes mecanismos de extensión de la vida que se han sido descubiertos por este equipo de investigación.

- En el laboratorio de Cynthia Kenyon se descubrió que el receptor de la insulina/IGF-1 DAF-2 de *C. elegans*, y el factor de transcripción de la familia FOXO/DAF-16, regula la tasa de envejecimiento de *C. elegans* [72]. Estos resultados mostraron que el proceso de envejecimiento está sujeto a la regulación endocrina y a la transcripcional. Lo que ha llevado al descubrimiento de que el envejecimiento de los mamíferos también está regulado hormonalmente por la insulina y el sistema endocrino IGF-1 [73]. Estos hallazgos se extienden a los seres humanos, también: en los últimos años, las variantes de ADN en esta vía se han asociado con la longevidad excepcional en las poblaciones humanas de todo el mundo. Los mutantes de animales longevos son resistentes a muchas enfermedades relacionadas con la edad, aumentando la posibilidad de que múltiples enfermedades se pueden combatir a la vez por la orientación de envejecimiento en sí.
- A principios de 1990, se pensaba que el envejecimiento era generalmente un proceso aleatorio y azaroso. La Dra. Kenyon investigó el envejecimiento ya que pensaba que, como tantos otros procesos de la biología, estaría sujeto a mecanismos evolutivamente conservados de la regulación. Un mutante viviendo ~ 50% más de lo normal, *age-1* (hx546), había sido identificado por Klass y Johnson, pero en ese momento se sospecha que ese mutante vivía mucho más tiempo a causa de un *trade-off* reproductivo. Buscaron mutantes de larga vida, y descubrieron que las mutaciones en *daf-2* doblaban el tiempo de vida del animal (independientemente de la reproducción) [74]. Se clonó *daf-2* en el laboratorio de Gary Ruvkun, y se mostró que codifica para un receptor del tipo insulina/IGF-1. En conjunto, estos resultados indican que el proceso de envejecimiento está sujeta a activa regulación endocrina. Otro descubrimiento importante en esa época es que para que los animales mutantes DAF-2 vivan tanto tiempo se requiere la actividad de un segundo gen, *daf-16*, que posteriormente se mostró que codifica un factor de transcripción de la familia FOXO [75]. DAF-16 ha demostrado ser un nodo clave en una red de regulación que afecta el envejecimiento. Su función se requiere para una amplia variedad de condiciones que prolongan la vida, incluyendo la sobreexpresión del factor de transcripción de choque térmico, quinasa AMP, y el momento de microARN *lin-4*. Esta vía de longevidad es conservada. Las proteínas FOXO (DAF-16) incluso regulan la vida útil de la levadura.
- Se ha demostrado que la actividad del receptor DAF-2 de *C. elegans* regula DAF-16/FOXO, al menos en parte, mediante el control de su localización nuclear a través de AKT dependiente de fosforilación [76]. Las mutaciones *daf-2* influyen en el desarrollo, la reproducción y la resistencia al estrés, así como el envejecimiento. Se ha demostrado que ambos *daf-2* y *daf-16* actúan exclusivamente durante la edad adulta para regular el envejecimiento y la resistencia al estrés, mientras que actúan antes para influir en el desarrollo y la reproducción [77]. Estos hallazgos tienen implicaciones terapéuticas interesantes, y, confirmaron que la vía insulina/IGF-1 controla la reproducción y el envejecimiento independientemente uno de otro.
- Se demostró que receptores DAF-2/Insulina/IGF-1 y DAF-16/FOXO actúan de una manera no celautónoma para controlar múltiples señales descendentes que

influyen en la vida útil [78] [79]. Se encontró que la actividad de DAF-16 en las células intestinales y adipocitos afecta a otros tejidos de dos maneras: primero, que la retroalimentación-regula la expresión de un gen de la insulina, *ins-7*, lo que provoca que la actividad de DAF-16 se eleve en otros tejidos [80]. En segundo lugar, actúa a través de un diferente, desconocido, camino para mantener a los otros tejidos vivos incluso si son *daf-16 (-)* [79].

- Usando microarrays seguido de ARNi se demostró que DAF-16 controla la expresión de una amplia variedad de genes río abajo funcionalmente importantes, cada uno de los cuales, por sí solo, tiene sólo un efecto modesto sobre la esperanza de vida [72]. Estos genes río abajo codifican proteínas protectoras de la célula, chaperonas, proteínas antimicrobianas, proteínas metabólicas y proteínas nuevas [72]. De esta manera el animal contiene un módulo de regulación para el envejecimiento, en el que diversas actividades de genes pueden ser coordinadas por DAF-16 y otros reguladores de río arriba para producir grandes efectos sobre la esperanza de vida.
- Se descubrió que el factor de transcripción de choque térmico regula el envejecimiento. Con esto, se descubrió que el ARNi del factor de transcripción de shock térmico de *C. elegans* HSF-1, que regula la respuesta de choque térmico, causa progeria (envejecimiento rápido) [81]. A continuación, se mostró que la sobreexpresión de HSF-1 extiende la vida útil [82]. HSF-1, como DAF-16, es absolutamente necesario para la longevidad de los mutantes *daf-2*. HSF-1 sólo se requiere para la expresión de un subconjunto de genes diana de DAF-16. Estos genes pueden incluir efectores esenciales de la longevidad. Incluyen las pequeñas proteínas de choque térmico, cuya regulación en los mutantes *daf-2* requiere HSF-1, así como DAF-16. De hecho, se encontró que las pequeñas proteínas de choque térmico contribuyen a la longevidad de los mutantes *daf-2*.
- Mutantes DAF-2 tienen una respuesta de estrés del retículo endoplasmático (RE) muy potente, lo que contribuye a su longevidad. Se encontró que los mutantes *daf-2* son resistentes al estrés del RE [83]. Esta resistencia al estrés del RE es completamente dependiente del factor de transcripción XBP-1 UPR. Paradójicamente, los niveles de ARN XBP-1, y genes diana de XBP-1 como *hsp-4/BIP*, se expresan a menores, no superior, niveles en mutantes *daf-2*. Posteriormente, se propuso un modelo, en los mutantes *daf-2*, XBP-1 colabora con factores de transcripción activados tales como DAF-16 para expresar nuevos y potentes genes de RE-homeostasis. El uso de microarrays seguido por la genética, permitió identificar un gen regulado río arriba por XBP-1 y DAF-16 en mutantes *daf-2* que contribuye a la longevidad de mutantes *daf-2*.
- Se descubrió que la percepción sensorial regula la esperanza de vida en *C. elegans* [84]. El efecto es en gran parte dependiente de DAF-16. Curiosamente, los niveles de insulina aumentan en mayor medida en las personas cuando huelen la comida que están comiendo. Cuando se concentró en las neuronas específicas usando un láser [85], se encontró que la pérdida de una neurona gustativa llamados ASI extiende la vida útil, y esta extensión de vida requiere otra neurona, ASJ. Particularmente, ASJ no es requerida para la pérdida de neuronas olfativas para extender la vida útil.

- Se descubrió que disminuyendo las células germinales de la gónada (específicamente las células madre de línea germinal) se extiende la vida útil de *C. elegans* [86] [87]. En los mamíferos, también, la señalización reproductiva puede extender la vida útil [88].
- La extensión de vida útil de *C. elegans* sin línea germinal requiere DAF-16/FOXO. Hemos encontrado que la eliminación de las células germinales estimula la localización nuclear de DAF-16 en el tejido del intestino grueso/adiposo, específicamente en el adulto [76]. Esta localización es significativa, porque expresar DAF-16 sólo en el intestino es suficiente para dar cuenta de toda la extensión de vida producido por la eliminación de la línea germinal [79]. La localización nuclear de DAF-16 requiere completamente KRI-1, una proteína que contiene ankyrin conservadas [89]. Además, la función de DAF-16 (pero no su localización) requiere un supuesto factor de transcripción-elongación llamado TCER-1 [90]. Hay muchas diferencias interesantes entre el papel de DAF-16 en la vía de la línea germinal y su papel en la vía DAF-2/insulina/IGF-1. Por ejemplo, la especificidad del momento y del tejido especificidad de la localización de DAF-16 son diferentes.
- Una característica particularmente interesante de la vía de la longevidad de la línea germinal es que (de nuevo, a diferencia de la vía *daf-2*) requiere al receptor de la hormona nuclear DAF-12 [86]. DAF-12 es el ortólogo gusano de los receptores de vitamina D y LXR en humanos. Se ha demostrado que el ácido dafacrónico y DAF-12 son los medios por los que la gónada somática extiende la vida útil cuando las células germinales se han ido [91]. DAF-16 todavía puede entrar en el núcleo cuando se retira la línea germinal en mutantes DAF-12 (al menos parcialmente), así que también hay otras señales procedentes de la línea germinal en el intestino.
- Se ha descubierto que la inhibición de la respiración mitocondrial leve o síntesis de ATP aumenta la vida útil [92]. Curiosamente, se ha encontrado que la respiración debe ser inhibida durante el desarrollo para que la vida útil se extienda, lo que sugiere que un interruptor se lanza durante el desarrollo que influye en la vida posterior. Hemos encontrado que el factor de transcripción HIF-1 inducible por hipoxia se requiere para esta prolongación de la vida [93]. HIF-1, a su vez, es activada por ROS, cuyos niveles aumentan cuando se inhibe la respiración.
- Desde una proyección de RNAi, se encontró que reduciendo los niveles de las proteínas ribosomales se extiende la vida útil. Lo mismo ocurre con la inhibición de la proteína ribosomal S6 quinasa o factores de traducción-iniciación [94]. Estas perturbaciones, así como la inhibición del sensor de nutrientes TOR, que se sabe que aumenta la esperanza de vida, todo aumenta de la resistencia térmica de estrés. Así inhibiendo la traducción puede extender la vida útil al cambiar a un estado fisiológico que favorece el mantenimiento y reparación. Se pasó a demostrar que la inhibición del TOR, así como la restricción calórica (que inhibe TOR), desencadena la autofagia, y que la autofagia es necesaria para la extensión de la vida [95].

- Muchas personas piensan que las mutaciones que retrasan el envejecimiento acelerarían el crecimiento del cáncer. Sin embargo, se encontró que de larga vida de insulina/IGF-1, la restricción calórica y las mutaciones mitocondriales son todos resistentes a los tumores de la línea germinal en el modelo de *C. elegans* de tumor, debido al aumento de la apoptosis DAF-16 y dependiente de p53, y/o disminución de la mitosis [96]. Curiosamente, ninguna de estas mutaciones de la línea germinal de longevidad afectada mitosis en animales normales, lo que sugiere que los cambios celulares que conducen a la longevidad antagonizan específicamente el crecimiento celular excesivo.
- Muchos ectotermos ("animales de sangre fría"), incluyendo *C. elegans*, tienen vida más corta a alta temperatura que a baja temperatura. La alta temperatura se utiliza generalmente para aumentar la "tasa de vida" simplemente aumentando las tasas de reacciones químicas. Sin embargo, muchos de los procesos que parecen ocurrir pasivamente llegan a ser regulados. Se encontró que las neuronas termosensibles juegan un papel regulador. La inhibición de su función hace que los animales tengan la expectativa de vida aún más corta a temperatura cálida. Las neuronas termosensibles afectan la vida útil a través *daf-2* dependiente de señalización de esteroides. El sistema termosensorial puede permitir a *C. elegans* reducir el efecto de la temperatura cálida que de lo contrario tendría sobre el envejecimiento, algo que los animales de sangre caliente lo hacen mediante el control de la temperatura en sí.
- Debido a que la glucosa provoca la liberación de insulina en los mamíferos, y se estudió el efecto en *C. elegans*. Para ello se alimentó a gusanos con bajos niveles de glucosa (2%) y se midió su vida útil. La glucosa acorta la vida útil de los animales de tipo salvaje, pero no animales que carecen de *daf-16/FOXO*. Este hallazgo sugiere que la glucosa acorta la vida útil río arriba de la vía de señalización de la insulina/IGF-1. Este estudio sugiere que la glucosa acorta la vida útil a través de un camino que implica no sólo DAF-16, pero también insulinas, HSF-1 y un canal de glicerol acuaporina [97].
- Muchas enfermedades neurodegenerativas están relacionada con la edad, y se estudian en los modelos de gusano. Por ejemplo, se ha encontrado que las pequeñas proteínas de choque térmico retrasan (tipo-Huntingtin) la agregación polyQ de proteínas en *C. elegans* [82]. Más recientemente, se ha encontrado que la pérdida del gen progranulina, cuya insuficiencia potencializa enfermedades neurodegenerativas humanas, acelera la velocidad a la que las células apoptóticas son engolfadas en *C. elegans*. Del mismo modo, los macrófagos de progranulina de ratones mutantes engullen células apoptóticas más rápido que lo hacen los macrófagos de tipo salvaje [98].
- Las proteínas de enfermedades neurodegenerativas humanas como Ab de Alzheimer y Huntingtin se vuelven propensas a la agregación con la edad. Debido a lo anterior, se estudió si este fenómeno ocurría en *C. elegans*. Con el uso de la espectrometría de masas, se encontró que cerca de 450 proteínas endógenas reproducibles se vuelven insolubles con la edad [99]. En el animal, las seis proteínas que se examinaron todas forman agregados-FRAP insoluble. En lo que puede ser un círculo vicioso, las proteínas que mantienen proteostasis se agregan

ellas mismas, incluyendo proteínas proteosomales y ribosomales. Diferentes proteínas se agregan en diferentes partes de la célula, incluyendo el nucleólo, centrosoma-asociado a proteínas mal plegadas en la célula, y el citoplasma general. Sorprendentemente cerca de la mitad de los componentes menores de placas de Alzheimer humanos están presentes en este juego de proteínas insolubles de *C. elegans*. Así que es posible que hayan descubierto algo de importancia general. En mutantes *daf-2*, se ven agregados pero son-FRAP soluble. Esta podría ser una explicación de por qué mutantes *daf-2* viven tanto tiempo.

- En 2002, el laboratorio de M. Driscoll informó que las neuronas en *C. elegans* no envejecen. Con esta información el equipo de investigación de C. Kenyon miraron más de cerca, sin embargo, encontraron que las neuronas hacen exhibir un cambio dependiente de la edad: se empiezan a elaborar nuevas ramificaciones [100]. Este es un raro ejemplo de crecimiento en la vejez; el cáncer es otra. La señalización de quinasa Jun y también la vía de señalización de la insulina / IGF-1 ambas influyen en el momento de la ramificación neuronal. Ambas vías actúan celautonomamente en las neuronas. Esto significa que es posible para el animal en general envejecer más rápidamente, mientras que al mismo tiempo se hace más lenta la ramificación neuronal (o viceversa).

2.3.2 Relación entre la dieta, la expresión genética y la fisiológica en *C. elegans*

En el laboratorio de Marian Walhout se utiliza una variedad de sistemas experimentales y computacionales enfocados en biología para mapear y caracterizar redes reguladoras de genes y para entender cómo los circuitos de regulación controlan el desarrollo de los animales, la función y la homeostasis. Además, se sabe que la dieta influye mucho en numerosos rasgos y enfermedades, por lo que en el laboratorio de Marian Walhout utiliza el nematodo *C. elegans* para comprender mejor las conexiones entre la dieta, la expresión genética y la fisiología, y han comenzado a delinear las vías metabólicas y las reguladoras genéticas implicadas en la respuesta de la dieta. A continuación se presentan algunas investigaciones sobre la influencia de la dieta en *C. elegans* que se han sido descubiertos por este equipo de investigación.

- En *C. elegans*, similar como en mamíferos, las mutaciones en el homólogo *tubby*, *tub-1*, promueve un incremento de deposición de grasa. Aquí, se muestra que la mutación en *tub-1* también conduce a la extensión de la vida útil dependiente de *daf-16/FOXO*. Interesantemente, la función de *tub-1* en almacenamiento de adipositos es independiente de *daf-16*. Un screen de dos híbridos de levadura identificó una nueva interacción de pareja de TUB-1 (RBG-3); una proteína activadora de RabGTPase. Tanto TUB-1 y RBG-3 localizan a las neuronas que se solapan. Importantemente, ARNi de RBG-3 disminuye la deposición de grasa en mutantes *tub-1* pero no afecta la vida útil. Se demostró que TUB-1 se expresa en las neuronas ciliadas y se somete tanto el transporte dendrítico como ciliar. Adicionalmente, los mutantes *tub-1* son quimiotaxis defectuosos. Por lo tanto, una *tub-1* puede regular el almacenamiento de grasa, ya sea mediante la modulación de transporte, sintiendo, o respondiendo a las señales en las neuronas ciliadas. En conjunto, se define el papel de *tub-1* en la regulación

de la duración de la vida y demostrar que la *tub-1* regula la duración de la vida y el almacenamiento de grasa por dos mecanismos independientes [101].

- Las proteínas 14-3-3 están conservadas evolutivamente y las proteínas ubicuas que funcionan en una gran variedad de procesos biológicos. En este trabajo se define un nuevo rol para las proteínas 14-3-3 de *C. elegans* en la regulación de la vida útil. Se identificaron dos proteínas 14-3-3 en *C. elegans* como proteínas de interacción del principal regulador de la vida útil, el ortólogo SIR2 de *C. elegans*, SIR-2.1. Similar a *tosir-2.1*, se encontró la sobreexpresión de ambas proteínas 14-3-3 (PAR-5 o FTT-2) extienden la vida útil y que esto es dependiente de DAF-16, un factor de transcripción forkhead (FOXO), otro importante regulador de la vida útil en vía de señalización de la insulina/IGF-1. Además, se muestra que ambas proteínas 14-3-3 son co-expresadas con DAF-16 y SIR-2.1 en los tejidos críticos para la extensión de la vida útil. Finalmente, se muestra que DAF-16/FOXO también interactúa fisiológicamente con las proteínas 14-3-3. Estos resultados sugieren que las proteínas 14-3-3 de *C. elegans* pueden regular la longevidad cooperando con ambos SIR-2.1 y DAF-16/FOXO [102].
- La composición dietaria tiene un gran efecto en la fisiología. En esta investigación se muestra que la tasa de desarrollo, de reproducción y de vida útil son alterados en *C. elegans* alimentados con *Comamonas* DA1877 en comparación con aquellos alimentados con una dieta estándar de *E. coli* OP50. Se identificó una serie de genes que cambian en expresión en respuesta a esta dieta y usa el promotor de uno de estos (*acdH-1*) como un sensor dietario. Notablemente, los efectos en la transcripción y el desarrollo ocurren incluso cuando se diluye *Comamonas* DA1877 con otra dieta, sugiriendo que *Comamonas* DA1877 genera una señal que es sentida por el nematodo. Sorprendentemente, el efecto del desarrollo es independiente de la señalización TOR e insulina. Más bien, *Comamonas* DA1877 afecta la expresión cíclica de genes durante la muda de la piel, probablemente a través del receptor de la hormona nuclear NHR-23. En general, este descubrimiento indica que diferentes bacterias provocan varias respuestas a través de distintos mecanismos, lo que tiene implicaciones en enfermedades como la obesidad y la interacción entre microbioma y células intestinales humanas [103].
- La red que controla las respuestas dietarias se mantienen ampliamente no caracterizadas. A continuación, se combinan screens de genética hacia adelante y reversa para delinear una red de 184 genes que afectan la respuesta dietaria de *C. elegans* frente a la bacteria *Comamonas* DA1877. Se descubrió que perturbaciones de una red mitocondrial compuesta de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos y el ciclo TCA afecta la respuesta dietaria. En humanos, las mutaciones en los genes correspondientes provocan enfermedades innatas del metabolismo de aminoácidos, la mayoría de los cuales son tratados por intervención dietaria. Se identificaron varios factores de transcripción (TFs) que median los cambios en expresión de genes desde perturbaciones de redes metabólicas. En general, este descubrimiento revela un sistema de respuesta transcripcional que está a punto de sentir señales dietéticas y desequilibrios metabólicos, que ilustran una amplia comunicación entre las redes metabólicas de las mitocondrias y de genes de redes reguladoras en el núcleo [104].

