



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

Percepción del estrés osmótico en el tardígrado
Hypsibius dujardini

Alumno

ERÉNDIRA ANAÍ DE LA TORRE GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

DR. FAUSTO ARELLANO CARBAJAL

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO. JUNIO DEL 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría En Ciencias Biológicas

Percepción del estrés osmótico en el tardígrado *Hypsibius dujardini*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Lic. Eréndira Anaí De la Torre González

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Secretario

Dra. Etzel Garrido Espinoza
Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Suplente

Dra. Mónica Figueroa
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario Junio del 2019
México

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por la continua educación que he recibido así como todo el apoyo recibido en múltiples formas que me han ayudado en mi camino.

A mi director, Fausto Arellano Carbajal por la oportunidad dada para hacer este proyecto y su paciencia durante mi formación profesional y personal. No tengo palabra que describa el profundo agradecimiento que siento y que tendré de por vida pero que son valiosas enseñanzas y el soporte que me has otorgado. ¡Gracias!

A mis compañeros del laboratorio GMEE, por sus consejos, enseñanzas y convivencia en cada comida y en los pasillos dadas durante mi estadía con ustedes.

A Iván Sosa, por la aportación de las cepas de trabajo y sus valiosos consejos y conocimientos.

A Bernardo Águila, por la aportación de la cepa de microalga que me ayudó en un momento de crisis. ¡Mil gracias!

A mi comité sinodal, la Dra. Etzel Garrido, el Dr. José Antonio, la Dra. Mónica Figueroa, la Dra. Angelina Rodríguez. Les agradezco cada palabra y momento que me han hecho crecer, por la retroalimentación y por su tiempo para mi crecimiento profesional y personal, por su comprensión y por haber aceptado guiarme. ¡Gracias!.

A mi familia que me ha dado el soporte y amor dado durante este proyecto. Por su comprensión, cariño y paciencia. Por nunca dejarme sola, llenarme de su confianza

y darme alojamiento y mucho apoyo para que saliera adelante, como siempre me han enseñado y darme el ejemplo de vida de unidad y fortaleza. ¡Los amo!

A mi amiga, Nami, por acompañarme, aconsejarme y regalarme momentos valiosos que llevo siempre en mi corazón, María.

A mi pareja, Javi, quien me ha otorgado su valiosa compañía y asesoramiento en momentos críticos. Gracias por todo lo que me has enseñado y por tu incondicional amor y paciencia. Sin ti no hubiera sido posible en cada momento difícil. Te amo inmensamente, elmdmp y eladm.

A *Hypsibius*, sin ustedes no hubiera sido posible nada. Gracias por permitirme conocerlos más y tener el gusto de trabajarlos y por los sacrificios hechos. Valió la pena cada minuto. Ha sido un gran sueño cumplido.

RESUMEN

La osmobiosis es un tipo de criptobiosis inducido por la pérdida de agua debido a altas concentraciones de sales en el medio. En células de mamíferos se conoce que la subfamilia de los canales TRPV como TRP4, participa en la transducción de señales en respuesta a estímulos mecánicos y osmóticos. Así mismo, en organismos filogenéticamente cercanos a los tardígrados, están presentes proteínas ortólogas a TRP4 como OSM-9 y OCR-2 (*Caenorhabditis elegans*) y IAV y NAN (*Drosophila melanogaster*). No obstante, se desconoce el mecanismo por el cual los tardígrados perciben los cambios osmóticos en el ambiente y que los hace prepararse para entrar en osmobiosis. Por otra parte, tras la secuenciación del genoma del tardígrado *Hypsibius dujardini* y el establecimiento de técnicas como el silenciamiento génico mediante ARN interferente lo ha vuelto un modelo emergente que ofrece muchas ventajas para diferentes áreas de estudio. Por ello, de acuerdo a lo reportado en *D. melanogaster* y *C. elegans*, se exploró si *H. dujardini* presenta el canal ortólogo NAN y si de éste depende la percepción de los cambios en la osmolaridad en un ambiente hiperosmótico previo a su ingreso en el tonel criptobiótico. Mediante un análisis filogenético empleando el método heurístico de máxima parsimonia, se determinó que TRP gamma de *H. dujardini* es la proteína más cercana a NAN. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar un producto de 439 pb con la finalidad de generar ARN interferente para el silenciamiento génico. Así mismo, se determinó que la exposición a 0.1 M NaCl induce el tonel criptobiótico en un 85% de las muestras (n=60). Por microinyección, se inyectó ARN de cadena doble y se evaluó el comportamiento de inducción al tonel mostrando que en adultos tratados, no hay diferencias en cuanto a la inducción del tonel comparado con el control pero sí en la progenie de adultos silenciados (n=60, p>0.05, t-student, dos colas). Por otra parte, se trataron 120 individuos con dos fármacos bloqueadores de TRPγ y se desafiaron a individuos adultos a condiciones hiperosmóticas. Se observó que hubo una diferencia significativa

durante el bioensayo ($P = 0.003$, prueba de rangos de signos de Wilcoxon) entre los individuos tratados y controles, sugiriendo que la actividad de TRP γ está implicada en la inducción del tonel por osmobiosis.