- M. Walhout y L. McNeil compararon los efectos de diferentes dietas bacterianas en los rasgos de historia de vida y la expresión de genes [105]. A continuación se resumen diferentes dietas bacterianas utilizadas para *C. elegans* y cómo afectan a estos animales. Sydney Brenner introdujo por primera vez a *C. elegans* como un sistema modelo y él los propagó en *Escherichia coli* OP50, una auxotrofia en el uracilo es decir un crecimiento restringido por un suministro limitado de uracilo en los medios. Debido a su crecimiento limitado, esta cepa era más adecuada que otras dietas bacterianas para la visualización de gusanos por microscopía [8]. En los últimos años, el número de dietas bacterianas utilizadas para propagar a *C. elegans* se ha ampliado y con esta expansión se ha ganado mayor apreciación por la contribución de la dieta en la fisiología de *C. elegans*.

Muchas dietas diferentes de bacterias pueden apoyar el desarrollo de *C. elegans*. Sin embargo, las características fisiológicas que determinan la supervivencia de los animales a través del tiempo, colectivamente denominados "rasgos de historia de vida", pueden verse afectados de manera diferente por distintas dietas. Estos rasgos incluyen esperanza de vida, la fertilidad y tasa de desarrollo. Por ejemplo, los animales alimentados con *E. coli* HB101 o *Comamonas* DA1877 se desarrollan más rápidamente que los animales alimentados con *E. coli* OP50 o *E. coli* HT115 [103] [106]. Efectos fenotípicos inducidos por la dieta son acompañados por grandes diferencias en la expresión de genes [103] [107], el perfil metabólico [108] y la composición de ácidos grasos [109].

Las dietas bacterianas suministran macronutrientes, tales como hidratos de carbono, grasas y proteínas que se necesitan para hacer biomasa durante el crecimiento y la reproducción y para generar energía. Además, las bacterias proporcionan micronutrientes esenciales tales como vitaminas y cofactores. Por ejemplo, *E. coli* HB101 y *E. coli* HT115 contienen de tres a cinco veces la cantidad de carbohidratos totales que se encuentran en *E. coli* OP50 [109]. La presencia o ausencia de estos micronutrientes tiene el potencial de influir significativamente en el uso de vía metabólica y, por tanto, dar lugar a cambios sistémicos. Una advertencia en la medición de los niveles globales de nutrientes es que, aunque diferentes cepas de bacterias pueden ser similares en el contenido de la dieta, la capacidad de *C. elegans* a ingerir estas bacterias pueden alterar la disponibilidad de nutrientes para el animal.

Factores derivados de bacterias pueden afectar a *C. elegans* en un número de maneras. Algunos pueden actuar como nutrientes, contribuyendo a la generación de biomasa o energía, mientras que otros pueden actuar como señales químicas actuando, ya sea positiva o negativamente, en procesos celulares. Esto es quizás mejor estudiado con respecto a las cepas patógenas de bacterias, de las cuales algunas señales derivadas de bacterias estimulan una respuesta inmune y, por tanto, beneficia al gusano mientras que otros actúan perjudicialmente al interferir con la respuesta inmune innata [110]. Además, algunas moléculas de la dieta, pueden actuar como señales que divulgan información sobre el medio ambiente. Un número de moléculas derivadas de bacterias son neuronalmente detectadas por *C. elegans* y el resultado en los comportamientos de atracción o repulsión. Estos mecanismos de detección de probabilidades se utilizan para identificar las fuentes de alimentos adecuados y evitar los ambientes nocivos.

C. elegans es único entre los organismos modelo en que los animales se propagan en una dieta viva. Si bien históricamente esto se ha basado en la comodidad, hay ventajas adicionales. Por ejemplo, como se mencionó anteriormente, las bacterias vivas pueden servir como sistemas de suministro de nutrientes convenientes para *C. elegans* u otras biomoléculas que son de corta vida (por ejemplo, NO). La presencia de bacterias en crecimiento puede garantizar la síntesis continuada de estas moléculas, y, por tanto, la disponibilidad de estos factores durante toda la vida del animal. Una consideración final para una dieta viva es el potencial de la deriva genética de cepas bacterianas entre laboratorios. El potencial de las bacterias para adquirir mutaciones podría resultar en diferentes laboratorios observando diferentes efectos para lo que se cree que es la misma cepa bacteriana. Esto ha sido propuesto para explicar la variación de laboratorio a laboratorio en la extensión de vida de *C. elegans* alimentado con la "misma" cepa bacteriana [107].

La microbiota intestinal humana es de importancia crítica para la salud, ya que estas bacterias ayudan a la digestión, a sintetizar compuestos esenciales, y juegan un papel importante en la inmunidad para mejorar la resistencia a los patógenos. Debido a que los compuestos derivados de bacterias pueden afectar profundamente a *C. elegans*, es tentador especular sobre el uso de *C. elegans* como modelo para estudiar cómo la microbiota intestinal afecta a la salud humana. Sin embargo, no está claro si las bacterias verdaderamente funcionan de manera similar en los gusanos, ya que aún no se ha determinado si *C. elegans* tiene una microbiota viva saludable en su entorno natural. Sin embargo, *C. elegans* tienen una relación íntima con su comida porque viven en ella y, por tanto, están constantemente expuestos a los metabolitos bacterianos. Así, para *C. elegans*, la comida puede tener efectos similares a los de la microbiota en los seres humanos, incluso antes de que las bacterias colonicen el intestino. El hecho de que *C. elegans* puede ser alimentados con diferentes bacterias y que las bacterias pueden afectar profundamente los rasgos de historia de vida del animal, junto con la trazabilidad genética de ambos gusanos y bacterias indica que los gusanos seguirán siendo un modelo de gran alcance no sólo para el desarrollo y el envejecimiento, sino también por los efectos de la dieta y la microbiota en los seres humanos [105].

2.3.3 Integridad neuronal afectada por diapausa y por la dieta

En el laboratorio de Andrea Calixto, actualmente se investiga sobre procesos requerimientos moleculares de regeneración axonal en diapausa [111] y sobre La dieta afecta a los procesos neurodegenerativos inducidos genéticamente [112].

- El primer trabajo de investigación mencionado, fue motivado ya que las neuronas sensoriales que han sido gatilladas para morir por degenerinas hiperactivas (*mec-4d*, *deg-1*) son morfológicamente y funcionalmente protegidas durante la formación de diapausa, incluso después del comienzo del proceso degenerativo. Estas neuronas se degeneran pronto después de salir de diapausa y reanudar el desarrollo [51]. Durante diapausa ocurre una significativa reestructuración metabólica. La regulación negativa del receptor de insulina DAF-2 durante diapausa permite la activación de DAF-16, el cual incrementa la capacidad celular

antioxidativa de las células, creando un ambiente neuroprotectivo, dependiente de la activación transcripcional de SODs y catalasas [51].

Para entender aún más la protección en diapausa se examinó la integridad neuronal en la entrada a dauer y cada 24 horas por 7 días. En el primer día en dauer, el 50% de los axones estaban truncados, volviendo a crecer progresivamente hasta el séptimo día donde casi todos son tipo salvaje (Wild type) y los animales responden al tacto. Esto demuestra que tanto la regeneración morfológica y funcional ocurre durante diapausa. Desde que *daf-2* es regulado negativamente en dauers y animales que no se alimentan, se examinó si una mutación *daf-2* y la restricción dietaria eran capaces de regenerar axones dañados. Ambas intervenciones confirieron protección pero no causaron regeneración. Un regulador clave de regeneración es la vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) DLK-1 [113], requerido para la regeneración axonal después de axotomía y en modelos β -spectrin de degeneración [114]. DLK-1 controla la dinámica de microtúbulos durante el rebrote axonal así como la formación del cono de crecimiento, ambos esenciales para la regeneración.

Se probó en el modelo degenerina *mec-4d* (Figura 8), si DLK-1 era requerido para la regeneración inducida de dauer, y se observó que en *dlk-1;mec-4d* dauers, los axones no fueron capaces de volver a crecer, lo que muestra una completa dependencia de DLK-1. Sin embargo, la regeneración que permite a los gusanos a evitar en diapausa con 50% de neuronas tipo salvaje eran DLK-1 independientes destacando que otros factores regenerativos pueden contribuir al rebrote axonal. Para descubrir otros genes y vías de señalización de genes implicados en la regeneración neuronal, se les practicó un examen genético para los animales que no lograron regenerar las TRNs durante la diapausa. La caracterización de estos mutantes proporcionará información nueva en los efectores genéticos y metabólicos que promueven la regeneración axonal durante diapausa.

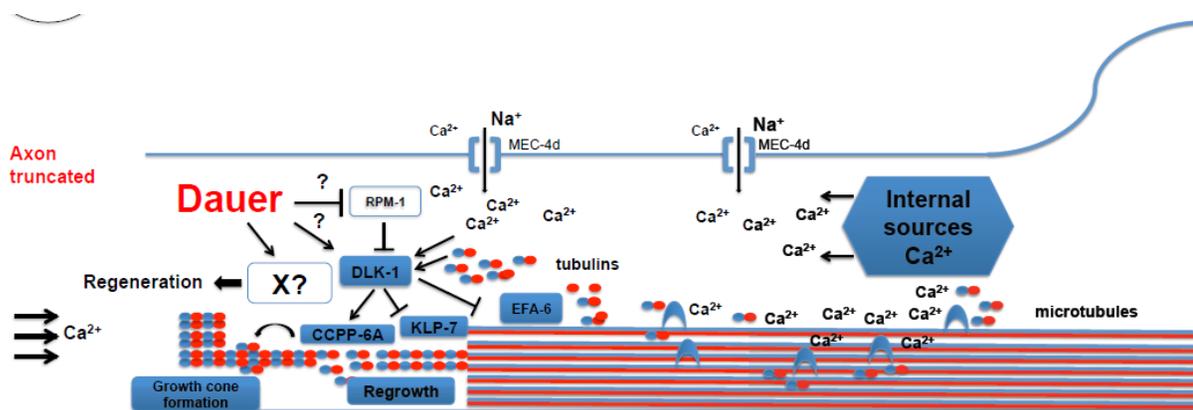


Figura 8. Modelo de regeneración en mutante dauer *mec-4d*.

La diapausa favorece la activación de DLK-1, favoreciendo así la polimerización de microtúbulos y la regeneración axonal. Adicionalmente, otras redes de genes, no relacionadas con DLK, contribuyen a la regeneración observada en Dauers [111].

- En el segundo trabajo de investigación, la dieta afecta indudablemente a la fisiología y rasgos de vida del nematodo *C. elegans*, pero aquí se pretende

investigar sobre los procesos neurodegenerativos impactados por la dieta. Y se sabe que la degeneración neuronal es impactada por factores celulares autónomos y sistémicos afectando a un organismo. Entre las primeras están: concentraciones de calcio Ca^{2+} intracelular, estatus REDOX, función mitocondrial y niveles sistólicos de NMNAT, mientras que el último incluye regulación negativa del receptor de insulina DAF-2, restricción dietaria y formación de diapausa [51]. Intervenciones que causan cambios metabólicos en un nivel sistémico pueden afectar posteriormente a las células individuales e influir en su comportamiento o fenotipo. Los efectos sistémicos a través de cambios dietarios han sido demostrados que afectan a la longevidad, tasa de desarrollo y número de progenie [105]. Una pregunta importante y sin respuesta es cómo la calidad y la composición de la dieta impacta en el metabolismo neuronal y degeneración neuronal. Anteriormente se ha demostrado que el ayuno intermitente y la inanición protege a las neuronas que fueron accionadas a morir por la apertura constitutiva de degenerinas (*mec-4d* y *deg-1*). Para comprender mejor la relación entre la dieta y la muerte neuronal, se seleccionaron un número de diferentes bacterias para alimentar gusanos *mec-4d* L1 y anotar el porcentaje de neuronas intactas y degeneradas después de la alimentación en la edad adulta. La degeneración *mec-4d* es gatillada por la apertura constitutiva de la subunidad MEC-4 del canal mecanosensorial, permitiendo un flujo constante de iones de Na^+ y Ca^{2+} , alcanzando concentraciones tóxicas dentro de la neurona [115]. Esta degeneración está caracterizada por la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos celulares y la posterior activación de calpaínas y proteasas conduciendo a una muerte neuronal. Se encontró que el tipo de dieta bacteriana define la velocidad y la extensión de la degeneración y rebrote neuronal. Actualmente, se está en proceso de caracterizar los componentes bacteriales que son protectivos de muerte neuronal y como ellos regulan las redes de genes en el animal [112].

3 Materiales y Métodos

3.1 Materiales y Equipos

3.1.1 Equipos

Los equipos utilizados para el desarrollo de este trabajo de investigación se enlistan a continuación:

- Incubadoras refrigeradoras Velp modelo FOC 225E
- Autoclave esterilizador a vapor de tipo vertical HL341
- Campana de Flujo Laminar Horizontal ESCO modelo AHC-4D3
- Centrífuga 5424 R Eppendorf.
- Balanza WTB 2000 Radwag
- Lupa estereoscópica Olympus SZ61
- Agitador Vortex Corning LSE
- Congelador FENSA Manual (-20°C)
- Transiluminador UV Major Science modelo MUV21-312
- Shaker Lab Companion modelo SI-300
- Estufa Incubadora Memmert BE600
- Visicooler (4°C)
- Microscopio de Fluorescencia Nikon modelo Eclipse Ni U y Eclipse Ti-S.

3.1.2 Reactivos y disolventes

Los reactivos utilizados en los experimentos se mencionan a continuación, previamente clasificados por laboratorio:

- Acros: D-(+)-xylosa.
- Merck: Fosfato monohidrógeno dipotásico (K_2HPO_4), fosfato di-hidrógeno de potasio (KH_2PO_4), Cloruro de Calcio ($CaCl_2$), Cloruro de Amonio (NH_4Cl), Fosfato de disódio (Na_2HPO_4), D-(+)-glucosa.
- Sigma Aldrich: Colesterol ($C_{27}H_{46}O$), Hidrocloruro de Levamizol, Tetraciclina, Sulfato de Estreptomina.
- Winkler: Cloruro de Sodio ($NaCl$), Agar Agar, Peptona, Triptona, Extracto de Levadura, Sulfato de Magnesio, Hidróxido de Sodio ($NaOH$), Alcohol Etilico (C_2H_6O), Alcohol Isopropílico (C_3H_8O).
- Clorinda: Hipoclorito de Sodio 4,9%.

3.1.3 Material biológico

Los gusanos *C. elegans* (*N2* cepa silvestre, *mec-4d* mutante de degeneración neuronal asociado a la apertura constitutiva del canal degenerina MEC-4 y *daf-2(ts);mec-4d* doble mutante: *mec-4d* con la inactivación por temperatura del receptor tipo-insulina DAF-2), y las bacterias *Escherichia coli* OP50, utilizadas como fuente de alimento, fueron obtenidos del CGC. La bacteria *E. coli* BW25113 y *E. coli* HT115 fue obtenida del laboratorio de Mark Alkema.

3.2 Métodos

A continuación se detalla la metodología de los experimentos llevados a cabo para el desarrollo del trabajo de investigación realizado en esta memoria.

3.2.1 Preparación de placas petri NGM

Para la preparación del medio NGM (Nematode Growth Medium) se mezclan 3 g de NaCl, 17 g de Agar Agar, 2,5 g de peptona en 975 mL de H₂O destilada. La mezcla es tratada en autoclave durante 50 min y, a continuación, se enfría en baño de agua a 60 °C durante 15 min. Luego, el medio NGM es enriquecido con 1 mL de CaCl₂ 1M, 1mL de colesterol (5 mg/mL etanol), 1 mL MgSO₄ 1M, 25 mL buffer KPO₄ 1M pH 6,0 (108,3 g KH₂PO₄, 35,6 g K₂HPO₄, en 1 L de H₂O), 1 mL de Estreptomina (25 mg/mL) o Tetraciclina (12,5 mg/mL). La solución NGM se transfiere a las placas de Petri (60x15 mm o 100x15 mm) bajo condiciones estériles. Antes de utilizarse, las placas se dejan enfriar a temperatura ambiente, en campana de flujo laminar [11].

3.2.2 Preparación de medios de bacterianos

Las bacterias se cultivan en medio LB (Lysogeny Broth) esterilizado en autoclave, el cual contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl en 1 L de H₂O destilada. Las bacterias se dejan incubando a 37°C por 5 a 8 horas.

3.2.3 Sembrado de placas

Las placas con medio NGM estéril, preparadas como se ha mencionado anteriormente, se siembran en forma estéril con las bacterias crecidas en el medio de cultivo. Se depositan en las placas (de 60x15 mm) aproximadamente 200 µL de *E. coli*. Se dejan secar 24 horas y luego están listas para ser utilizadas.

3.2.4 Transferencia de Gusanos que crecen en NGM

Se utilizan varios métodos para la transferencia de *C. elegans* de una placa de Petri a otro. Un método rápido y conveniente es "CHUNKING", en el que una espátula esterilizada (Figura 9) se utiliza para mover un trozo de agar de una placa antigua a una placa fresca. Los gusanos se arrastran fuera de la porción y se extienden hacia fuera sobre el césped bacteriano de la nueva placa.



Figura 9. Espátula esterilizada utilizada para el método Chunking.

Otro método consiste en recoger los animales individuales con un selector de gusano (Figura 10). Un selector de gusano se puede hacer mediante el montaje de una pieza de 1 pulgada de alambre de platino de calibre 32 en ya sea la punta de una pipeta pasteur o en un soporte de asa bacteriológica. El alambre de platino se calienta y se enfría rápidamente y se pueden flamear a menudo (entre las transferencias) para evitar

la contaminación de las poblaciones de gusano. El extremo del alambre que se utiliza para la recogida de gusanos, puede ser aplanado ligeramente con un martillo y luego suavizado con una lija para eliminar bordes afilados. Se necesita un poco de experiencia con un selector de gusano para evitar hacer agujeros en el agar. También, se puede recoger uno o varios gusanos utilizando una gota de bacteria en el extremo del selector. Para poner un gusano recogido en un plato fresco, se baja lentamente la punta del selector de gusano hasta tocar suavemente la superficie del agar, y manteniendo esa posición permite que el(los) gusano(s) se arrastre(n) fuera del selector.

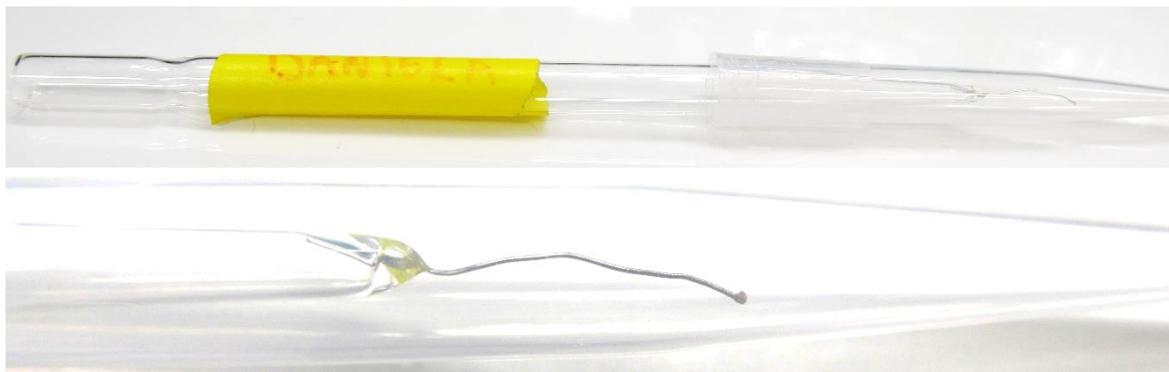


Figura 10. Selector de gusanos: Pipeta pasteur con alambre de platino.

3.2.5 Mantención de Gusanos

C. elegans silvestre (N2) y *mec-4d;uIs31* (e1611)X $_{(P_{mec-17}mec-17::gfp)}$, se mantuvieron en placas de agar NGM, inoculados con *E. coli* OP50 a 20°C.

C. elegans daf-2(ts);mec-4d;uIs31 (e1611)X $_{(P_{mec-17}mec-17::gfp)}$, se mantuvieron en placas de agar NGM, inoculados con *E. coli* OP50 a 25°C.