Palabras clave: Osmobiosis, *Hypsibius exemplaris*, TRP γ , tardígrados.

ABSTRACT

Osmobiosis is a cryptobiotic state induced by the loss water in a high salt concentration medium. A prompt response of the organism to osmotic stress is important for their survival. In mammal cells is known that subfamily of TRPV channels like TRP4 is involved in transduction pathway in response to mechanic and osmotic stimuli. Likewise, organisms phylogenetic related to tardigrades, presents orthologous TRP4 proteins like OSM-9 and OCR-2 in *Caenorhabditis elegans* and IAV and NAN in *Drosophila melanogaster*. However, the mechanism that allow the tardigrades sense the osmotic changes in the environment and prepares to enter in tun remains unknown. On the other hand, after the genome sequencing of *Hypsibius dujardini* and the standardization of techniques like gene silencing through RNA interference (RNAi) makes *H. dujardini* an emergent model which offer a lot of vantages to different study fields. Thus, according with the studies in *D. melanogaster* and *C. elegans*, I explore if *H. dujardini* have and orthologous of NAN and if it depends the perception of the osmotic changes in hyperosmotic environment and the tun formation. Through a phylogenetic analyses with maximum parsimony, we determinate that *H. dujardini* TRP gamma (TRPy) is the closest protein to NAN. A set of primers were designed in order to amplify a product of 439 bp and RNAi for gene silencing was generated. In the same way, It was found that exposition at NaCl 0.1 M induced a cryptobiotic tun in the 85% of the samples (n=60). Microinjected ARNdS in order to generated RNAi in the tardigrades and we evaluated the behavior of tun formation, the data shows that there's not significant difference with the adults microinjected with the control but the progenie of silence adult shows differences in all the times of observation in comparison with the control ($p < 0.05$, t-student, two coil). Moreover, treated 120 adults with two pharm block of TRPy and challenge with hyperosmotic conditions to evaluate the tun formation. Observed that have a differences in the essay in adults treated with the TRPy block ($p = 0.003$, Wilcoxon

ranks sum test) in comparison with control (DMSO 0.001%) suggest that the activity of TRP γ is necessary to induced the tun state during osmobiosis.

Key words: Osmobiosis, *H. dujardini*, TRP γ , tardigrades.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES	19
2.1 TARDÍGRADOS	19
2.1.1 <i>Criptobiosis</i>	23
2.2 OSMOBIOSIS.....	26
2.2.1 <i>Hypsibius dujardini</i>	27
2.3 OSMOSENSACIÓN Y OSMORREGULACIÓN.....	27
2.3.1 <i>Osmosensación en mamíferos</i>	28
2.3.2 <i>Osmosensación en levaduras</i>	30
2.3.3 <i>Osmosensación en invertebrados</i>	31
2.4 DESARROLLO EN EL SISTEMA NERVIOSO DE PANARTRÓPODOS	33
3. HIPÓTESIS	36
4. OBJETIVO GENERAL	37
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
6. MATERIALES Y MÉTODOS	38
6.1 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	38
6.2 CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE TARDÍGRADOS.....	38
6.3 EXTRACCIÓN DE ARN Y PREPARACIÓN DE ADN COMPLEMENTARIO	39
6.4 EXTRACCIÓN DE ADN	39
6.5 AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR CITOCROMO OXIDASA I (COI)	40
6.6 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LA SECUENCIA ORTÓLOGA A NANCHUNG EN <i>H. DUJARDINI</i>	40
6.7 SILENCIAMIENTO GÉNICO POR ARN DE INTERFERENCIA	42
6.8 MICROINYECCIÓN.....	43
6.9 TRATAMIENTO CON BLOQUEADORES DEL CANAL TRPY	44