3.2.6 Sincronización de Gusanos

La sincronización de *C. elegans* se realiza con el objetivo de que todos los individuos que se van a utilizar para un determinado ensayo se encuentren en el mismo estado larvario, es decir, tengan todos ellos la misma edad. Para ello se deja crecer durante varios días gusanos en las placas hasta obtener gran cantidad de huevos y/o hermafroditas grávidas. El proceso de sincronización se lleva a cabo por medio de una solución de “Bleaching” (750 μ L de Cloro, 500 μ L de NaOH y 3,75 mL de H₂O destilada), que destruye todas las larvas y la cutícula de los gusanos adultos sin afectar a los huevos.

Para efectuar la sincronización de los gusanos, se recolectan en tubos de microcentrífuga 1,5 mL. Huevos y gusanos grávidos mediante lavado de las placas con tampón M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl, 1 mL MgSO₄ 1M, H₂O hasta 1 L, esterilizar por autoclave). Posteriormente, se centrifugaba durante 2 min a 2500 rpm y a 22°C. El sobrenadante se retira y sobre el residuo de gusanos se agrega 1 mL de solución de Bleaching, se agita vigorosamente con el vortex durante 2 a 5 min, luego se centrifuga durante 2 min a 2500 rpm y, a continuación, se elimina el sobrenadante. Consecutivamente, se lava el pellet de huevos que queda en el tubo con 1 mL de M9, se

agita vigorosamente, se centrifuga por 2 min a 2500 rpm y luego se descarta el sobrenadante, se repite este proceso una vez más. Para obtención del cultivo sincronizado, el residuo final del proceso de sincronización se reparte en placas de Petri inoculadas. Después de dos horas de espera, se utiliza una pipeta de boca (Figura 11) y buffer M9 para coleccionar las larvas L1 presentes, se transfieren 30 a 40 larvas L1 a placas frescas previamente inoculadas con la bacteria indicada en cada experimento. Los experimentos son realizados a 20°C para el mutante *N2*, *mec-4d* y 25°C para el mutante *daf-2(ts);mec-4d*.

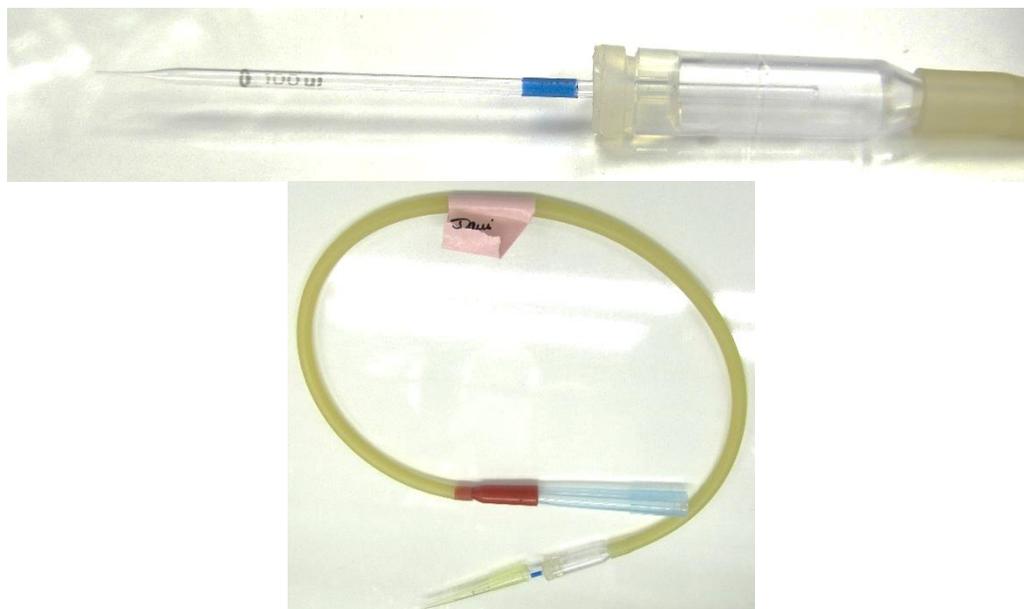


Figura 11. Pipeta de Boca.

3.2.7 Inactivación de bacterias por luz ultravioleta (UV)

Se inoculan placas de agar NGM con 200 μ L de un cultivo de *E. coli* OP50 ó *E. coli* K12 ó *E. coli* HT115 crecidos overnight en caldo LB. Posteriormente las placas inoculadas son expuestas a radiación ultravioleta en el transiluminador durante 30 segundos a 1 minuto.

3.2.8 Protocolo de visualización neuronal de Gusanos

Para la visualización neuronal bajo microscopia de fluorescencia, todos los animales de este estudio fueron recolectados desde placas de agar NGM utilizando asa con punta de platino (estadios larvales L3, L4 y adultos). Posteriormente los animales fueron depositados en porta objetos con agarosa 2% (pads), 1 pad por cada muestra (30 animales/pad) e inmovilizados con una gota de hidrocloreuro de levamisol 100mM. Finalmente se analizó la integridad neuronal del animal con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ni.

3.2.9 Criterios para evaluación de Integridad Neuronal

Los criterios para la evaluación neuronal utilizados en este estudio corresponden a la progresión degenerativa morfológica del axón de la neurona AVM definida por

Calixto.,et al. (2012) [51] en animales *mec-4d* y *daf-2(ts);mec-4d* (Figura 12). Todas las categorías fueron registradas por medio de visualización bajo microscopía de fluorescencia, siendo el detalle de cada categoría el siguiente:

Axones:

- Axón “wild type” (AxW): Si presenta una estructura de axón íntegra correspondiente a un animal silvestre (color verde).
- Axón Beaded (AxB): Si presenta indicios de vacuolarización en forma de cuentas a través de la extensión del axón (color amarillo).
- Axón “Truncated” (AxT): Si la extensión del axón es detectable hasta la altura del cordón nervioso o menor a esto (axón presente posterior a la altura de la vulva) (color naranja y rojo).
- Axón \emptyset (Ax \emptyset): Si el axón es inexistente, de acuerdo a la posición en un animal silvestre de la misma edad (color blanco).

AVM axons

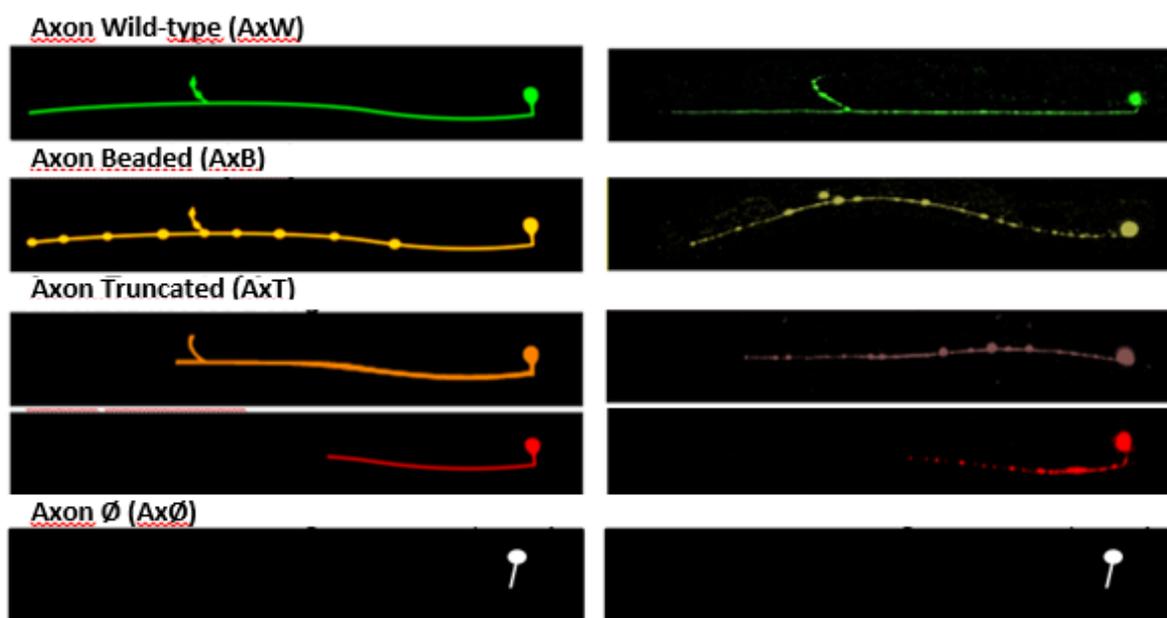


Figura 12. Categorías morfológicas axonales.

Imágenes correspondientes a las distintas categorías de axones medidas en este estudio. Columna izquierda, representación esquemática de la morfología de una neurona AVM en las distintas etapas degenerativas. Columna derecha, imágenes morfológicas de la neurona AVM a través de microscopía confocal [51].

3.2.10 Preparación de placas petri para los ensayos con azúcares

En 100 mL de agua destilada se agregan 20 gramos de glucosa o xilosa y se ponen en el microondas por 1 minuto hasta disolver completamente. Luego, la solución al 20% se filtra, en condiciones estériles, utilizando una jeringa y un filtro de 0.02 mm, se traspa a tubos de 15 mL estériles. Y se guardan a temperatura ambiente.

Para preparar placas de 60x15mm con NGM y glucosa o xilosa, el medio NGM sólido luego de pasarlo por baño de agua a 60°C por 15 minutos se mezcla con suficiente solución de glucosa o xilosa al 20% para que finalmente se alcance una concentración de 2% de azúcar en NGM. Se procede igual que en la preparación de placas de Petri y medio NGM.

Posteriormente, se prepara la bacteria para inocular las placas con medio NGM, luego de crecidas las bacterias por 5 a 8 horas en medio LB a 37°C, bajo campana se mezclan las bacterias con glucosa o xilosa al 20% para obtener una concentración de 2% de azúcar en el medio. Inmediatamente después, se inoculan las placas de Petri con 200 µL de bacteria. Se espera a que se sequen y luego se inactivan con luz UV.

3.2.11 Caracterización Fenotípica

Ensayos de Desarrollo

Este experimento es una curva temporal y para ello se sincronizan los gusanos mediante la recolección de animales L1 recién eclosionados dos horas después del lavado de un plato con el método de bleaching con gusanos de etapas mixtas, principalmente huevos y hermafroditas grávidas. Se recogen grupo de alrededor de 30 gusanos en estado larvario L1 utilizando buffer M9 y una pipeta de boca, luego se colocan en placas nuevas de Petri con medio NGM y con alimento (la bacteria correspondiente para el experimento). Luego se procede a incubar a 20°C (*E. coli* OP50 y *E. coli* HT115) y 25 °C (*E. coli* K12 (BW25113)). Posteriormente, se observan con la lupa en el momento adecuado, después de 12 horas, 24 horas y 72 horas, cuantificando visualmente el crecimiento de los gusanos clasificado en los grupos de edad basados en el desarrollo de la vulva (Figura 13). Los experimentos eran realizados por tríplica y, además triplicados biológicos, es decir al menos 270 animales fueron contabilizados para cada experimento.

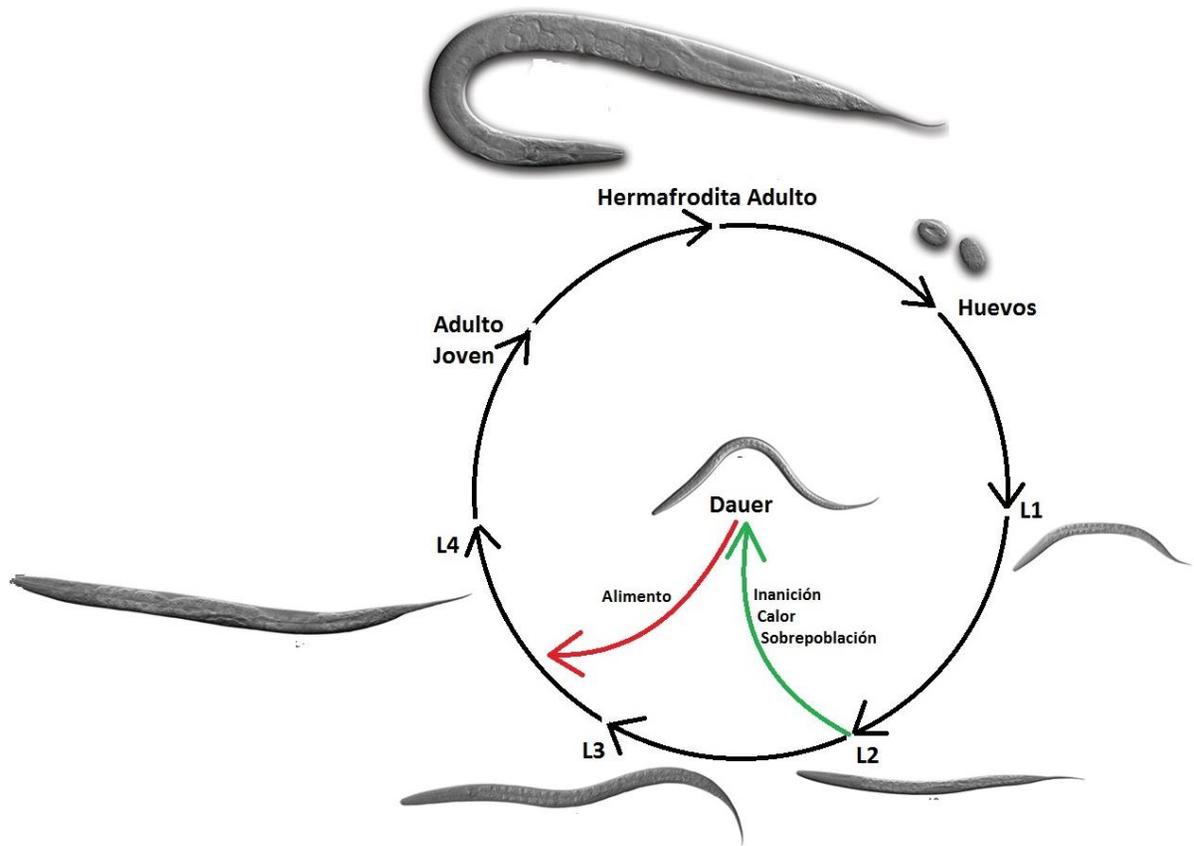


Figura 13. Estados Larvarios

Ensayos de Fertilidad

Para realizar el experimento se utilizan Placas Petri de 24 pocillos. Se agrega 1 mL de NGM por pocillo complementado con el azúcar al 2 % si es el caso, y se inocula la placa con 40 μ L de bacteria por pocillo (*E. coli* OP50, *E. coli* HT115, *E. coli* K12) crecida 8 horas a 37 °C, se esperan de 1 a 2 horas y luego se exponen al transiluminador UV por 40 segundos para inactivar a las bacterias.

Luego se deja secar 1 día y se pone 1 gusano en estado larvario L4 por pocillo, y a las 48 horas de esto, se colectan individualmente los gusanos de los pocillos y se posan sobre 4 μ L de solución de bleaching se esperan de 5 a 15 minutos hasta que el nematodo esté desintegrado y los huevos estén expuestos.

Se cuentan los huevos que se encontraban en la gónada. Finalizado esto se procede a contar la progenie en cada pocillo por placa. El experimento está hecho por triplicado. Y cada muestra tiene 16 gusanos.

4 Resultados y Discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos de los diferentes experimentos realizados para estudiar el efecto de la dieta (bacterias y azúcares) sobre la fecundidad, el desarrollo y la protección neuronal de *C. elegans*.

4.1 La dieta bacteriana afecta la fecundidad de *C. elegans*

C. elegans es un animal que posee dos sexos, hermafroditas y machos, lo que le permite tener progenie con mayor facilidad, es decir, la hermafrodita se auto fecunda y tiene alrededor de 300 huevos en su periodo fértil, y en el caso de ser fecundada por un macho, puede tener alrededor de 1000 descendientes [116] [19]. Además, este nematodo posee genes que disminuyen la duración de la vida, pero ¿por qué los gusanos - y presumiblemente otras especies - se aferran a tantos genes reductores de vida? Una respuesta podría ser que, como los genes son (o al menos eso se presume) seleccionados sobre la base de su capacidad para promover la reproducción y, por tanto, la continuidad de la especie, los genes acortadores de vida deben proporcionar ciertas ventajas reproductivas a un animal joven. En otras palabras, como Charles Darwin propuso, adultos post-reproductivos son de poca o ninguna utilidad [57]. Por lo tanto, el objetivo de vida de *C. elegans* es dejar progenie para conservar la especie.

Por lo anterior, una situación óptima para el gusano es alimentarse con una dieta que le permita tener la mayor cantidad de hijos (huevos) posible. Para ello, se midió la fecundidad, la que se define como la capacidad de *C. elegans* de deponer huevos (huevos ex utero) en una ventana de tiempo determinado, para este caso, 24 horas posteriores al estado larvario L4. Bajo este concepto, se utilizan dos mutantes del nematodo, *mec-4d* y *daf-2(ts);mec-4d*, y con cada una de ellas se compara el efecto que tienen los azúcares (la glucosa y la xilosa) con el control de las diferentes bacterias, además, se compara el efecto sobre la fecundidad que provocan las diferentes condiciones en gusanos alimentados con la misma bacteria.

En la tabla 1 se muestra la comparación de los datos de la cantidad de huevos ex útero de mutantes *mec-4d* con una condición (sin azúcar= control, con D-glucosa o d-xilosa) en animales alimentados con bacterias distintas. Se realiza una prueba de t de student, por ejemplo, se comparan los datos de los gusanos control (sin azúcares) alimentados con *E. coli* OP50 (calidad nutricional mediocre) versus los alimentados con *E. coli* K12 (calidad nutricional media), obteniendo como resultado una diferencia estadísticamente significativa la que se ve reflejada en el t ratio = 12,5048 el cual es mayor que el t ratio (5,5975) obtenido con un $\alpha=0,005$, (esto se explica en la sección anexo B. Prueba T de student), es decir, animales alimentado sólo con *E. coli* K12 producen más huevos que animales alimentados con *E. coli* OP50. Lo mismo ocurre para animales alimentados con *E. coli* HT115. Pero en gusanos alimentados con *E. coli* K12 no difieren significativamente con los alimentados con *E. coli* HT115. En cuanto, a los nematodos alimentados con las diferentes bacterias en presencia de glucosa, se produce la mayor cantidad de huevos con la bacteria *E. coli* K12 en comparación a las otras dos. Finalmente, en presencia de d-xilosa, la cantidad de huevos producidos por los nematodos con las diferentes bacterias es similar al control, produciendo mayor cantidad de huevos con *E. coli* K12.

El Gráfico 1 muestra datos similares a la Tabla 1, por lo que se puede observar que al alimentar a *C. elegans* con *E. coli* K12 o *E. coli* HT115, en primer lugar la cantidad de progenie en los controles de estas dos bacterias (120 ± 12 ; 97 ± 8 ; respectivamente) en comparación al control de *E. coli* OP50 son estadísticamente mayores; asimismo, entre los gusanos alimentados con *E. coli* K12 y *E. coli* OP50, ambos suplementados con D-glucosa al 2% (77 ± 5 ; 58 ± 4), existe un aumento considerable estadísticamente; en tercer lugar, la diferencia de la cantidad de progenie proveniente de animales alimentados con *E. coli* K12 y HT115 adicionadas con D-xilosa al 2% (112 ± 8 ; 87 ± 6 , respectivamente), en comparación a los cultivados en *E. coli* OP50 con D-xilosa (66 ± 3), se observa un aumento significativo.

En la Tabla 2, se observa que al alimentar gusanos con *E. coli* OP50 y suplementarla con D-glucosa ó D-xilosa al 2% no se produce una diferencia estadísticamente significativa en comparación al control, $t_* ratio = 2,2079$ y $t_* ratio = 0,8660$, respectivamente. Para ser significativo con un $*\alpha = 0,05$ el t ratio obtenido debe ser mayor a 2,7764. Pero si se produce una diferencia entre ambas condiciones de gusanos alimentados con *E. coli* OP50 suplementado con azúcares, es decir, los animales con dieta mediocre en presencia de d-glucosa depusieron más huevos que los suplementados con D-xilosa. Además, la fecundidad no cambió entre los animales alimentados con una bacteria y la misma suplementada con D-xilosa al 2%.