6.10	INDUCCIÓN DE TONEL CRIPTOBIÓTICO MEDIANTE ESTRÉS SALINO	44
6.11	ENSAYO DE HIPEROSMOLARIDAD.....	45
6.12	PRUEBAS ESTADÍSTICAS	45
7.	RESULTADOS	46
7.1	IDENTIFICACIÓN DE <i>HYPISIBIUS</i>	46
7.2	IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA ORTÓLOGA DE <i>NANCHUNG</i> (NAN) DE <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> EN EL GENOMA DE <i>HYPISIBIUS DUJARDINI</i>	48
7.3	GENERACIÓN DE ARNI DEL CANAL TRP Γ	53
7.4	MICROINYECCIÓN.....	58
7.5	ENSAYO DE OSMOBIOSIS.....	59
7.6	DESAFÍO A HIPEROSMOLARIDAD EN INDIVIDUOS TRATADOS CON BLOQUEADORES DEL TRP Υ	60
7.7	DESAFÍO A HIPEROSMOLARIDAD EN INDIVIDUOS SILENCIADOS	61
7.8	RESPUESTA AL ESTRÉS OSMÓTICO DE PROGENIE SILENCIADA	62
8.	DISCUSIÓN	65
8.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPALES DOMINIOS DE ACCIÓN DE TRP Υ EN <i>HYPISIBIUS</i>	65
8.2	OBTENICIÓN DE RNACD DE TRP Υ EN <i>H. EXEMPLARIS</i>	66
8.3	INDUCCIÓN DEL TONEL POR HIPEROSMOLARIDAD EN <i>H. EXEMPLARIS</i>	67
8.4	ACTIVIDAD DE TRP Υ DURANTE LA OSMOBIOSIS.....	68
9.	CONCLUSIONES	71
10.	PERSPECTIVAS	72
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hembra de <i>H. dujardini</i> y huevos depositados en la exuvia.....	21
Figura 2. Etapas del ciclo de vida de los tardígrados.....	22
Figura 3. Tonel criptobiótico inducido por estrés hiperosmótico de <i>H. dujardini</i>	24
Figura 4. Latencia en tardígrados.....	26
Figura 5. Diversos estímulos que activan al canal TRPV4 mediante proteínas Quinasas STK-1 (Quinasa-1 serina/treonina), PKA (proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico), PKC (Proteína quinasa C) y Src (proteínas de la familia Src)	29
Figura 6. Ilustración de la vía Hog1 y la vía por medio de dos componentes principales en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que detectan los cambios en la osmolaridad ambiental	31
Figura 7. Representación de las células mecanoreceptoras de nemátodos y mosca de fruta	33
Figura 8. Desarrollo del sistema nervioso del clado Ecdyzoosa.....	34
Figura 9. Mapa del plásmido PCR4 blunt-TOPO TA Cloning de Invitrogen.	41
Figura 10. Amplicón del gen citocromo oxidasa I (COI) de <i>Hypsibius dujardini</i> en un gel de agarosa 1%	46

Figura 11. Cladograma de las secuencias de citocromo oxidasa I (COI) de la familia <i>Hypsibiidae</i> y de las muestras de la cepa de trabajo	47
Figura 12. Cladograma de la secuencias proteicas resultantes de nan en el genoma de <i>Hypsibius dujardini</i>	49
Figura 13. Análisis de principales dominios de acción de TRP γ y NAN	51
Figura 14. Alineamiento de la secuencia TRP γ de <i>H. exemplaris</i> (hTRP γ), <i>Periplaneta americana</i> (pTRP γ) y <i>D. melanogaster</i> (dTRP γ)	52
Figura 15. Amplicón de TRP γ de colonias de <i>E. coli</i> DH5 α en un gel de agarosa 1%.	54
Figura 16. Amplicón de TRP γ a partir de ADN de plásmido para templado de transcripción in vitro en un gel de agarosa 1%.	55
Figura 17. <i>Integridad del ARN de doble cadena después de la transcripción a 37°C en un gel de agarosa 1%</i>	56
Figura 18. ARNcd para microinyectaré purificado a través de dos protocolos.	57
Figura 19. Caricatura de la estructura empleada para el soporte durante la microinyección.....	58
Figura 20. Morfología de <i>H. exemplaris</i> ante condiciones hiperosmóticas y sin exposición a estrés salino	59
Figura 21. Ensayo de osmolaridad en <i>H. exemplaris</i> con NaCl al 0.1 M.....	60
Figura 22. Ensayo de osmobiosis en tardígrados tratados con los bloqueadores del canal TRP γ 8-br-cAMP (20 nM) y 2-APB (1 μ M) y con el control DMSO 0.001%. 61	

Figura 23. Ensayo de osmobiosis en individuos adultos después de 24 horas de ser silenciados mediante microinyección. 62

Figura 24. Ensayo de inducción de osmobiosis con NaCl 0.1M en la progenie silenciada para TRPy de *H. exemplaris* 63

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por reacción de la polimerasa de los genes COI, TRP γ , beta tubulina, actina y adición del promotor de la ARN polimerasa T7 para las mismas secuencias blanco.....	43
Cuadro 2. Concentración y pureza de extracciones de ARN total empleando diferentes protocolos de extracción y purificación.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Los tardígrados u “osos de agua” son animales acuáticos y semi-terrestres pertenecientes al clado Ecdyzoa, en el cual también pertenecen onicóforos, artrópodos y nematodos (Martín-Durán *et al.* , 2015), son conocidos generalmente por la gran resistencia que poseen ante ambientes adversos como temperaturas extremas que van desde los -272°C hasta los 150°C (Weronika y Łukasz, 2016); alta y bajas presiones (280 hPa a 7 500 MPa). Así mismo, se han encontrado en suelo Ártico, en la Antártida, en mar profundo a 24,690 m en el Océano Índico y en las laderas de las montañas más altas (Nelson, 2002). De las especies encontradas en el suelo ártico, se conoce que pueden sobrevivir hasta seis años a -80°C . Para resistir a condiciones adversas, el organismo presenta una estrategia denominada criptobiosis el cual involucra un cambio a nivel fisiológico, anatómico y molecular denominado tonel. La inducción de dicho estado se da por diferentes estímulos ambientales, como congelamiento, desecación, bajos niveles de oxígeno y cambios en la osmolaridad. Además, el tonel es reversible, cuando las condiciones vuelven a ser óptimas, sus funciones metabólicas se restauran y el organismo vuelve a ser activo. Se ha reportado experimentalmente que durante el tonel, los individuos sobreviven a altas dosis de radiación y a la presencia de químicos como el sulfuro de hidrógeno, dióxido de carbono y hasta diez minutos en etanol (Weronika y Łukasz, 2016). Muchos estudios han contribuido al entendimiento del cambio de las estructuras anatómicas en la formación del tonel (Czerneková *et al.* 2017), a las moléculas que participan en la resistencia a la deshidratación (Boothby *et al.* 2018), en las diferencias transcriptómicas en tardígrados hidratados y en tonel (Yoshida *et al.* 2017) pero pocos estudios indagan sobre que moléculas participan en la detección de cambios ambientales que inducen el tonel criptobiótico.

Por otra parte, a partir del año 2007 el modelo de estudio emergente para tardígrados fue *Hypsibius dujardini* (Gabriel *et al.* 2007) quienes destacaron su fácil mantenimiento y manipulación en el laboratorio. En el 2015 que su genoma fue secuenciado (Boothby *et al.* 2015). Durante esta época, el campo de investigación se ha amplió ya que al ser un organismo cercano a nematodos y artrópodos, se han adaptado técnicas descritas para estos organismos como el silenciamiento génico mediante ARN interferente, técnicas de localización por hibridación *in situ* e inmunotinción de embriones (Gabriel *et al.* , 2007; Tenlen *et al.* , 2013). Recientemente, se secuenció el genoma de *Ramazzottius varieornatus* un eutardígrado que es de las especies de tardígrados más resistentes a muchos tipos de estrés (Hashimoto *et al.* , 2016). Por lo que ha sido posible hacer estudios de transcriptómica comparativa durante la anhidrobiosis entre las dos especies secuenciadas (Yoshida *et al.* , 2017). Sin embargo, de los tipos de inducción al tonel registrados en tardígrados, poco se conoce acerca de la osmobiosis, un tipo de criptobiosis inducido por cambios en la osmolaridad externos y así como de sus mecanismos de detección previos para protegerse contra dicho estrés. Por otra parte, en mamíferos e invertebrados se ha documentado que las proteínas TRPV desempeñan un papel importante en la percepción de los cambios osmóticos externos. Tal es el caso de TRPV4 en células de mamíferos, OSM-9 y OCR-2 en *C. elegans* y IAV y NAN en *D. melanogaster*, que se expresan en neuronas periféricas o en cilios sensoriales, según sea el organismo y de las cuales, la expresión de estas es indispensable para una adecuada función perceptora a la hiperosmolaridad. Por otro lado, a nivel de estructuras anatómicas del sistema nervioso central, los tardígrados se encuentran agrupados con los onicóforos y artrópodos por lo que en este trabajo, se exploró si *H. dujardini* presenta una proteína ortóloga a Nan de *D. melanogaster* y adicionalmente se investigó el papel de dicha proteína ante desafíos hiperosmóticos. También se estableció el registro del tonel osmótico con NaCl 0.1 M, las condiciones óptimas para la experimentación

con este modelo de estudio y la identificación de la cepa de Carolina Biological Supply Company, Burlington como *Hypsibius exemplaris*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Tardígrados

Los tardígrados son metazoos microscópicos que comprenden al filo Tardigrada que miden aproximadamente 50 μm a 1200 μm de longitud. Requieren del agua para permanecer en su estado activo, donde se alimentan y reproducen (Møbjerg *et al.* , 2018). Presentan simetría bilateral y cuatro pares de patas lobópodas. Así mismo, son animales segmentados y cuyo cuerpo está cubierto de un integumento altamente permeable, compuesto de quitina y una capa subyacente de epidermis que secreta la cutícula (Beltrán-Pardo *et al.* , 2013; Møbjerg *et al.* , 2018). Durante la deshidratación, se ha visto la alta permeabilidad del tegumento al reducir el volumen corporal en el ingreso al tonel en poco tiempo, de la misma forma que en la exposición a soluciones hipo e hiperosmóticas donde sufren cambios drásticos corporales (Møbjerg *et al.* , 2018).