También, se observa que al alimentar gusanos con *E. coli* K12 y suplementarla con D-glucosa al 2% se produce una diferencia estadísticamente significativa en comparación al control, $t_{\#} ratio = 5,6623$, es decir, se deponen mucho menos huevos en presencia de d-glucosa, no así en presencia de d-xilosa donde la diferencia es casi imperceptible, ya que el suplemento d-xilosa funciona como el control.

Del mismo modo que lo anterior ocurre para los nematodos alimentados con *E. coli* HT115, en presencia de D-glucosa se producen estadísticamente menos huevos que en su ausencia o con d-xilosa.

El fenómeno de las azúcares sobre la fecundidad se puede ver influenciado por el aumento de ROS que es perjudicial para el organismo, ya que al aumentar la glucosa, el receptor de insulina DAF-2 incrementa su actividad, es decir, la unión de las moléculas del tipo insulina a su receptor DAF-2 en la membrana celular activa una serie de enzimas proteínas kinasas, las que finalmente fosforilan a DAF-16 manteniéndolo en el citoplasma, de este modo, se impide la actividad del factor de transcripción DAF-16, a su vez, evitando el incremento de defensas contra el estrés [57].

Por otra parte, en la Tabla 3 se exponen los datos relativos a la cantidad de huevos ex – útero de mutantes *daf-2(ts);mec-4d*, en donde se comparan animales alimentados con bacterias distintas con un mismo suplemento (control, d-glucosa, d-xilosa). Los gusanos alimentados con las diferentes bacterias (sin suplementos) producen cantidades de huevos muy distintas entre sí, lo que provoca que sean estadísticamente distintas. Ocurre algo similar cuando se compara la cantidad de descendientes obtenidos de animales suplementados con d-glucosa alimentados con *E. coli* OP50 que con *E. coli* K12 ó HT115, ya que con *E. coli* OP50 es menor la cantidad obtenida que en los otros dos casos.

En la Tabla 4 se muestra la cantidad de huevos ex útero del mutante *daf-2(ts);mec-4d* cultivado con las diferentes bacterias, el control y con azúcares. También, se observa que la progenie dejada por los gusanos crecidos en *E. coli* OP50 comparando el control con las muestras con azúcares, no varía significativamente. La cantidad de huevos depuestos por gusano en presencia de *E.coli* OP50 o HT115 con o sin d-xilosa es prácticamente igual, es por ello que no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos. Por otro lado, los animales alimentados con *E. coli* K12 suplementados con d-glucosa, producen menos huevos que los gusanos alimentados con la misma bacteria pero sin suplemento o con d-xilosa, en este caso si se produce una diferencia estadísticamente significativa. La cantidad de huevos producidos por un animal alimentado con *E.coli* HT115 casi no varía, independiente si se pone en presencia de azúcares.

Ocurre lo mismo con las otras bacterias. Además, contrastando los controles de los resultados de las diferentes bacterias, tampoco existe una variación específica. En el único resultado que hay una disimilitud es en la cantidad de huevos obtenidos de gusanos alimentados con *E. coli* K12 suplementada con D-glucosa al 2%, en comparación a los resultados obtenido con *E. coli* OP50. Por consiguiente, se aprecia que la cantidad de huevos promedio del mutante *mec-4d* es mucho mayor a la cantidad de progenie del mutante *daf-2(ts);mec-4d*. Esto puede ser ocasionado por el rol que cumple el receptor de membrana *Daf-2*, puesto que al ser silenciado por temperatura, se crean condiciones similares a las de un ambiente no favorable, generando una supresión de vías hormonales provocando un retraso en el desarrollo, el envejecimiento y en la reproducción [117]. Por otro lado, está el efecto de la temperatura en si provoca el envejecimiento prematuro del nematodo, influenciando del mismo modo a la fecundidad.

Tabla 1. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes *mec-4d*. Comparación de una condición (control, d-glucosa, d-xilosa) en animales alimentados con bacterias distintas.

t ratio	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> HT115	<i>E. coli</i> K12 vs <i>E. coli</i> HT115
Control	5,5182	3,6625	2,8263
	*	*	
D-Glucosa	5,1395	2,7607	2,8395
	*		*
D-Xilosa	9,2365	5,4221	4,2652
	#	*	*

Tabla 2. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes *mec-4d*. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.

t ratio	Control vs D-glucosa	Control vs D-xilosa	D-glucosa vs D-xilosa
<i>E. coli</i> OP50	2,2079	0,8660	2,9541
			*
<i>E. coli</i> K12	5,6623	0,9638	6,2487
	#		#
<i>E. coli</i> HT115	6,2499	1,7424	5,0454
	#		*

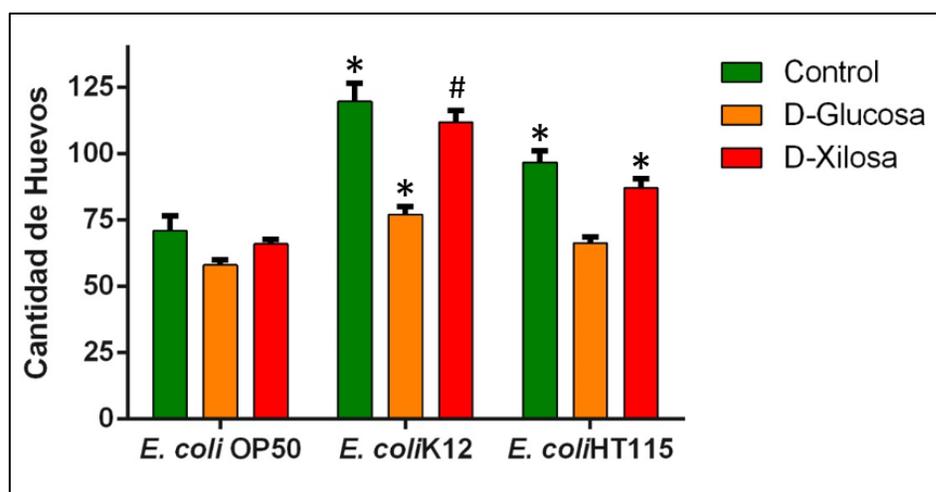


Gráfico 1. Diferentes dietas bacterianas afectan la fecundidad de *C. elegans mec-4d*.

La influencia de las diferentes dietas bacterianas sobre *C. elegans* fueron estudiadas en el mutante *mec-4d* para posteriormente, correlacionar su efecto con la protección neuronal. Estos animales fueron cultivados a 20°C en *E. coli* OP50 hasta tener progenie, luego las larvas L1 fueron traspasadas a platos de Petri con la bacteria correspondiente (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 o *E. coli* HT115, 20°C). Una vez alcanzado L4 fueron traspasados de a un gusano por pocillo (24 pocillos por placa), y a las 24 horas posterior a eso se contabilizaron los huevos in utero y ex utero. La cantidad de huevos ex utero en animales alimentados con *E. coli* K12 y con *E. coli* HT115 son significativamente mayores a los huevos ex uteros de gusanos alimentados con *E. coli* OP50 (Se muestran los valores promedios, las barras de error se indican con SEM, N=3 de 16 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por Prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

Tabla 3. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes daf-2(ts);mec-4d. Comparación de una condición (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.

t ratio	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> HT115	<i>E. coli</i> K12 vs <i>E. coli</i> HT115
Control	12,5048	7,2203	4,2133
	#	#	*
D-Glucosa	5,8480	6,6724	-0,5734
	#	#	
D-Xilosa	10	2,7386	0,8770
	#		

Tabla 4. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes daf-2(ts);mec-4d. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.

t ratio	Control vs D-glucosa	Control vs D-xilosa	D-glucosa vs D-xilosa
<i>E. coli</i> OP50	-0,6708	2,6919	4,1309
			*
<i>E. coli</i> K12	7,3858	4,3079	4,0658
	#	*	*
<i>E. coli</i> HT115	2,0506	0,4099	0,8168

4.2 La tasa de desarrollo

La cantidad y el contenido nutricional de la comida son determinantes importantes en la salud del organismo e influencia los rasgos de vida como la tasa de desarrollo. En respuesta a diferencias en la disponibilidad de nutrientes de diferentes dietas, las redes metabólicas se modulan para satisfacer las necesidades celulares y organizmicas [103].

Para medir el efecto de la dieta en el desarrollo de *C. elegans*, se utilizaron dos mutantes mec-4d y daf-2(ts);mec-4d, y se observó cada 24 horas (24, 48 y 72 horas post-eclosión) los estados larvarios o etapas de vida del nematodo. La mayor diferencia entre los gusanos de una misma muestra fue observada a las 48 horas después de la eclosión, información expuesta en los gráficos que se muestran aquí (Gráfico 2 y Gráfico 3). La clasificación de los gusanos que se hizo fue agrupar en un solo índice (<L4) todos los gusanos en estados larvarios L1, L2 y/o L3, otro índice para los gusanos en el estado larvario L4 (Figura 17), y un tercer índice que agrupe a todos los animales adultos (Figura 18).

En el Gráfico 2 se observa que los gusanos alimentados con *E. coli* OP50 y *E. coli* K12, incluso suplementarla con D-glucosa o D-xilosa al 2%, en las diferentes categorías no presentan diferencias estadísticamente significativa entre ellos. En cambio, los

gusanos alimentados con *E. coli* HT115 en comparación a los alimentados con *E. coli* OP50 si presentan diferencias en los grupos L4 y Adultos, esto quiere decir, que había menor cantidad de gusanos en estado larvario L4 en presencia de *E. coli* HT115 y mayor cantidad de gusanos adultos en comparación a los alimentados con *E. coli* OP50.

La tasa de desarrollo del nematodo es acelerado por el consumo de *E. coli* HT115, esto se debe a que la bacteria es considerada de alta calidad nutricional y atractiva para *C. elegans*, lo que provoca que el nematodo, en presencia de ella, tienda a consumirla con mayor rapidez, es decir, cuantificando el número de bombeos faríngeos por minuto que realiza el gusano cuando come *E. coli* HT115, los cuales son significativamente mayores en comparación a *E. coli* OP50 [25] [32]. Por otro lado, el consumo excesivo (*ad libitum*) de comida, considerada de alta calidad, aumenta la tasa de crecimiento [103], ocurriendo el efecto contrario a cuando se tiene un gusano con restricción calórica, es decir, el gusano tiene largos periodos de ayuno o la alimentación es considerada mediocre [118].

El azúcar D-glucosa (2% en el medio) no influye en el aumento o disminución de la tasa de desarrollo de los animales alimentados con las diferentes bacterias. Esto se puede deber a que la metabolización de la glucosa no influye directamente en las redes metabólicas que inciden en el crecimiento de *C. elegans*.

Por otro parte, comparando los Gráfico 2 y Gráfico 3 la tasa de desarrollo del mutante *daf-2(ts);mec-4d*, es considerablemente mayor en comparación al mutante *mec-4d*. Se observa en el Gráfico 3 que, independiente, de la bacteria en la que fue cultivado *C. elegans*, la tasa de desarrollo es similar, y se debe principalmente al aumento de temperatura de cultivo (25 °C), el cual es un efecto preponderante en comparación a las consecuencias que tiene la mutación *daf-2*, ya que si el efecto de *daf-2* fuera mayor, la tasa de desarrollo sería menor para estos gusanos [117].

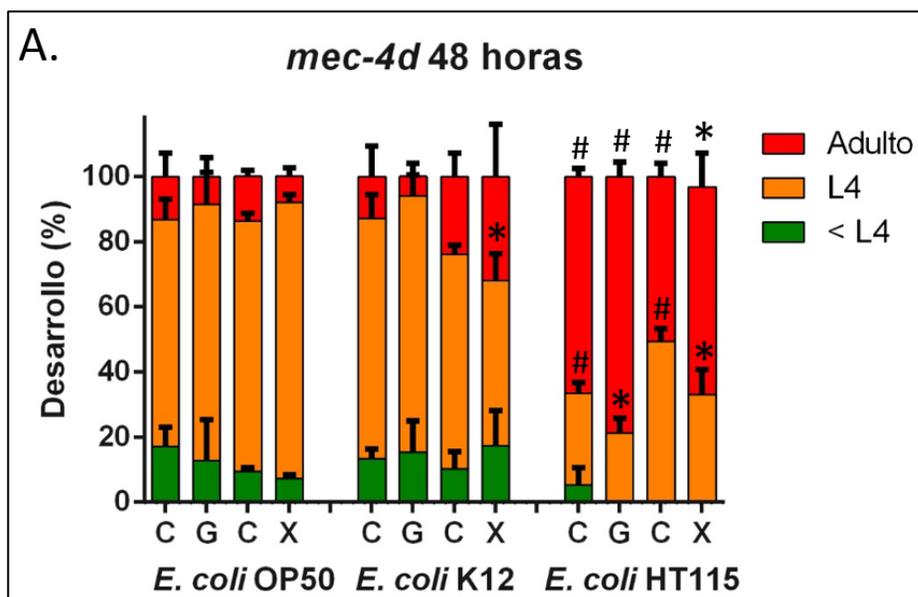


Gráfico 2. El desarrollo de *C. elegans* se ve acelerado con una dieta bacteriana de buena calidad.

La influencia sobre el desarrollo de las diferentes dietas bacterianas con las que se alimentó *C. elegans* fueron estudiadas en el mutante *mec-4d*. Estos animales fueron cultivados a 20°C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos. Se observa que los gusanos cultivados en *E. coli* HT115 alcanzan la adultez con mayor rapidez estadísticamente significativa que los animales alimentados con *E. coli* OP50 o con *E. coli* K12. (Se muestran los valores promedios, las barras de error se indican con SEM; N=3 de 30 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por Prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

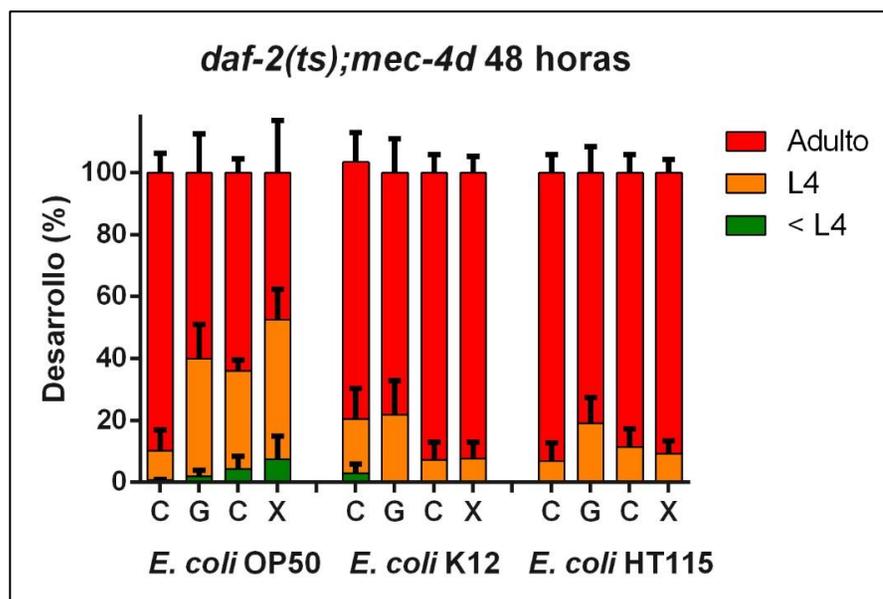


Gráfico 3. Tasa de desarrollo de *C. elegans* en mutantes *daf-2(ts);mec-4d*.

La influencia sobre el desarrollo de las diferentes dietas bacterianas con las que se alimentó *C. elegans* fueron estudiadas en el mutante *daf-2(ts);mec-4d*. Estos animales fueron cultivados a 25°C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa o D-Xilosa) adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos. No se observa diferencias en la tasa de desarrollo estadísticamente significativa entre los animales alimentados con *E. coli* OP50 o con *E. coli* K12 o con *E. coli* HT115. (Se muestran los valores promedios, las barras de error se indican con SEM; N=3 de 30 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por Prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

4.3 Estudio morfológico de la degeneración neuronal gatillada por MEC-4d

C. elegans se usa para estudiar sistemáticamente la degeneración neuronal. Las neuronas receptoras del tacto (TRN's) de *C. elegans* expresan el canal degenerativo MEC-4d constitutivamente abierto, constituye un modelo ideal para la degeneración axonal ya que el estímulo pro-degenerativo es gatillado endógenamente (expresión de *mec-4d*) y su degeneración y protección puede ser evaluada morfológicamente y por pérdida de sensibilidad al tacto. De las seis TRN (ALML, ALMR, PLML, PLMR, AVM y PVM), se investigó la neurona AVM porque surge post-embriónariamente, así el proceso de degeneración puede ser observado desde el principio (Figura 14). Adicionalmente, la AVM por sí misma da una respuesta funcional al toque anterior [39], como cuando las neuronas AVM surgen, las otras neuronas del circuito del tacto anterior, las ALMs ya se han degenerado. Para evaluar la neurona AVM morfológicamente, se usó una cepa que expresa *gfp* bajo un promotor específico de TRN (*Pmec-17mec-17::gfp*) en gusanos silvestres o *mec-4d* (*e1611*). Las neuronas AVM en mutantes *mec-4d*, los axones aparecen y alcanzan tamaños similares a las neuronas AVM del tipo salvaje. Después de eso, los axones y somas AVM siguen una forma estereotipada de degeneración (Figura 15). Primero, axones de largo completo se vuelven con cuentas (beaded) y más tarde se

vuelven truncados desde el extremo más distal. Los somas se vuelven vacuolados y más tarde desaparecen. En este orden de eventos para la degeneración de somas y axones AVM en mutantes *mec-4d* es consistente con previos análisis cualitativos con microscopio electrónico [119].

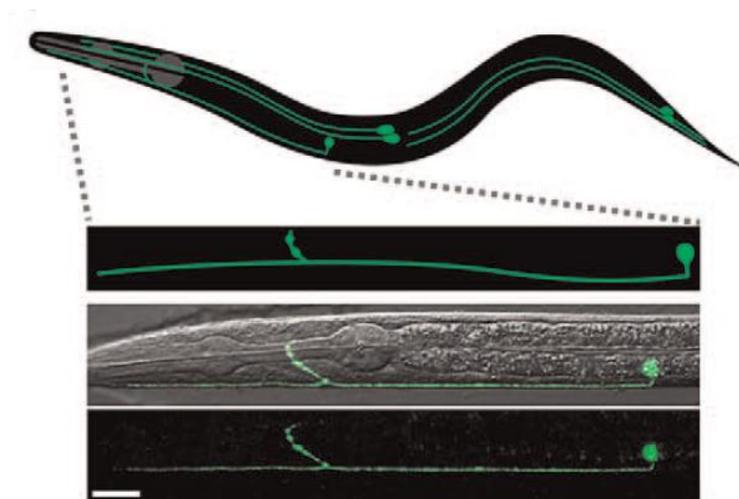


Figura 14. Representación esquemática de las seis neuronas mecanosensoriales de un *C. elegans* adulto.

Con una representación expandida de la neurona AVM (parte anterior del gusano está a la izquierda) y abajo una imagen confocal de la neurona expresando *gfp* bajo un promotor específico de las neuronas del tacto ($P_{mec-17}mec-17::gfp$) en un gusano de tipo salvaje (N2) fusionado con una micrografía óptica Nomarski. Solo la porción anterior es mostrada (Barra de escala, 25 μ m) [51].