Habitan en ambientes marinos, de agua dulce, ambientes terrestres y acuáticos efímeros (Gabriel *et al.* , 2007; Guidetti *et al.* , 2011; Rizzo *et al.* , 2010). Los tardígrados terrestres anidan comúnmente musgos, líquenes y hojarasca (Neuman, 2006; Rizzo *et al.* , 2010). En estos ambientes, se exponen a períodos de desecación que varían en frecuencia y longitud (Czernekova y Jönsson, 2016).

Su alimentación consiste en fluidos de plantas o de células animales pero por lo general, las especies semi-terrestres se alimentan de bacterias, microalgas y de otros pequeños invertebrados como rotíferos, nematodos y especies pequeñas de tardígrados (Brusca *et al.* , 2016).

Los tardígrados se dividen en dos grupos, eutardígrados y heterotardígrados. Los heterotardígrados a su vez, se subdividen en Echiniscoidea, que pueden habitar ecosistemas marinos hasta semiterrestres y Arthrotardigrada, que habitan en ambientes marinos. Mientras que los eutardígrados, se dividen en Apochela y

Parachela, estos son por lo general semiterrestres aunque también pueden encontrarse algunos ejemplares en ambientes marinos (Møbjerg *et al.* , 2018). Las principales diferencias en la clasificación entre eutardígrados y heterotardígrados comprenden diferencias en los apéndices de la cabeza, la naturaleza de las garras en los lobópodos telescópicos, la ausencia de los túbulos de Malphigian en heterotardígrados y la colocación de la apertura de la gónada en el recto (Brusca *et al.* , 2016; Møbjerg *et al.* , 2018). A pesar de eso, los tardígrados en general son característicos por su capacidad de resistir a temperaturas extremas que van desde los -272°C hasta los 150°C (Weronika y Łukasz, 2016). También se han encontrado ejemplares en el Ártico a la Antártida, en aguas marinas profundas (24.690 m en el Océano Índico) y en las laderas de las montañas más altas (Nelson, 2002a). De las especies encontradas en el suelo ártico, se conoce que pueden sobrevivir hasta seis años a -80°C . Además del rango de temperaturas también pueden resistir a alta y bajas presiones (280 hPa a 7 500 MPa), y en condiciones experimentales, resisten y sobreviven a altas dosis de radiación, químicos como el sulfuro de hidrógeno, dióxido de carbono y hasta diez minutos en etanol (Weronika y Łukasz, 2016).

Tienen una cavidad hemocélica que se encarga de la circulación y la respiración. Su reproducción puede ser sexual o por partenogénesis (Nelson, 2002b). En la cutícula recién mudada o exuvia, las hembras liberan de 3 a 5 huevos (Figura 1). Los embriones se desarrollan en el exuvia y eclosionan aproximadamente a los 4 días (Gabriel *et al.* , 2007). El phylum Tardigrada pertenece al taxón Panarthropoda, un clado de Ecdysozoa que se caracteriza por cambiar de muda conforme al crecimiento del organismo (Gabriel *et al.* , 2007; Nelson, 2002b).

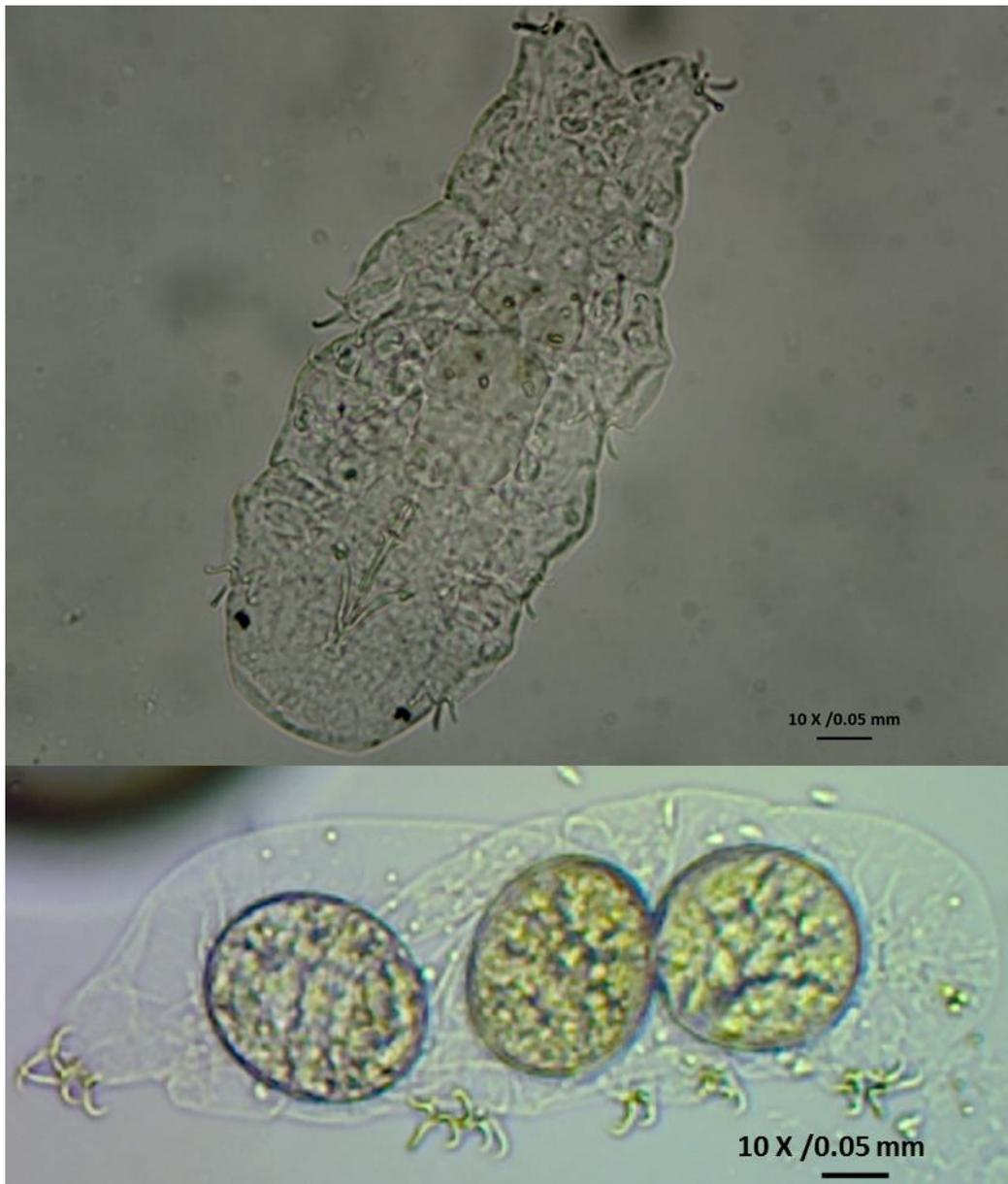


Figura 1. Hembra de *H. dujardini* y huevos depositados en la exuvia.

En términos de lo que se conoce sobre su ciclo de vida, existen más estudios en eutardígrados, específicamente, en especies partenogénicas que han sido cultivadas en laboratorio. Se estima que desde la eclosión a la muerte, los tardígrados viven de 3 a 30 meses y puede ser extendido por los estados de latencia

que lleguen a presentar (Nelson, 2002b). En general, el ciclo de vida no está determinado por etapas o estadios, consiste principalmente en el nacimiento por eclosión de los huevos depositados en la exuvia y por las mudas de cutícula que determinan el crecimiento y la madurez sexual, en donde los adultos partenogénicos depositan sus huevos en cada muda de cutícula (Altiero *et al.* , 2018) (Figura 2).