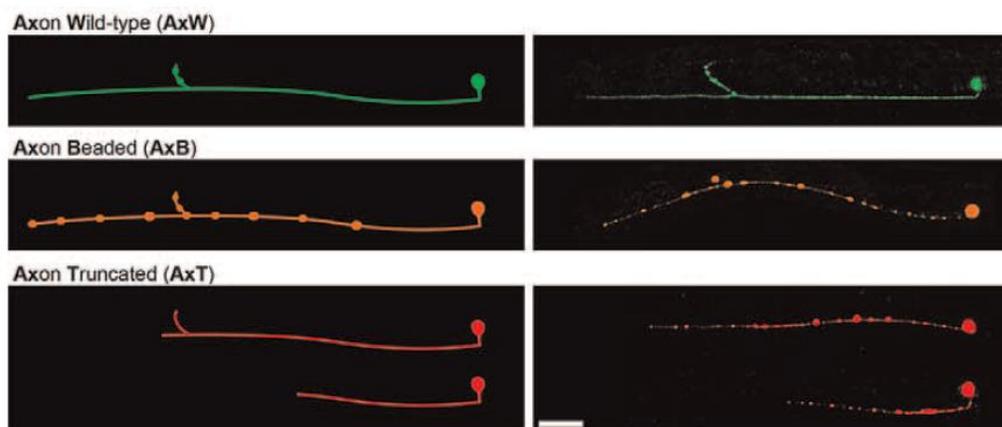


Figura 15. Categorías morfológicas

Categorías morfológicas del axón AVM en una condición de tipo salvaje y durante la progresión de la degeneración desencadenada por la expresión del canal de degenerina MEC-4d. Representaciones esquemáticas de las diferentes categorías morfológicas axonal se muestran en el panel izquierdo, el panel derecho muestra las neuronas como se ve por microscopía confocal. Las neuronas que expresan GFP han sido pseudo coloreadas para que coincida con las categorías morfológicas (Barra de escala, 25 μ m) [51].

En el paper de Calixto et al. se realizó un análisis temporal de la natalidad y la degeneración de los somas y axones de la AVM mediante el uso de la expresión de GFP como reportero. En el gusanos del tipo salvaje, la mayoría de los somas y axones de la neurona AVM aparecen 12 horas después de la eclosión; 24 horas posterior a la eclosión, todos los axones han alcanzado su longitud total. En mutantes *mec-4d*, 72 horas después de la eclosión, los axones se han degenerado casi completamente [51].

Para evaluar intervenciones en mutantes *mec-4d* se contabilizaron las neuronas 72 horas después de la eclosión, cuando las neuronas AVM se han degenerado casi completamente, por lo tanto, un espacio temporal suficiente para observar la protección neuronal inequívoca. Relevancia adicional proviene del hecho de que a las 72 horas después de la eclosión, los gusanos han llegado a la edad adulta y han completado su ciclo de vida [51].

Para examinar si la degeneración neuronal es obstaculizada por la ingesta de dietas bacterianas de diferente calidad, gusanos *mec-4d* fueron alimentados con *E. coli* OP50 de calidad mediocre, *E. coli* K12 de calidad media alta y *E. coli* HT115 de alta calidad. Sorprendentemente, se obtuvo diferentes resultados con las diferentes dietas, en el Gráfico 4 se observa que la dieta mediocre no otorgó protección, la dieta de calidad media alta permitió una protección considerable estadísticamente, y la dieta de alta calidad logró la mayor protección de las tres. Es decir, a las 72 horas después de eclosión de los gusanos mutantes *mec-4d*, los animales alimentados con *E. coli* OP50 presentan un promedio de 8% de axones de tipo salvaje (AxW), los alimentados con *E. coli* K12, 34% de axones del tipo salvaje, y los alimentados con *E. coli* HT115 un 45% de axones del tipo salvaje.

Por otro lado, se estudió este modelo de degeneración utilizando mutantes de *C. elegans* en el receptor de insulina DAF-2 (*daf-2(ts);mec-4d*), con tal de investigar el efecto de ambas mutaciones al mismo tiempo en el organismo. En el Gráfico 5 se observan los resultados de este estudio, ahí se muestra que el efecto de bloquear al receptor de insulina, y por ende, provocar un aumento del factor de transcripción genético DAF-16, protege a las neuronas de la degeneración causada por la apertura constitutiva del canal MEC-4. Esta protección es independiente o no se ve disminuida por calidad nutricional de dieta bacteriana, es decir, la protección neuronal de los gusanos alimentados con *E. coli* OP50 es tan significativa como para los animales cultivados en *E. coli* K12 y *E. coli* HT115 (Alrededor del 80-85% de neuronas wild type).

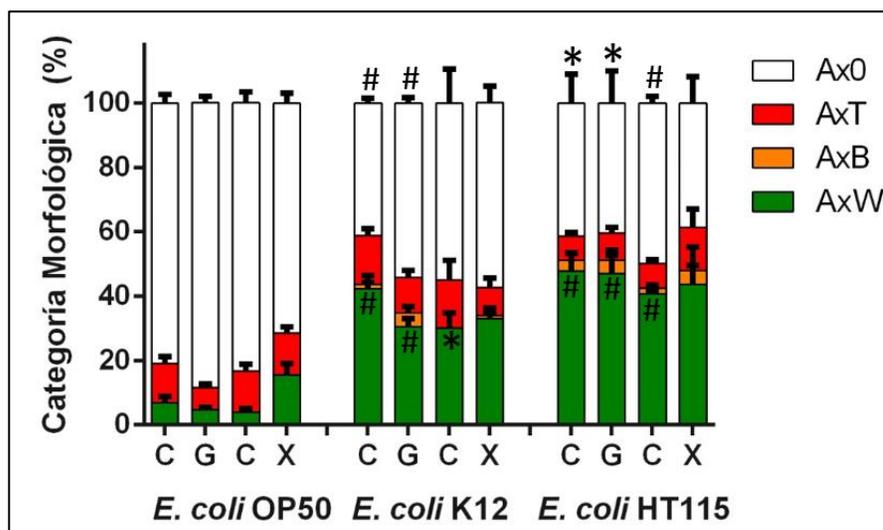


Gráfico 4. La calidad de la dieta bacteriana influye en la prevención de la degeneración neuronal en *C. elegans* desencadenada por *mec-4d*.

Los gusanos *mec-4d* fueron contabilizados por lecturas de morfología. Los axones de la neurona AVM son protegidos de la degeneración neuronal cuando los gusanos fueron alimentados con *E. coli* K12 y *E. coli* HT115, incluso suplementados con glucosa, durante 72 horas después de la eclosión. (Se muestra el valor promedio para cada categoría, las barras de error se indican con SEM; N=30 de 30 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

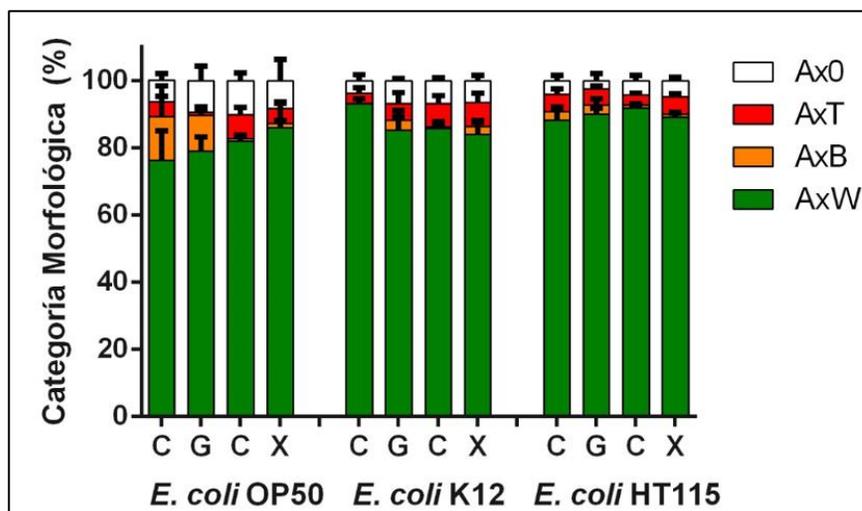


Gráfico 5. La regulación negativa de la vía tipo Insulina/IGF-1 previene la degeneración neuronal gatillada por *mec-4d*.

DAF-2 regula negativamente a DAF-16/FOXO y a SKN-1/Nrf2, los cuales por diferentes mecanismos incrementan la capacidad celular antioxidante. Los axones de la neurona AVM de los gusanos *daf-2(ts);mec-4d* fueron protegidos significativamente independiente de la calidad de dieta bacteriana (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 o *E. coli* HT115) o los azúcares (glucosa o xilosa) con la que fueron alimentados. Estos fueron contabilizados por lecturas de morfología luego de 72 horas después de la eclosión. (Se

muestra el valor promedio para cada categoría, las barras de error se indican con SEM; N=30 de 30 gusanos por cada grupo).

5 Conclusiones

El presente trabajo de título se enmarca dentro de la evaluación efecto *in vivo* de la dieta sobre el desarrollo, la fertilidad y los procesos neurodegenerativos en el nematodo bacterívoro *Caenorhabditis elegans*, para conocer su impacto sobre estos procesos en este organismo.

Para lo anterior, se aprendió a manipular poblaciones de *C. elegans*, lográndose poder diferenciar la morfología de la neurona AVM en un gusano silvestre y en un mutante (véase Figura 14 e Figura 15) y la fisiología del gusano (véase Figura 17 e Figura 18). Además, se estandarizaron los protocolos para llevar a cabo los diferentes experimentos descritos en la sección 3.2 (métodos)

En cuanto a los experimentos mismos, la utilización del azúcar D-xilosa tenía como propósito ser el control de la D-glucosa. Debido a no presentar diferencias estadísticamente significativas entre los experimentos control (sin azúcares) y los experimentos con la pentosa, la D-xilosa cumplió su rol adecuadamente.

El nematodo resulta útil para estudiar el desarrollo, ya que comparando las diferentes dietas entre el gusano silvestre, el mutante *mec-4d* y el mutante *daf-2(ts);mec-4d*, se observa una aceleración significativa en el crecimiento de *C. elegans mec-4d* al ser alimentado con *E. coli* HT115 en comparación a los alimentados con *E. coli* OP50 o K12. La diferencia observada entre mutantes se debe principalmente al aumento de temperatura de cultivo entre ellos, ya que a mayor temperatura todas las células del nematodo aceleran su proceso de división y diferenciación, por tanto, de crecimiento (Figura 15 y Tabla 20. Temperatura de crecimiento.) [120], alcanzando en menor tiempo la adultez. Por tanto, para un gusano mutante *daf-2(ts);mec-4d* la dieta bacteriana no influye significativamente sobre su desarrollo.

Por otro lado, la fecundidad de *C. elegans mec-4d* se ve alterada por varios factores. Primero, mientras mayor sea la calidad nutricional de la dieta bacteriana, mayor es el número de progenie que deja *C. elegans mec-4d*, aunque se pudo observar que a pesar de que *E. coli* HT115 supone ser de mayor calidad nutricional que *E. coli* K12, el aumento de progenie no es significativo al ser alimentado con la primera bacteria, esto se puede deber a que algún compuesto de *E. coli* K12 permite o desencadena algún factor que favorece la fecundidad. Segundo, al suplementar la dieta bacteriana con D-glucosa, disminuye significativamente los resultados en el caso de las bacterias *E. coli* HT115 y K12. Tercero, para los mutantes *daf-2* el número de progenie es significativamente menor al de *mec-4d*, lo que puede ser ocasionado por el silenciamiento del receptor de membrana *Daf-2*, ya que se crean condiciones similares a las de un ambiente no favorable, generando una supresión de vías hormonales provocando un retraso en el desarrollo, el envejecimiento y en la reproducción [117]. Por otro lado, está el efecto de la temperatura en si provoca el envejecimiento prematuro del nematodo, influenciando del mismo modo a la fecundidad. Cuarto, en ambos mutantes, *mec-4d* y *daf-2(ts);mec-4d*, cuando son alimentados con *E. coli* K12 producen mayor cantidad de huevos que cuando se alimentan con las otras dos bacterias.

En cuanto a neurodegeneración se concluye que los distintos tipos de dieta bacteriana son capaces de inducir neuroprotección en el modelo neurodegenerativo de

mec-4d. Además, se aprecia que *E. coli* HT115 genera los más altos niveles de neuroprotección en comparación a las otras dietas (*E. coli* OP50 y *E. coli* K12). Asimismo, la regulación negativa de DAF-2 retrasa la degeneración significativamente en el mutante *daf-2(ts);mec-4d*, y promueve la sobrevivencia de las neuronas AVM post-embriónicas.

Al cabo de la investigación es posible constatar que existen agentes, químicos, biológicos y genéticos que afectan a la fisiología y neuroprotección de *C. elegans*, tanto en forma positiva como negativamente. Utilizando esta información en conjuntos con estudios futuros sobre estos temas, será posible extrapolar estos datos a mamíferos y quizás a humanos, logrando entender el por qué de muchas enfermedades que hoy afectan a la población.

6 Recomendaciones para el trabajo futuro

Para el futuro entendimiento de qué compuestos provocan que las dietas tengan diferente calidad nutricional, puede ser útil realizar estudios genómicos y/o transcriptómicos con ayuda de herramientas bioinformáticas, para conocer el contenido de cada bacteria y las diferencias entre ellas.

En cuanto a los efectos gatillados en los rasgos de vida de *C. elegans*, sería conveniente realizar estudios genéticos al gusano, ya que como el genoma del gusano ha sido secuenciado completamente, es razonablemente sencillo mutar sus genes y estudiar sus efectos, y la expresión de sus genes puede ser fácilmente manipulado usando métodos de ARN de interferencia (RNAi) – una técnica para anular la etapa intermedia en la cascada “DNA a RNA mensajero a proteína” que constituye la expresión del gen. Además, se pueden hacer estudios de seguimientos de las vías metabólicas de *C. elegans* que se ven alteradas o inhibidas por los compuesto de las distintas bacterias que componen su dieta. Por otro lado, parece útil emplear otros mutantes en conjunto con el modelo de neurodegeneración u observa por periodos más prolongados los experimentos realizados aquí, y así poder relacionar esta información directamente con la duración de la vida (lifespan), tema muy estudiado hoy en día en la comunidad del nematodo.

Glosario

μL = microlitro.

ADN = Ácido desoxiribonucleico.

ALML = Microtúbulo Lateral Anterior Izquierdo.

ALMR = Microtúbulo Lateral Anterior Derecho.

ARNi = Ácido Ribonucleico de Interferencia.

ASI ;ASJ = Neuronas del tipo *Amphid*, final ciliado individual. (*Amphid*: Uno de un par de órganos de los sentidos quimiosensoriales colocado lateralmente en la cabeza del nematodo).

ATP = Adenosin trifosfato.

AVM = Microtúbulo Ventral Anterior.

AxO = Axón Ausente.

AxB = Axón con cuentas (Beaded).

AxT = Axón truncado.

AxW = Axón del tipo Salvaje (Wild Type).

CGC = Caenorhabditis Genetics Center.

CO₂ = Dióxido de Carbono.

DAF-16/FOXO = DAF-16 es el único ortólogo de la familia de factores de transcripción FOXO (forkhead) en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

DAF-2 = El gen *daf-2* codifica para el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (DAF-2/IGF-1) en el gusano *Caenorhabditis elegans*. La señalización de esta proteína se ha conservado de gusanos a humanos. El DAF-2 actúa negativamente en la regulación de DAF-16 a través de una cascada de fosforilación.

Dauer = (del Alemán "resistencia", "duración" o "permanente") describe una etapa de desarrollo alternativo de los gusanos nematodos, particularmente *Caenorhabditis elegans*, mediante el cual la larva entra en una especie de éxtasis y puede sobrevivir en condiciones adversas.

ENaC = Canales de sodio epiteliales.

ER = Retículo Endoplasmático.

FGT-1 = Proteínas facilitadoras del transporte de glucosa (isoforma 1) en *C. elegans*, del tipo GLUT2 de mamíferos.

FRAP = Recuperación de fluorescencia después photobleaching (destrucción de una fluorescencia fotoquímica por la luz de alta intensidad).

GLUT = Proteínas facilitadoras del transporte de glucosa en mamíferos.

LB = Caldo de Lisogenia (Lysogeny Broth).

Mb = Mega base.

mec-4(d) = Mutación en los genes degenerina *mec-4* con ganancia de función que causa la degeneración de las células del tacto en *C. elegans*.

MEC = Proteína Mecanotransductora mediadas por canales DEG/ENaC.

mL = mililitros.

mm = milímetros.

NGM = Medio para crecimiento de Nematodos.

NMNAT = Adeniltransferasa mononucleótido de nicotinamida.

OCD = Trastorno Obsesivo Compulsivo.

PLML = Microtúbulo Lateral Posterior Izquierdo.

PLMR = Microtúbulo Lateral Posterior Derecho.

PVM = Microtúbulo Ventral Posterior.

REDOX = Óxido Reducción.

rpm = revoluciones por minuto.

SGLT = Proteína de Transporte Sodio-Glucosa (Sodium-Glucose Linked Transporter).

SOD = Superóxido Dismutasa.

TCA = Ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs.

TOR = Blanco de la Rapamicina (Target of Rapamycin)

TRN = Neuronas Receptoras del Tacto.

Bibliografía

- [1] T. C. E. E. 6. ed., «Infoplease Human Nutrition,» Columbia University Press, 2012. [En línea]. Available: <http://www.infoplease.com/encyclopedia/science/nutrition-human-nutrition.html>. [Último acceso: 9 Septiembre 2015].
- [2] W. H. Organization, «Essential Nutrition Actions: improving maternal, newborn, infant and young child health and nutrition,» WHO Press, Washington, DC, 2013.
- [3] I. DARNTON-HILL, C. NISHIDA y W. JAMES, «A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic disease,» *Public Health Nutrition*, vol. 7, nº 1A, pp. 101-121, 2004.
- [4] A. C. ROSS, B. CABALLERO, R. J. COUSINS, K. L. TUCKER y T. R. ZIEGLER, *Modern Nutrition in Health and Disease*, 11th ed., Baltimore, MD: Lippincot, Williams & Wilkins, 2012, p. 1648.
- [5] C. d. Prensa, «Organización Mundial de la Salud,» Nota descriptiva Nro 311, 5 01 2015. [En línea]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. [Último acceso: 30 09 2015].
- [6] W. WOOD, «The nematode *Caenorhabditis elegans*,» *New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988.
- [7] L. GUARANTE y C. KENYON, «Genetics pathways that regulates ageing in model organisms,» *Nature*, vol. 408, pp. 255-262, 2000.
- [8] S. BRENNER, «The Genetics of *Caenorhabditis elegans*,» *Genetics*, vol. 77, nº 1, pp. 71-94, 1 May 1974.
- [9] I. HOPE, «En *C. elegans*. A Practical Approach. Ed Ian A. Hope,» *School of Biology University of Leeds Oxford*, 1999.
- [10] D. RIDDLE, T. Blumenthal, B. Meyer y e. al., *C. elegans II*, 2da ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997, p. 1222.
- [11] J. LEWIS y J. FLEMING, «Basic Culture Methods,» *Methods Cell Biology*, vol. 48, pp. 3-29, 1995.
- [12] R. HERMAN, «Introduction to sex determination,» de *WormBook*, The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2005.
- [13] L. AVERY y Y. YOU, «WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology,» Pasadena (CA), 2005. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116080/>. [Último acceso: 2014].

- [14] J. MCGHEE, «WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology,» Pasadena (CA), 3 May 2007. [En línea]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19717/>. [Último acceso: 2014].
- [15] WormAtlas, «HandBook Hermaphrodite - Muscle System,» [En línea]. Available: <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/muscleintro/MusIntroframeset.html>. [Último acceso: Noviembre 2014].
- [16] D. GEMS y D. RIDDLE, «Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*,» *Journal of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, vol. 55, nº 5, pp. B215-9, Mayo 2000.
- [17] D. GEMS, «in Longevity and aging in parasitic and free-living nematodes,» *Biogerontology*, vol. 1, nº 4, pp. 289-307, 2000.
- [18] M. R. KLASS, «Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span,» *Mechanisms of Aging and Development*, vol. 6, pp. 413-429, 1997.
- [19] D. DONALD, «*C. elegans* II,» *New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997.
- [20] P. HU, «Dauer*,» de *WormBook*, Ed. *The C. elegans Research Community*, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.144.1, <http://www.wormbook.org>, August. 08, 2007.
- [21] WormAtlas, «Handbook Anatomy - WormAtlas,» 2012. [En línea]. Available: <http://www.wormatlas.org/>. [Último acceso: 29 Agosto 2015].
- [22] J. SULSTON, E. SCHIERNBERG, J. WHITE y J. THOMSON, «The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*,» *Developmental Biology*, vol. 100, pp. 64-119, 1983.
- [23] C. DONCASTER, «Nematode feeding mechanisms. I. Observations on *Rhabditis* and *Pelodera*,» *Nematologica*, vol. 8, pp. 313-320, 1962.
- [24] M. SEYMOUR, K. WRIGHT y C. DONCASTER, «The action of the anterior feeding apparatus of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditida),» *Journal of Zoological Society of London*, vol. 201, pp. 527-539, 1983.
- [25] L. AVERY y Y. YOU, «*C. elegans* Feeding,» de *Wormbook*, *The C. elegans Research Community*, May 21, 2012, pp. 1-23.
- [26] D. ALBERTSON y J. N. THOMSON, «The pharynx of *Caenorhabditis elegans*,» *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 275, pp. 299-325, 1976.
- [27] L. AVERY y H. R. HORVITZ, «A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant,» *Cell*, vol. 51, pp. 1071-1078, 1987.

- [28] D. M. RAIZEN y L. AVERY, «Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*,» *Neuron*, vol. 12, pp. 483-495, 1994.
- [29] D. RAIZEN, R. LEE y L. AVERY, «Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*,» *Genetics*, vol. 141, pp. 1365-1382, 1995.
- [30] L. AVERY, «Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in *Caenorhabditis elegans*,» *Journal of Experimental Biology*, vol. 175, pp. 283-297, 1993.
- [31] B. B. SHTONDA y L. AVERY, «Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*,» *Journal of Experimental Biology*, vol. 209, pp. 89-102, 2006.
- [32] L. AVERY y B. SHTONDA, «Food Transport in the *C. elegans* pharynx.,» *The Journal of Experimental Biology*, vol. 206, pp. 2441-2457, 2003.
- [33] Y. YOU, J. KIM, D. RAIZEN y L. AVERY, «Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in *C. elegans*: a model for satiety,» *Cell Metabolism*, vol. 7, pp. 249-257, 2008.
- [34] K. KEMPHUES, «Essential Genes,» de *Wormbook*, The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 2005.
- [35] J. VAN RAAMSDONK y S. HEKIMI, «Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Casual or Casual Relationship?,» *Antioxid Redox Signal*, vol. 13, nº 12, pp. 1911-1953, 15 December 2010.
- [36] I. VASTRIK, P. D'EUSTACHIO, E. SCHMIDT y et. al., «Reactome: a knowledge base of biology pathways and processes,» *Genome Biology*, vol. 8, p. R39, 2007.
- [37] M. CHALFIE, J. SULSTON, J. WHITE, E. SOUTHGATE, J. THOMSON y S. BRENNER, «The Neural Circuit for Touch Sensitivity in *Caenorhabditis elegans*,» *The Journal of Neuroscience*, vol. 5, nº 1, pp. 956-964, 1985.
- [38] S. MAGUIRE, C. CLARK, J. NUNNARI, J. PIRRI y M. ALKEMA, «The *C. elegans* touch response facilitates escape from predacious fungi,» *Current Biology*, vol. 21, nº 15, pp. 1326-1330, 2011.
- [39] M. CHALFIE y J. SULSTON, «Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*,» *Developmental Biology*, vol. 82, nº 2, pp. 358-370, 1981.
- [40] M. CHALFIE y M. AU, «Genetic control do differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons,» *Science*, vol. 243, nº 4894 Pt 1, pp. 1027-1033, 1989.
- [41] L. EMTAGE, G. GU, E. HARTWAIEG y M. CHALFIE, «Extracellular proteins organize the mechanosensory channel complex in *C. elegans* touch receptor neurons,» *Neuron*, vol. 44, nº 5, pp. 795-807, 2004.

- [42] R. O'HAGAN, M. CHALFIE y M. GOODMAN, «The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals,» *Nature Neuroscience*, vol. 8, nº 1, pp. 43-50, 2005.
- [43] D. CHELUR, G. ERNSTROM, M. GOODMAN, C. YAO, L. CHEN, R. O'HAGAN y M. CHALFIE, «The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel,» *Nature*, vol. 420, nº 6916, pp. 669-673, 2002.
- [44] M. GOODMAN, G. ENRSTROM, D. CHELUR, R. O'HAGAN, C. ANDREA YAO y M. CHALFIE, «MEC-2 regulates *C. elegans* DEG/ENaC channels needed for mechanosensation,» *Nature*, vol. 415, pp. 1039-1042, 2002.
- [45] T. FUKUSHIGE, M. HENDZEL, D. BAZETT-JONES y J. MCGHEE, «Direct visualization of the *elt-2* gut-specific GATA factor binding to a target promoter inside the living *Caenorhabditis elegans*,» *Developmental Biology*, vol. 96, nº 21, pp. 11883-11888, 1999.
- [46] K. HONG y M. DRISCOLL, «A transmembrane domain of the putative channel subunit MEC-4 influences mechanotransduction and neurodegeneration in *C. elegans*,» *Nature*, vol. 367, pp. 470-473, 1994.
- [47] J. JASTI, H. FURUKAWA, E. GONZALES y E. GOUAUX, «Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH,» *Nature*, vol. 449, nº 7160, pp. 316-323, 2007.
- [48] T. FUKUSHIGE, Z. SIDDIQUI, M. CHOU, J. CULOTTI, C. GOGONEA, S. SIDDIQUI y M. HAMELIN, «MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*,» *Journal of Cell Science*, vol. 112, pp. 395-403, 1999.
- [49] M. DRISCOLL y M. CHALFIE, «The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration,» *Nature*, vol. 349, nº 6310, pp. 588-593, 1991.
- [50] L. BIANCHI, B. GERSTBREIN, C. FROKJAER-JENSEN, D. ROYAL, G. MUKHERJEE, M. ROYAL, J. XUE, W. SCHAFER y M. DRISCOLL, «The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation,» *Nature Neuroscience*, vol. 7, pp. 1337-1344, 2004.
- [51] A. CALIXTO, J. JARA y F. COURT, «Diapause Formation and Downregulation of Insulin-Like Signaling via DAF-16/FOXO Delays Axonal Degeneration and Neuronal Loss,» *PLOS Genetics*, vol. 8, nº 12, pp. 1-15, 2012.
- [52] K. KIMURA, H. TISSENBAUM, Y. LIU y G. RUVKUN, «*daf-2*, an insuline receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*,» *Science*, vol. 277, nº 5328, pp. 942-946, 1997.
- [53] D. GEMS, A. SUTTON, M. SUNDERMEYER, P. ALBERT, K. KING, M. EDGLEY, P. LARSEN y D. RIDDLE,

- «Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*,» *GENETICS*, vol. 150, pp. 129-155, 1998.
- [54] E. GREER, P. OSKOUI, M. BANKO, J. MANIAR, M. GYGI, S. GYGI y A. BRUNET, «The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor,» *Journal Biological Chemistry*, vol. 282, nº 41, pp. 30107-30119, 2007.
- [55] S. PARIDIS y G. RUVKUN, «*Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insuline receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor,» *Genes & Development*, vol. 12, nº 16, pp. 2488-2498, 1998.
- [56] E. WATSON, L. MACNEIL, A. RITTER, L. YILMAZ, A. ROSEBROCK, A. CAUDY y A. WALHOUT, «Interspecies Systems Biology Uncovers Metabolites Affecting *C. elegans* Gene Expression and Life History Traits,» *Cell*, vol. 156, nº 4, pp. 759-770, 2014.
- [57] S. NEMOTO y T. FINKEL, «Ageing and the mystery at Arles,» *Nature*, vol. 429, pp. 149-152, 2004.
- [58] G. BERNSTEIN, «Heathline: Why We Need Glucose (A biological History),» 31 01 2012. [En línea]. Available: <http://www.healthline.com/health-blogs/diabetes-still-isnt-easy/why-we-need-glucose>. [Último acceso: 15 08 2015].
- [59] H. BUNN y P. HIGGINS, «Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance,» *Science*, vol. 213, pp. 222-224, 1981.
- [60] G. GOULD y G. HOLMAN, «The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression,» *Biochemical Journal*, vol. 295, pp. 329-341, 1993.
- [61] A. VARKI, R. CUMMINGS, J. ESKO, H. FREEZE, P. STANLEY, C. BERTOZZI, G. HART y M. ETZLER, *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratories Press, 2009.
- [62] S. FAIRCLOUGH y K. HOUSTON, «A metabolic measure of mental effort,» *Biological Psychology*, vol. 66, nº 2, pp. 177-190, 2004.
- [63] M. GAILLIOT y R. BAUMEISTER, «The Physiology of Willpower: Linking Blood Glucose to Self-Control,» *Personality and Social Psychology Review*, vol. 11, nº 4, pp. 303-327, 2007.
- [64] A. SCHEEPERS, H. JOOST y A. SCHÜRMANN, «The Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function,» *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, vol. 28, nº 5, pp. 364-371, 2004.
- [65] F. ZHAO y A. KEATING, «Functional properties and genomics of glucose transporters,» *Current Genomics*, vol. 8, pp. 113-128, 2007.

- [66] S. KITAOKA, A. MORIELLI y F. ZHAO, «FGT-1 is a Mammalian GLUT-2-Like Facilitative Glucose Transporter in *Caenorhabditis elegans* Whose Malfunction Induces Fat Accumulation in Intestinal Cells,» *PLOS one*, vol. 8, nº 6, pp. 1-13(e68475), 2013.
- [67] T. Weicker, *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 11th ed., New York, USA: United States pharmaceutical company Merck & Co, 1989, p. 9995.
- [68] T. SERNKA y E. JACOBSON, *Fundamentos de fisiología gastrointestinal*, 1ra ed., Barcelona, España: Reverté S.A., 1981, p. 160.
- [69] A. LEHNINGER y D. NELSON, *Principios de Bioquímica*, 2º ed., Barcelona: Omega, 1995.
- [70] D. DUGDALE, «Medline Plus Información de salud para usted,» *Enciclopedia Médica*, 29 02 2012. [En línea]. Available: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003606.htm>. [Último acceso: 03 09 2015].
- [71] U. o. C. S. Francisco, «UCSF Profiles: search, discover, network,» [En línea]. Available: <http://profiles.ucsf.edu/cynthia.kenyon#toc-id6>. [Último acceso: 12 Enero 2016].
- [72] C. MURPHY, S. MCCARROLL, C. BARGMANN, A. FRASER, R. KAMATH, J. AHRINGER, H. LI y C. KENYON, «Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*,» *Nature*, vol. 424, nº 6946, pp. 277-283, 2003.
- [73] C. KENYON, «The Plasticity of Aging: Insights from Long-Lived Mutants,» *Cell*, vol. 120, nº 4, pp. 449-460, 2005.
- [74] C. KENYON, J. CHANG, E. GENSCHE, A. RUDNER y R. TABTIANG, «A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type,» *Nature*, vol. 366, nº 6454, pp. 461-464, 1993.
- [75] K. LIN, J. B. DORMAN, A. RODAN y C. KENYON, «daf-16: An HNF-3/forkhead Family Member That Can Function to Double the Life-Span of *Caenorhabditis elegans*,» *Science*, vol. 278, nº 5341, pp. 1319-1322, 1997.
- [76] K. LIN, H. HSIN, N. LIBINA y C. KENYON, «Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling,» *Nature Genetics*, vol. 28, pp. 139-145, 2001.
- [77] A. DILLIN, D. CRAWFORD y C. KENYON, «Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *C. elegans*,» *Science*, vol. 298, nº 5594, pp. 830-834, 2002.
- [78] J. APFELD y C. KENYON, «Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and lifespan,» *Cell*, vol. 95, nº 2, pp. 199-210, 1998.
- [79] N. LIBINA, J. BERMAN y C. KENYON, «Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan,» *Cell*, vol. 115, nº 4, pp. 489-502, 2003.

- [80] C. MURPHY, S.-L. LEE y C. KENYON, «Tissue entrainment by feedback regulation of insulin gene expression in the endoderm of *Caenorhabditis elegans*,» *PNAS*, vol. 104, nº 48, pp. 19046-19050, 2007.
- [81] D. GARIGAN, A. HSU, A. FRASER, R. KAMATH, J. AHRINGER y C. KENYON, «Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation,» *Genetics*, vol. 161, nº 3, pp. 1101-1112, 2002.
- [82] A. HSU, C. MURPHY y C. KENYON, «Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor,» *Science*, vol. 300, nº 5622, pp. 1142-1145, 2003.
- [83] S. HENIS-KORENBLIT, P. ZHANG, M. HANSEN, M. MCCORMICK, S.-J. LEE, M. CARY y C. KENYON, «Insuline/IGF-1 signalig mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity,» *PNAS*, vol. 107, nº 21, pp. 9730-9735, 2010.
- [84] J. APFELD y C. KENYON, «Regulation of lifespan by sensory perception in *Caenorhabditis elegans*,» *Nature*, vol. 402, nº 6763, pp. 804-809, 1999.
- [85] J. ALCEDO y C. KENYON, «Regulation of *C. elegans* longevity by specific gustatory and olfactory neurons,» *Neuron*, vol. 41, nº 1, pp. 45-55, 2004.
- [86] H. HSIN y C. KENYON, «Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*,» *Nature*, vol. 399, nº 6734, pp. 362-366, 1999.
- [87] N. ARANTES-OLIVEIRA, J. APFELD, A. DILLIN y C. KENYON, «Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*,» *Science*, vol. 295, nº 5554, pp. 502-505, 2002.
- [88] J. B. MASON, S. L. CARGILL, S. M. GRIFFEY, J. R. READER, G. B. ANDERSON y J. R. CAREY, «Transplantation of Young Ovaries Restored Cardioprotective Influence in Postreproductive-Aged Mice,» *Aging Cell*, vol. 10, nº 3, pp. 448-456, 2011.
- [89] J. BERMAN y C. KENYON, «Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by *kri-1* and lipophilic-hormone signaling,» *Cell*, vol. 124, nº 5, pp. 1055-1068, 2006.
- [90] A. GHAZI, S. HENIS-KORENBLIT y C. KENYON, «A Transcription Elongation Factor That Links Signals from the Reproductive System to Lifespan Extension in *Caenorhabditis elegans*,» *PLoS Genetics*, vol. 5, nº 9, p. e1000639, 2009.
- [91] T. M. YAMAWAKI, R. J. BERMAN, M. SUCHANEK-KAVIPURAPU, M. MCCORMICK, M. M. GAGLIA, S.-L. LEE y C. KENYON, «The Somatic Reproductive Tissue of *C. elegans* Promote Longevity through Steroid Hormone Signaling,» *PLoS Biology*, vol. 8, nº 8, p. e1000468, 2010.
- [92] A. DILLIN, A.-L. HSU, N. ARANTES-OLIVEIRA, J. LEHRER-GRAIWER, H. HSIN, A. G. FRASER, R. S. KAMATH, J. AHRINGER y C. KENYON, «Rates of Behavior and Aging Specified by Mitochondrial

Function During Development,» *Science*, vol. 298, nº 5602, pp. 2398-2401, 2002.

- [93] S.-J. LEE, A. HWANG y C. KENYON, «Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity,» *Current Biology*, vol. 20, nº 23, pp. 2131-2136, 2010.
- [94] M. HANSEN, S. TAUBERT, D. CRAWFORD, N. LIBINA, S. LEE y C. KENYON, «Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*,» *Aging Cell*, vol. 6, nº 1, pp. 95-110, 2007.
- [95] M. HANSEN, A. CHANDRA, L. MITIC, B. ONKEN, M. DRISCOLL y C. KENYON, «A Role for Autophagy in the Extension of Lifespan by Dietary Restriction in *C. elegans*,» *PLoS Genetics*, vol. 4, nº 2, p. e24, 2008.
- [96] J. PINKSTON, D. GARIGAN, M. HANSEN y C. KENYON, «Mutations That Increase the Life Span of *C. elegans* Inhibit Tumor Growth,» *Science*, vol. 313, nº 5789, pp. 971-975, 2006.
- [97] S. LEE, C. MURPHY y C. KENYON, «Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression,» *Cell Metabolism*, vol. 10, nº 5, pp. 379-391, 2009.
- [98] A. W. KAO, R. J. EISENHUT, L. H. MARTENS, A. NAKAMURA, A. HUANG, J. A. BAGLEY, P. ZHOU, A. DE LUIS, L. J. NEUKOMM, J. CABELLO, R. V. FARESE y C. KENYON, «A neurodegenerative disease mutation that accelerates the clearance of apoptotic cells,» *PNAS*, vol. 108, nº 11, pp. 4441-4446, 2011.
- [99] D. DAVID, N. OLLIKAINEN, J. TRINIDAD, M. CARY, A. BURLINGAME y C. KENYON, «Widespread Protein Aggregation as an Inherent Part of Aging in *C. elegans*,» *PLoS Biology*, vol. 8, nº 8, p. e1000450, 2010.
- [100] E. M. TANK, K. E. RODGERS y C. KENYON, «Spontaneous Age-Related Neurite Branching in *Caenorhabditis elegans*,» *The Journal of Neuroscience*, vol. 31, nº 25, pp. 9279-9288, 2011.
- [101] A. MUKHOPADHYAY, B. DEPLANCKE, A. J. WALHOUT y H. A. TISSENBAUM, «*C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms,» *Cell Metabolism*, vol. 2, nº 1, pp. 35-42, 2005.
- [102] Y. WANG, S. WOOK OH, B. DEPLANCKE, J. LUO, A. J. WALHOUT y H. TISSENBAUM, «*C. elegans* 14-3-3 proteins regulate life span and interact with SIR-2.1 and DAF-16/FOXO,» *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 127, nº 9, pp. 741-747, 2006.
- [103] L. MACNEIL, E. WATSON, H. ARDA, L. ZHU y A. J. WALHOUT, «Diet-Induced Developmental Acceleration Independent of TOR and Insulin in *C. elegans*,» *Cell*, vol. 153, nº 1, pp. 240-252, 2013.
- [104] E. WATSON, L. T. MACNEIL, H. E. ARDA, L. J. ZHU y A. J. WALHOUT, «Integration of Metabolic and Gene Regulatory Networks Modulates the *C. elegans* Dietary Response,» *Cell*, vol. 153, nº 1, pp.

253-266, 2013.

- [105] L. MACNEIL y A. WALHOUT, «Food, pathogen, signal: The multifaceted nature of bacterial diet,» *Worm*, vol. 2, nº 4, p. e26454, 2013.
- [106] A. SOUKAS, E. KANE, C. CARR, J. MELO y G. RUVKUN, «Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*,» *Genes Development*, vol. 23, pp. 496-511, 2009.
- [107] J. COOLON, K. JONES, T. TODD, B. CARR y M. HERMAN, «*Caenorhabditis elegans* genomic response to soil bacteria predicts environment-specific genetic effects on life history traits,» *PLoS Genetics*, vol. 5, p. e1000503, 2009.
- [108] S. REINKE, X. HU, B. SYKES y B. LEMIRE, «*Caenorhabditis elegans* diet significantly affects metabolic profile, mitochondrial DNA levels, lifespan and brood size,» *Molecular Genetics Metabolism*, vol. 100, pp. 274-282, 2010.
- [109] K. BROOKS, B. LIANG y J. WATTS, «The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans*,» *PLoS One*, vol. 4, p. e7545, 2009.
- [110] J. TENOR, B. MCCORMICK, F. AUSUBEL y A. ABALLAY, «*Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions,» *Current Biology*, vol. 14, pp. 1018-1024, 2004.
- [111] M. CANEO, M. ALKEMA y A. CALIXTO, «Molecular requirements of axonal regeneration in diapause.,» de *No publicado.*, Universidad Mayor y University of Massachusetts Medical School, EN: International *C. elegans* Meeting, 24-28 Junio (2015, UCLA, USA)..
- [112] A. FUENTES, V. GARCÍA y A. CALIXTO, «Diet affects neurodegenerative processes genetically induced in *C. elegans*,» de *No publicado.*, Universidad Mayor y Centro de Genómica y Bioinformática, EN: 20th International *C. elegans* Meeting 24-28 Junio (2015, UCLA, USA).
- [113] D. YAN, Z. WU, A. CHISHOLM y Y. JIN, «The DLK-1 kinase promotes mRNA stability and local translation in *C. elegans* synapses and axon regeneration,» *Cell*, vol. 138, nº 5, pp. 1005-1018, 2009.
- [114] M. HAMMARLUND, E. JORGENSEN y M. BASTIANI, «Axons break in animals lacking beta-spectrin,» *Journal Cellular Biology*, vol. 176, nº 3, pp. 269-275, 2007.
- [115] L. BIANCHI y B. GERSTBREIN, «The neurotoxic MEC-4(d) DEG/ENaC sodium channel conducts calcium: implications for necrosis initiation,» *Nature*, vol. 180, nº 1, pp. 15-16, 2004.
- [116] C. KENYON, «The nematode *Caenorhabditis elegans*,» *Science*, vol. 240, pp. 1448-1452, 1988.