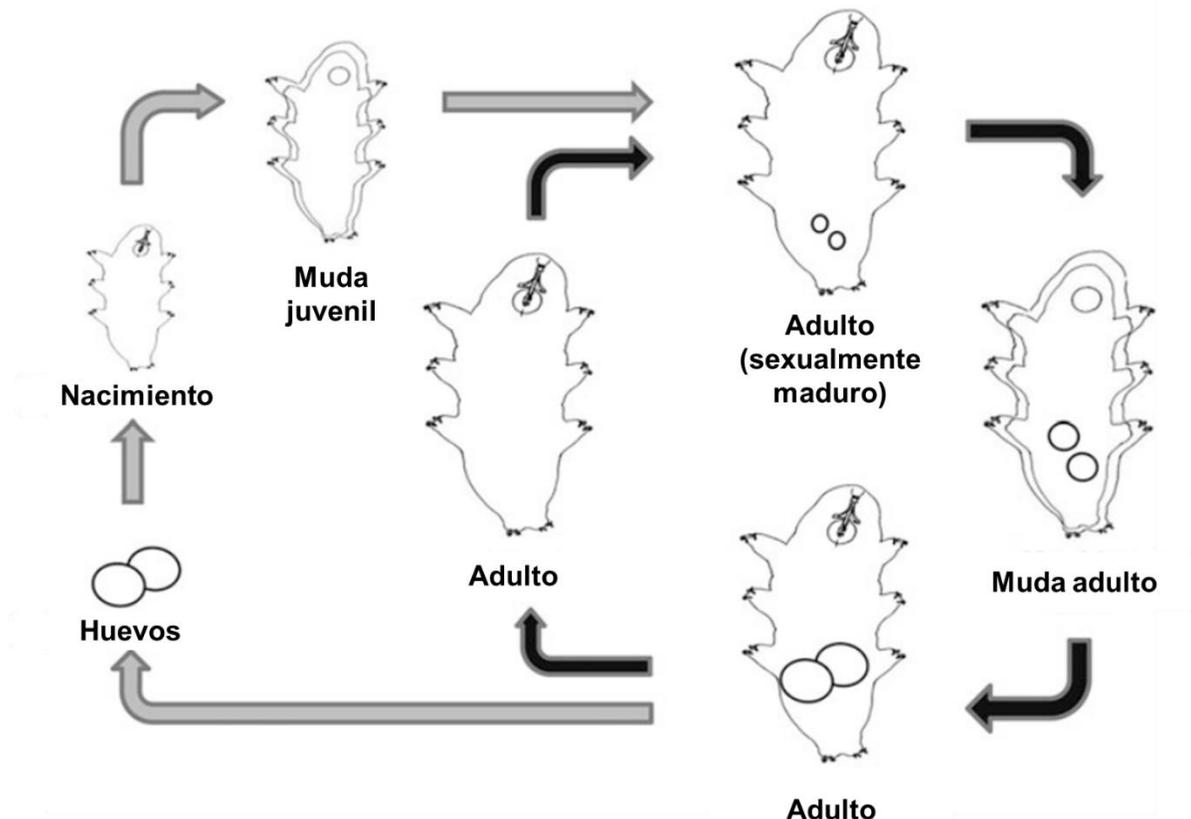


Figura 2. Etapas del ciclo de vida de los tardígrados. Los huevos de tardígrado son depositados en la exuvia, donde se desarrollan hasta su eclosión. Mediante la muda de la cutícula, los tardígrados crecen y maduran sexualmente hasta que son adultos. Las hembras que se reproducen por partenogénesis en condiciones de laboratorio, depositan sus huevos en la cutícula a mudar. Figura modificada de Altiero *et al.* 2018.

Los tardígrados presentan un sistema nervioso central que está conformado por un cerebro lobulado dorsal, un ganglio subesofágico y una cadena nerviosa ventral con

cuatro ganglios bilobados (Rizzo *et al.* , 2010). En cada lóbulo se proyectan ganglios lobopodales que a su vez, proyectan nervios específicos de patas (Gross y Mayer, 2015).

Los heterotardígrados son característicos por presentar estructuras organizadas denominadas cirrios y clavas, que son apéndices presentes en la cabeza y que contienen quimiorreceptores. En eutardígrados, estos órganos sensoriales cefálicos están reducidos y presentan regiones sensoriales compuestas de papilas y campos sensoriales orales y laterales. En *Macrobotus hufelandi*, hay evidencia de células sensoriales con características de quimiorreceptores y mecanorreceptores en campos sensoriales cefálicos. Adicionalmente, se ha visto la presencia de cilios en cirrios, clavas, campos y papilas sensoriales en eutardígrados, por lo que se propone que los cilios son característicos de los órganos sensoriales de tardígrados (Møbjerg *et al.* , 2018).

2.1.1 Criptobiosis

De la misma forma que ocurre en rotíferos, los tardígrados tienen la habilidad de ingresar en un estado ametabólico, denominado criptobiosis (Figura 3). Este estado involucra un cambio anatómico, bioquímico y fisiológico que es inducido por condiciones externas desfavorables para el organismo como el congelamiento (criobiosis), desecación (anhidrobiosis), bajos niveles de oxígeno (anoxibiosis) e incremento en la salinidad (osmobiosis) (Figura 4) (Nelson, 2002a). Durante este estado, no pueden crecer ni reproducirse y su capacidad de resistir a altas dosis de radiación iónica, desecación completa, pesticidas, al vacío del espacio y a la presencia de químicos, incrementa (Arakawa *et al.* , 2016; Beltrán *et al.* , 2013; Horikawa y Higashi, 2004; Clegg, 2001).