- [117] A. ANTEBI, «Nuclear hormone receptors in *C. elegans*,» de *WormBook*, I. Greenwald, Ed., ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2006.
- [118] B. LAKOWSKI y S. HEKIMI, «The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*,» *PNAS Genetics*, vol. 95, pp. 13091-13096, 1998.
- [119] D. HALL, G. GU, J. GARCIA-ANOVEROS, L. GONG, M. CHALFIE y M. DRISCOLL, «Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*,» *Journal of Neuroscience*, vol. 17, pp. 1033-45, 1997.
- [120] M. PORTA-DE-LA-RIVA, L. FONTRDONA, A. VILLANUEVA y J. CERÓN, «Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation,» *Journal of Visualized Experiments*, vol. 64, p. e4019, 2012.
- [121] Wormclassroom, «*C. elegans* Cultivation - WormClassroom,» [En línea]. Available: <http://wormclassroom.org/c-elegans-cultivation>. [Último acceso: 15 Octubre 2015].
- [122] J. WHITE, E. SOUTHGATE, J. THOMSON y S. BRENNER, «The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*,» *Philosophical Transactions of The Royal Society*, vol. 314, nº 1165, 1986.
- [123] A. SOUKAS, E. KANE, C. CARR, J. MELO y G. RUVKUN, «Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*,» *Genes & Development*, vol. 23, pp. 496-511, 2009.
- [124] D. SCHUBERT, «Glucose metabolism and Alzheimer's disease,» *Aging Research Reviews*, vol. 4, nº 2, pp. 240-257, 2005.
- [125] A. SCHLOTTERER, G. KUKUDOV, F. BOZORGMEHR, H. HUTTER, X. DU, D. OIKONOMOU, Y. IBRAHIM, F. PFISTERER, N. RABBANI, P. THORNALLEY, A. SAYED, T. FLEMING, P. HUMPERT, V. SHWENGER, M. ZEIER, A. HAMANN, D. STERN, M. BROWNLEE, A. BIERHAUS, P. NAWROTH y M. MORCOS, «*C. elegans* as Model for the Study of High Glucose- Mediated Life Span Reduction,» *Diabetes*, vol. 58, pp. 2450-2456, 2009.

ANEXOS

A. Gráficos de los huevos in útero

Gráficos de huevos in útero contabilizados a las 24 horas posteriores a alcanzar el estado larvario L4 de *C. elegans mec-4d* (Gráfico 6) y *daf-2(ts);mec-4d* (Gráfico 7). Estos son datos complementarios a los de fecundidad que contabiliza los huevos ex útero.

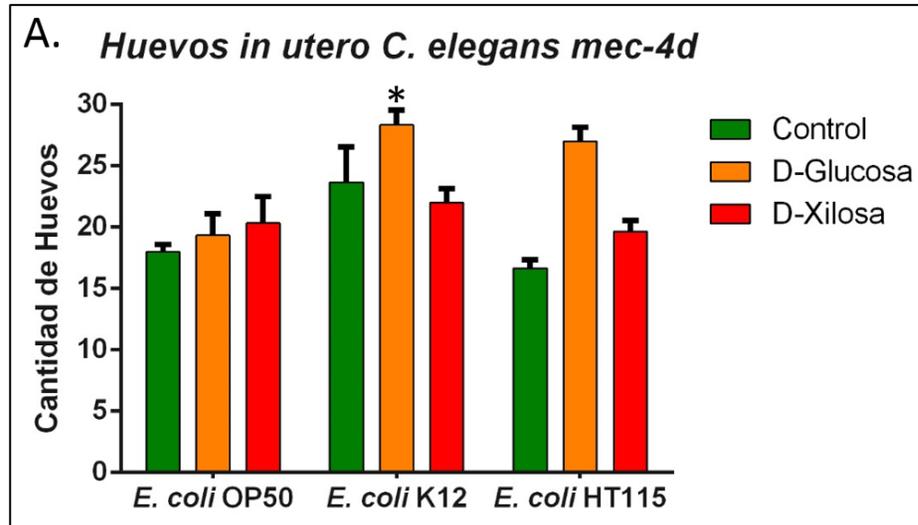


Gráfico 6. Cantidad de huevos in útero en *C. elegans mec-4d*.

Estos animales fueron cultivados a 20°C en *E. coli* OP50 hasta tener progenie, luego las larvas L1 fueron traspasadas a platos de Petri con la bacteria correspondiente (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 o *E. coli* HT115, 20°C). Una vez alcanzado L4 fueron traspasados de a un gusano por pocillo (24 pocillos por placa), y a las 24 horas posterior a eso se contabilizaron los huevos in útero y ex útero. **(A)** La cantidad huevos in utero, sólo se observa una aumento estadísticamente significativo en los gusanos alimentados con *E. coli* K12 suplementado con glucosa con respecto a los animales alimentados con *E. coli* OP50 suplementado con glucosa, en todos los demás no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos de los gusanos alimentados con *E. coli* OP50 con y sin azúcares con respecto a los resultados observados en *E. coli* K12 y *E. coli* HT115 (Se muestran los valores promedios, las barras de error se indican con SEM, N=3 de 16 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por Prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

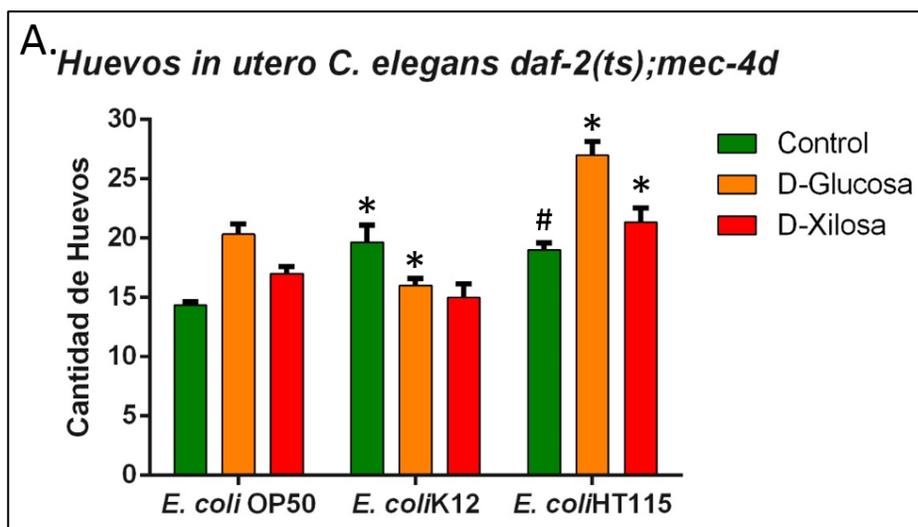


Gráfico 7. Cantidad de huevos in útero en *C. elegans daf-2(ts);mec-4d*.

Estos animales fueron cultivados a 25°C en *E. coli* OP50 hasta tener progenie, luego las larvas L1 fueron traspasadas a platos de Petri con la bacteria correspondiente (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 o *E. coli* HT115, 25 °C). Una vez alcanzado L4 fueron traspasados de a un gusano por pocillo (24 pocillos por placa), y a las 24 horas posterior a eso se contabilizaron los huevos *in útero*. (A) Los huevos *in útero*, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los gusanos alimentados con *E. coli* K12 y suplementado con glucosa, con *E. coli* HT115 y suplementado con azúcares, con respecto a los animales alimentados con *E. coli* OP50 y suplementado con azúcares (Se muestran los valores promedios, las barras de error se indican con SEM, N=3 de 16 gusanos por cada grupo; *p<0,05 y #p<0,005 por Prueba de t de Student comparado con el respectivo resultado obtenido con *E. coli* OP50).

B. Gráficos de la tasa de desarrollo

Gráfico de la tasa de desarrollo de *C. elegans mec-4d* (Gráfico 8, 10 y 11) y *daf-2(ts);mec-4d* (Gráfico 11, 13 y 14).

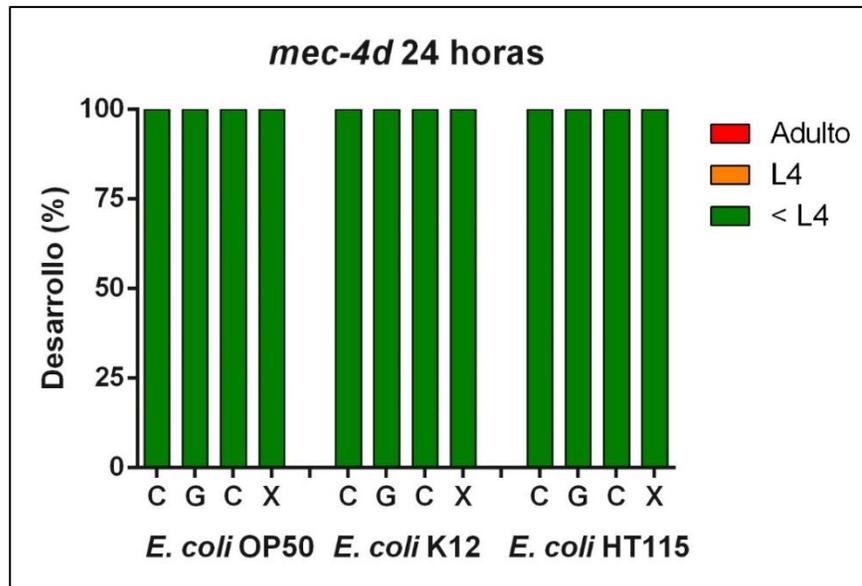


Gráfico 8. Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 24 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 20°C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 24 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

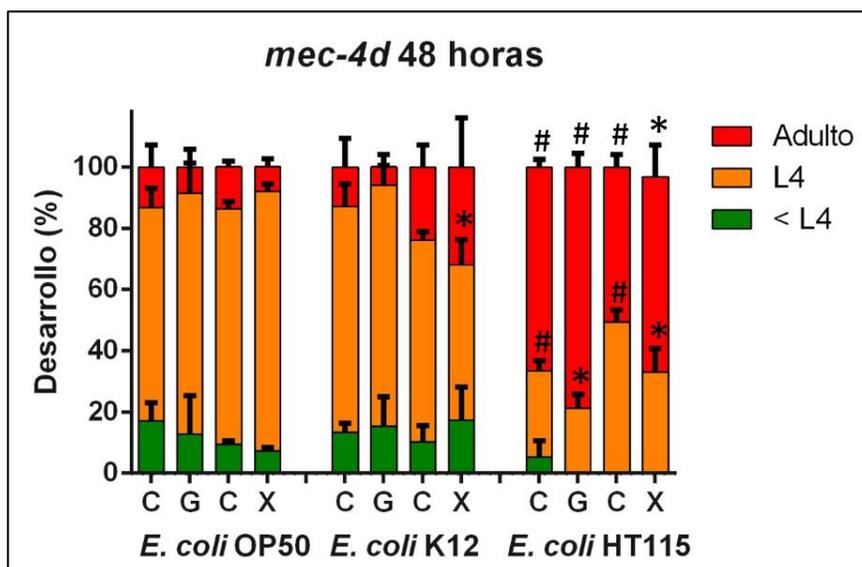


Gráfico 9. (Gráfico 2) Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 48 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 20°C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

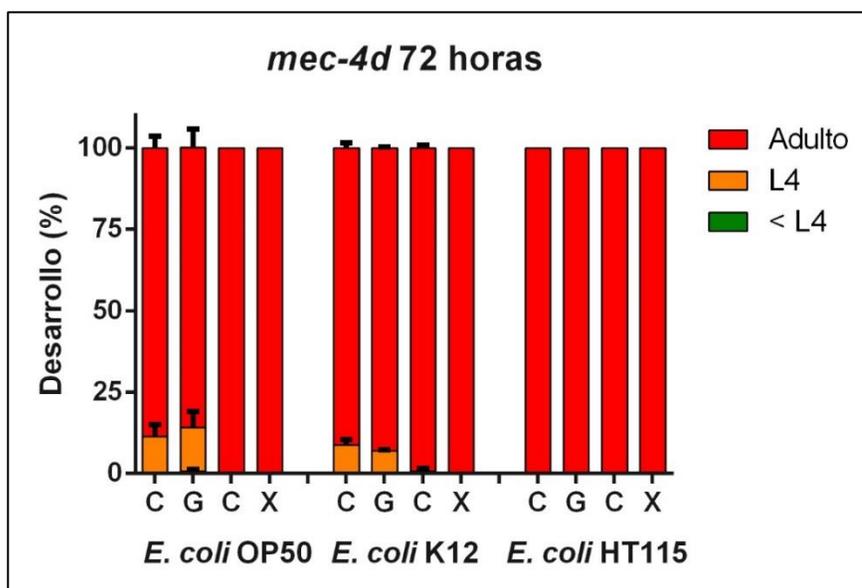


Gráfico 10. Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 20°C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

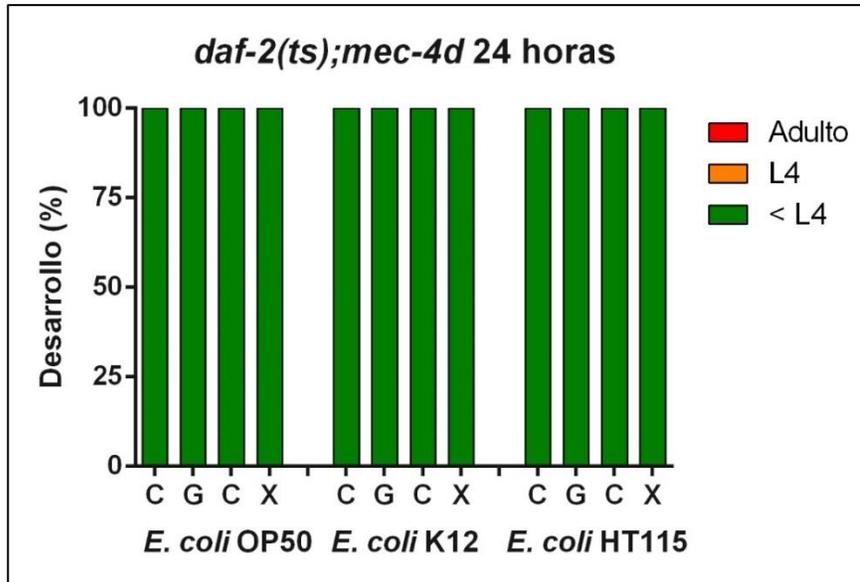


Gráfico 11. Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 24 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 24 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

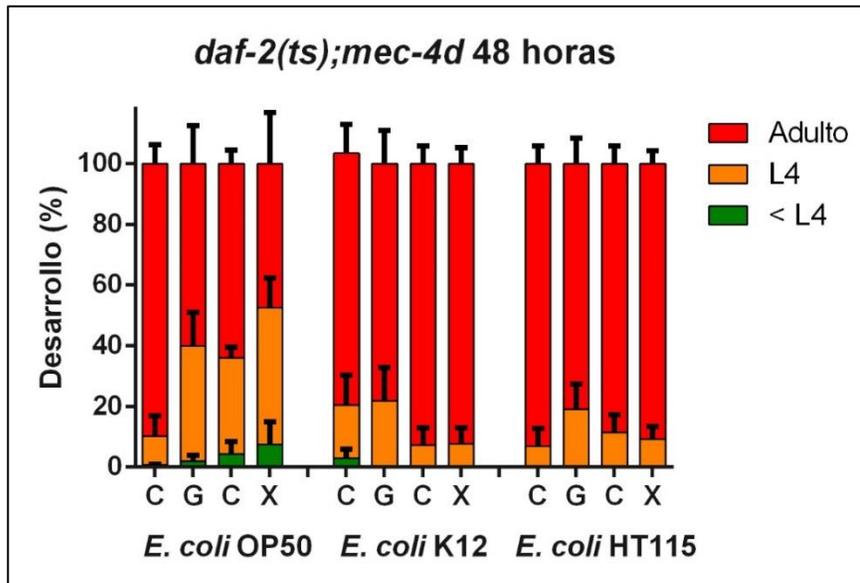


Gráfico 12. (Gráfico 3) Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 48 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C))

adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

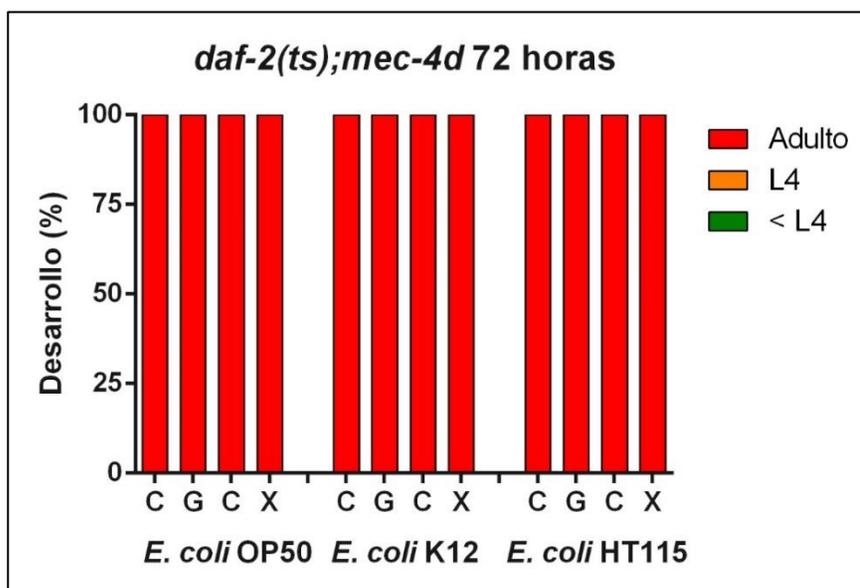


Gráfico 13. Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión.

Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4 (< L4), L4 y adultos.

C. Datos correspondientes a los gráficos de Resultados

Tabla 5. Datos correspondientes al Gráfico 8

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 24 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 20 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 24 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans mec-4d</i>										
	24 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> K12	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HT115	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0

Tabla 6. Datos correspondientes al Gráfico 2

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 48 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 20 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans mec-4d</i>										
	48 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	19,1	6,4	26,1	80,9	68,9	58,7	0	24,7	15,2
	Glucosa	0	0	38,1	95,1	80	60,9	4,9	20	1
	Control X	7,5	9,4	11,5	81,3	73,7	75,9	11,1	17	12,7
	Xilosa	4,6	8,6	8,4	85,1	80,5	88,9	10,4	10,9	2,7
<i>E. coli</i> K12	Control G	9,9	11,4	19,1	58,8	81,1	80,9	31,3	7,5	0
	Glucosa	32,9	13,1	0	60,4	80,7	95,1	6,7	6,3	4,9
	Control X	17,4	0	13,3	65,2	61,6	70,8	17,4	38,4	15,9
	Xilosa	36,9	0	15,1	50,9	36,3	64,8	12,2	63,7	20,1
<i>E. coli</i> HT115	Control G	0	0	15,8	33	29,6	22,1	67	70,4	62,1
	Glucosa	0	0	0	15	18,7	30	85	81,3	70
	Control X	0	0	0	54,2	41,3	52,4	45,8	58,7	47,6
	Xilosa	0	0	0	4,7	5,6	17,6	95,3	94,4	82,4

Tabla 7. Datos correspondientes al Gráfico 10:

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 20 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans mec-4d</i>										
	72 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	0	0	0	14,6	4,2	15,4	85,4	95,8	84,6
	Glucosa	0	0	2	8	8,5	23,6	92	91,5	74,5
	Control X	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>E. coli</i> K12	Control G	0	0	0	5,9	9	11,5	94,1	91	88,5
	Glucosa	0	0	0	7,6	6,4	7	92,4	93,6	93
	Control X	0	0	0	0	2,4	0	100	97,6	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>E. coli</i> HT115	Control G	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Glucosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Control X	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100

Tabla 8. Datos correspondientes al Gráfico 11

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 24 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 24 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans daf-2(ts);mec-4d</i>										
	24 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> K12	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> HT115	Control G	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Glucosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Control X	100	100	100	0	0	0	0	0	0
	Xilosa	100	100	100	0	0	0	0	0	0

Tabla 9. Datos correspondientes al Gráfico 3

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 48 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 48 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans daf-2(ts);mec-4d</i>										
	48 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	1,3	0,8	0	3,6	2,3	22,8	95,1	96,9	77,2
	Glucosa	6	0	0	53,3	43,7	16,8	40,6	56,3	83,2
	Control X	0	0	12,7	38,7	27,1	29,3	61,3	72,9	58
	Xilosa	0	0	22,3	42,9	29,2	63	57,1	70,8	14,7
<i>E. coli</i> K12	Control G	8,9	0	0	34	0	18,6	67,2	100	81,4
	Glucosa	0	0	0	42,5	5,6	17,6	57,5	94,4	82,4
	Control X	0	0	0	3,4	0	18,6	96,6	100	81,4
	Xilosa	0	0	0	0	5,6	17,6	100	94,4	82,4
<i>E. coli</i> HT115	Control G	0	0	0	2,2	0	18,6	97,8	100	81,4
	Glucosa	0	0	0	34,2	5,6	17,6	65,8	94,4	82,4
	Control X	0	0	0	15,8	0	18,6	84,2	100	81,4
	Xilosa	0	0	0	4,7	5,6	17,6	95,3	94,4	82,4

Tabla 10. Datos correspondientes al Gráfico 13

Registro del desarrollo del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando los gusanos en los estadios larvarios menores a L4, L4 y adultos.

<i>C. elegans daf-2(ts);mec-4d</i>										
	72 horas	< L4			L4			Adultos		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Glucosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Control X	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>E. coli</i> K12	Control G	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Glucosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Control X	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>E. coli</i> HT115	Control G	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Glucosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Control X	0	0	0	0	0	0	100	100	100
	Xilosa	0	0	0	0	0	0	100	100	100

Tabla 11. Datos correspondientes al *Gráfico 1 y 7*

La influencia de las diferentes dietas bacterianas en la fecundidad de *C. elegans* fueron estudiadas en el mutante *mec-4d*. (A) Cantidad de huevos in útero, (B) cantidad de huevos ex útero.

<i>C. elegans mec-4d</i>										
		Control			D- Glucosa			D-Xilosa		
In utero	<i>E. coli</i> OP50	18	17	19	22	20	16	22	16	23
	<i>E. coli</i> K12	29	23	19	30	26	29	22	24	20
	<i>E. coli</i> HT115	16	16	18	25	29	27	18	20	21
Ex utero	<i>E. coli</i> OP50	62	70	81	57	55	62	63	66	69
	<i>E. coli</i> K12	133	116	110	73	83	75	104	111	120
	<i>E. coli</i> HT115	104	97	89	69	68	62	87	93	81

Tabla 12. Datos correspondientes al *Gráfico 2 y 8*

La influencia de las diferentes dietas bacterianas en la fecundidad de *C. elegans* fueron estudiadas en el mutante *daf-2(ts);mec-4d*. (A) cantidad de huevos in útero, (B) cantidad de huevos ex útero.

<i>C. elegans daf-2(ts);mec-4d</i>										
		Control			D- Glucosa			D-Xilosa		
In utero	<i>E. coli</i> OP50	14	14	15	22	20	19	17	16	18
	<i>E. coli</i> K12	22	20	17	15	16	17	15	17	13
	<i>E. coli</i> HT115	19	20	18	25	29	27	22	19	23
Ex utero	<i>E. coli</i> OP50	31	40	35	35	40	37	47	45	43
	<i>E. coli</i> K12	83	93	94	51	61	57	75	73	67
	<i>E. coli</i> HT115	62	68	75	53	61	62	55	61	79

Tabla 13. Datos correspondientes al *Gráfico 5*

Registro de la neurodegeneración del mutante *C. elegans mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 20 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando y clasificando los axones de los gusanos en axón del tipo salvaje (AxW), axón con cuentas (AxB), axón truncado (AxT) y axón ausente (Axo).

<i>C. elegans mec-4d</i>													
		AxW			AxB			AxT			Axo		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	5,3	4,4	10,8	0,0	0,0	0,0	16,5	9,6	10,9	78,2	86,0	78,3
	Glucosa	6,0	3,3	4,6	0,0	0,0	0,0	8,2	4,4	8,2	85,8	92,4	87,2
	Control X	4,6	1,7	5,4	0,0	0,0	0,0	12,7	9,0	16,6	82,8	89,4	78,0
	Xilosa	13,5	10,3	22,6	0,0	0,0	0,0	10,8	16,7	11,8	75,7	72,9	65,6
<i>E. coli</i> K12	Control G	42,3	49,4	35,1	1,9	0,0	2,1	14,4	12,4	19,1	41,3	38,2	43,6
	Glucosa	25,6	30,8	34,8	4,4	7,7	1,1	13,3	6,6	13,0	56,7	54,9	51,1
	Control X	30,6	38,1	21,6	0,0	0,0	0,0	21,6	20,6	2,5	47,8	41,3	75,9
	Xilosa	38,5	33,7	26,8	1,4	0,0	1,8	8,2	13,9	3,6	51,9	52,4	67,9
<i>E. coli</i> HT115	Control G	44,4	40,8	58,4	1,9	0,0	7,9	6,5	5,8	9,9	47,2	53,4	23,8
	Glucosa	38,9	44,7	57,7	0,9	1,1	10,3	8,3	5,3	11,5	51,9	48,9	20,5
	Control X	39,6	42,7	39,7	3,3	2,2	0,0	9,9	6,7	6,4	47,3	48,3	53,8
	Xilosa	61,5	47,7	21,5	7,7	2,3	3,1	7,7	8,1	24,6	23,1	41,9	50,8

Tabla 14. Datos correspondientes al *Gráfico 6*
 Registro de la neurodegeneración del mutante *C. elegans daf-2(ts);mec-4d* 72 horas posterior a la eclosión. Estos animales fueron cultivados a 25 °C en las respectivas bacterias (*E. coli* OP50, *E. coli* K12 y *E. coli* HT115) con o sin azúcar (D-Glucosa (G) o D-Xilosa (X); Control (C)) adicionada al medio, y observados a las 72 horas contabilizando y clasificando los axones de los gusanos en axón del tipo salvaje (AxW), axón con cuentas (AxB), axón truncado (AxT) y axón ausente (Axo).

<i>C. elegans daf-2(ts);mec-4d</i>													
		AxW			AxB			AxT			Axo		
<i>E. coli</i> OP50	Control G	58,9	85,9	84,1	31,1	1	6,8	1,1	5,1	6,8	8,9	8,1	2,3
	Glucosa	76,5	73,4	87,1	15,7	9,2	7,1	0	0	2,9	7,8	17,4	2,9
	Control X	78,7	81,6	85,3	0	2,3	0	8,2	10,3	2,9	13,1	5,7	11,8
	Xilosa	95,2	91,9	70,8	0	2,7	1,4	4,8	1,4	6,9	0	4,1	20,8
<i>E. coli</i> K12	Control G	94,3	94,8	90,5	0	0	0	0	5,2	4,2	5,7	0	5,3
	Glucosa	93,2	81,6	80,9	0	8,7	0	0	3,9	11,3	6,8	5,8	7,8
	Control X	86,7	88,6	82,1	1,2	0	0	3,6	5,7	11,5	8,4	5,7	6,4
	Xilosa	78,2	90,7	82,8	0	1	6,1	12,6	4,1	5,1	9,2	4,1	6,1
<i>E. coli</i> HT115	Control G	88,6	93,5	82,4	0	3,3	4,6	6,8	2,2	6,5	4,5	1,1	6,5
	Glucosa	86,8	89,7	93,4	2,2	6,2	0	4,4	3,1	6,6	6,6	1	0
	Control X	89,2	93,5	92,8	1,2	0,9	0,9	2,4	3,7	2,7	7,2	1,9	3,6
	Xilosa	86,1	90,4	90,7	0	1,7	0,9	6,9	4,3	4,4	6,9	3,5	4

D. Prueba de T de Student

Los datos numéricos de los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism 6. El análisis realizado a los datos fue una prueba de T de Student que compara 2 muestras independientes, por ejemplo, se compararon los datos del control de *E. coli* OP50 con los del control de *E. coli* K12, que se observan en la Tabla 15.

Tabla 15. Datos reales para ejemplificar el análisis de t de student.

<i>C. elegans</i> -4d mec huevos Ex utero							
	Control			\bar{X}	S_X	n	$S_{X_1X_2}$
<i>E. coli</i> OP50	62	70	81	71	9,539392	3	10,80123
<i>E. coli</i> K12	133	116	110	119,667	11,93035	3	

Donde \bar{X} es el promedio, S_X es la desviación estándar, n el tamaño de la muestra y $S_{X_1X_2}$ es la desviación estándar combinada y se calcula de la siguiente manera.

$$S_{X_1X_2} = \sqrt{\left(\frac{1}{2}\right) (S_{x_1}^2 + S_{x_2}^2)}$$

Luego, se calcula el ratio t

$$t = \frac{x_1 - x_2}{S_{X_1X_2} \sqrt{\frac{2}{n}}} = \frac{71 - 119,667}{10,80123 \cdot \sqrt{\frac{2}{3}}} = 5,51828$$

Posteriormente se verifica si el valor t es mayor o no al valor obtenido de la tabla t de student, es decir, se observa en la tabla el valor $\alpha = 0,05$ o el valor $1 - \alpha = 0,95$, y además se consideran los grados de libertad (g.l.) que se calculan de la siguiente manera $g.l. = n_1 + n_2 - 2$, y para el ejemplo son 4. De este modo, se obtiene un valor de la tabla t de student igual a 2,776, y dado que t es mayor que ese número, implica que la diferencia entre las medias de las dos muestras es estadísticamente significativas.

		Significant?	P value	Mean1	Mean2	Difference	SE of difference	t ratio
1	Control	*	0.00526469	71.0	119.667	-48.6667	8.81917	5.51828
2	D-Glucosa	*	0.00679355	58.0	77.0	-19.0	3.69685	5.13952
3	D-Xilosa	*	0.00076369	66.0	111.667	-45.6667	4.94413	9.23654

Figura 16. Información obtenida en del programa GraphPad Prism al realizar un análisis de t de student a los datos muestrales definidos en la Tabla 15.

E. Análisis a datos relativos a huevos ex-utero

Utilizando los datos de la cantidad de huevos ex – útero de la Tabla 11, considerando un $\alpha = 0,05$ (*) y un $\alpha = 0,005$ (#), y los grados de libertad $g.l. = n_1 + n_2 - 2 = 3 + 3 - 2 =$

4. Luego, se analiza los datos como en el ejemplo anterior, obteniendo un valor de la tabla t de *student* igual a 2,7764 en el caso de $\alpha = 0,05$, y un valor igual a 5,5975 para $\alpha = 0,005$. Entonces, todos los valor t mayores a 2,7764 son marcados con un *, y los mayores a 5,5975 con un #, lo que implica que la diferencia entre las medidas de las dos muestras es estadísticamente significativa.

La Tabla 16 y Tabla 17 corresponde a datos de huevos ex – útero del mutante *mec-4d*. En la tabla 12 se compara, por ejemplo, el control de los mutantes alimentados con *E. coli* OP50 y con *E. coli* K12, lo cual tienen una significancia del $p < 0,05$, los datos de esta tabla están expuestos en el gráfico 1. En la tabla 13, por ejemplo, gusanos alimentados con la misma bacteria se compara entre su control y los suplementados con glucosa, en el caso de los mutantes cultivados con *E. coli* K12, la comparación antes mencionada tiene una diferencia significativa del $p < 0,005$.

En las Tabla 18 y Tabla 19 corresponde a datos de huevos ex – útero del mutante *daf-2(ts);mec-4d*. En la Tabla 18 se compara, por ejemplo, el control de los mutantes alimentados con *E. coli* OP50 y con *E. coli* K12, lo cual tienen una significancia del $p < 0,005$, los datos de esta tabla están expuestos en el gráfico 2. En la Tabla 19, por ejemplo, gusanos alimentados con la misma bacteria se compara entre su control y los suplementados con glucosa, en el caso de los mutantes cultivados con *E. coli* HT115, la comparación antes mencionada resulta no tener una diferencia significativa.

Tabla 16. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – útero de mutantes *mec-4d*. Comparación de una condición (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.

t ratio	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> HT115	<i>E. coli</i> K12 vs <i>E. coli</i> HT115
Control	5,5182	3,6625	2,8263
	*	*	
D-Glucosa	5,1395	2,7607	2,8395
	*		*
D-Xilosa	9,2365	5,4221	4,2652
	#	*	*

Tabla 17. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – útero de mutantes *mec-4d*. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.

t ratio	Control vs D-glucosa	Control vs D-xilosa	D-glucosa vs D-xilosa
<i>E. coli</i> OP50	2,2079	0,8660	2,9541
			*
<i>E. coli</i> K12	5,6623	0,9638	6,2487
	#		#
<i>E. coli</i> HT115	6,2499	1,7424	5,0454
	#		*

Tabla 18. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – útero de mutantes *mec-4d;daf-2*. Comparación de una condición (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con bacterias distintas.

t ratio	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> OP50 vs <i>E. coli</i> HT115	<i>E. coli</i> K12 vs <i>E. coli</i> HT115
Control	12,5048	7,2203	4,2133
	#	#	*
D-Glucosa	5,8480	6,6724	-0,5734
	#	#	
D-Xilosa	10	2,7386	0,8770
	#		

Tabla 19. Datos relativos a la cantidad de huevos ex – utero de mutantes *mec-4d;daf-2*. Comparación entre diferentes condiciones (control, d-glucosa, d-xilosa) de animales alimentados con la misma bacteria.

t ratio	Control vs D-glucosa	Control vs D-xilosa	D-glucosa vs D-xilosa
<i>E. coli</i> OP50	-0,6708	2,6919	4,1309
			*
<i>E. coli</i> K12	7,3858	4,3079	4,0658
	#	*	*
<i>E. coli</i> HT115	2,0506	0,4099	0,8168

F. Temperatura de crecimiento

Tabla 20. Temperatura de crecimiento.

La tasa de crecimiento de *C. elegans* difiere bajo diferentes temperaturas. El desarrollo desde embrión hasta adulto toma cerca de 2,5 días a 25 °C, y 6 días a 15 °C [121].

Temperatura (°C)	Embriogénesis (horas)	Molts (horas después de eclosión)				Primera puesta de huevos (horas después de eclosión)
		L1 - L2	L2 - L3	L3 - L4	L4 - Adulto	
16	19	24	39	54,5	74,5	94-97
20	18	15	24	34	46	59-60
25	14	11,5	18,5	26	35,5	45-46

G. Anatomía de estados larvarios y hermafrodita adulto de *C. elegans*

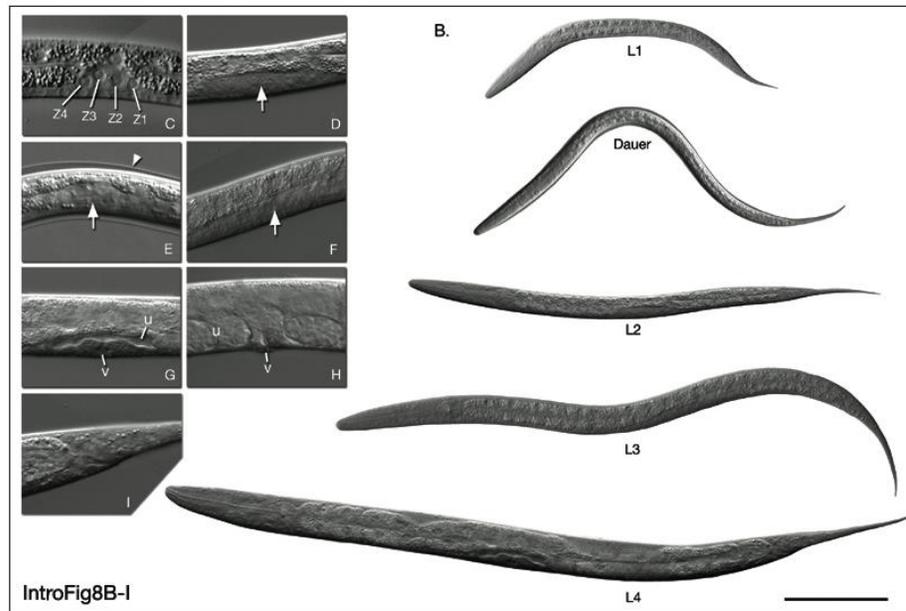


Figura 17. Estados larvarios de Desarrollo.

B. Imagen DIC de cada estado larvario. Barra escalara de 0,1 mm. C-H. Imagen DIC agrandadas de la gónada del estado larvario L1 hasta adulto del animal respectivamente. Los tamaños no son escalables. Las flechas apuntan a las gónadas en D-F, v: vulva, u: útero. (C) Cuatro células de gónadas primordiales son etiquetadas en L1. (D) Células germinales se incrementan en número en L2. (E) La gónada es similar a la gónada de dauer L2 en una etapa temprana. (H) La vulva está abierta hacia afuera y el útero está lleno de huevos fertilizados en adulto. I. La delgada, cola de una hermafrodita L4 (comparado con InfoFig5 panel E) [21].

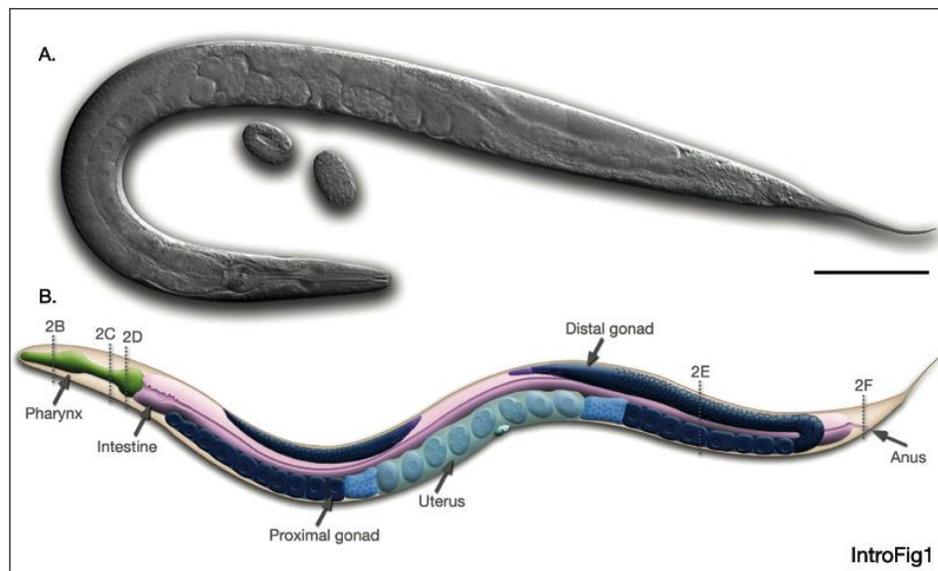


Figura 18. Anatomía de un adulto hermafrodita.

A. Imagen DIC de un adulto hermafrodita, lado izquierdo lateral. Barra escalar de 0,1 mm. B. Dibujo esquemático de la estructura anatómica, lado lateral izquierdo. Línea puntada y los números marcan el nivel de cada sección en la figura [21].