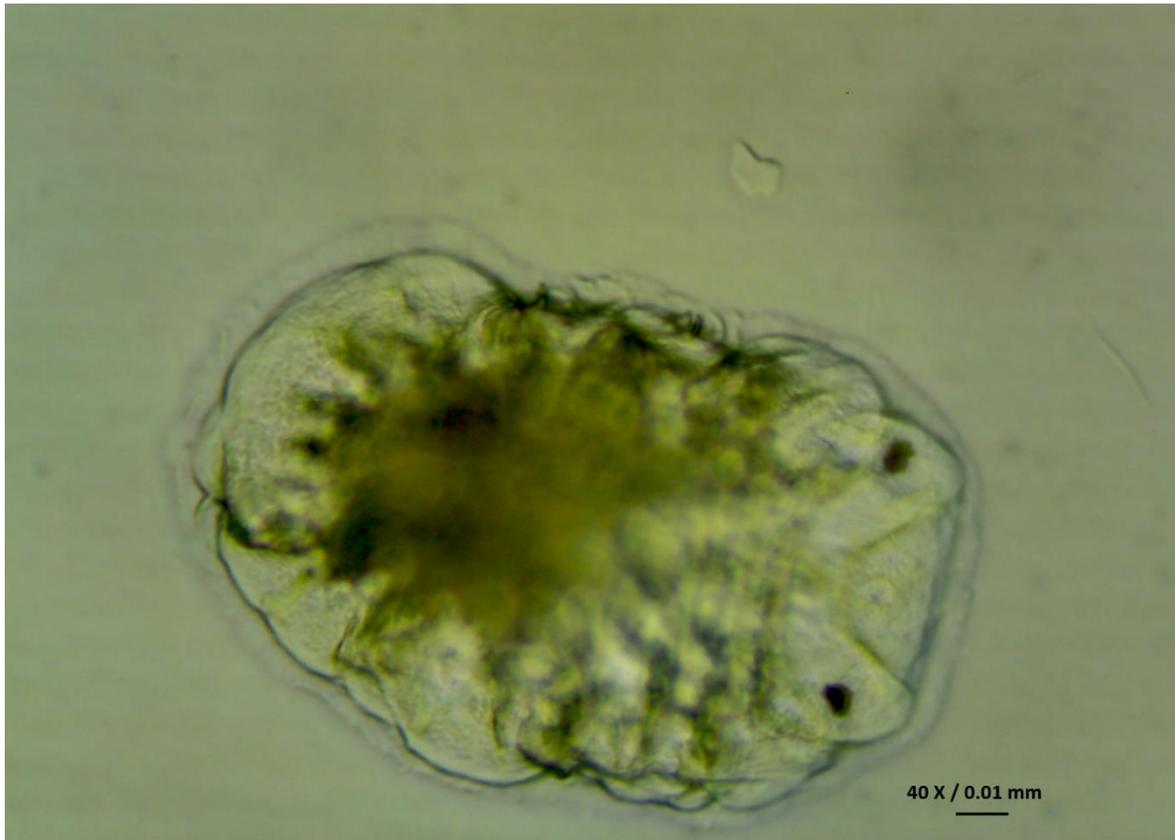


Figura 3. Tonel criptobiótico inducido por estrés hiperosmótico de *H. dujardini*.

Además de ese tipo de criptobiosis, existen otros tipos de latencia como el enquistamiento, que es aquella morfología asociada dada por la visualización de una cutícula compacta y otra externa recubriéndola (Figura 4). Se conoce que este estado es inducido por cambios endógenos y su inducción no depende de una señal ambiental para su finalización y la ciclomorfosis, que son aquellos cambios morfológicos estacionales dependientes de factores abióticos, presente solamente en tardígrados marinos (Bertolani *et al.* , 2004; Halberg *et al.* , 2009).

La formación del tonel implica la contracción del cuerpo de manera anterior – posterior para reducir la superficie y con ello, la evaporación de los fluidos

corporales durante la desecación. En un estudio con el eutardígrado *Richtersius coronifer*, se observó que uno de los órganos que sufren este reacomodo durante la anhidrobiosis, es el bulbo faríngeo. También se observó la presencia de una cutícula doble, donde la cutícula vieja se mantiene. Además, determinaron que la proporción de proteína es menor en comparación a las reservas lipídicas y de polisacáridos en las células de almacenamiento. Así mismo, la falta de vesículas lisas y recubiertas y el lumen más estrecho en el retículo endoplásmico rugoso refleja la inactividad metabólica durante la desecación (Czerneková *et al.* , 2017).

El tonel criptobiótico puede inducirse de forma recurrente y en cualquier etapa de su ciclo de vida, desde el huevo hasta el adulto (Czernekova y Jönsson, 2016).

Se conoce que en la inducción del tonel criptobiótico, comienzan a sintetizarse diversos bioprotectantes esenciales para evitar la desnaturalización, agregación, fusión y fragmentación de las biomoléculas durante el estrés al que esté siendo desafiado. Boothby y colaboradores (2017), registraron que, en la anhidrobiosis, para que la correcta síntesis de bioprotectantes se dé de manera adecuada, requiere de un tiempo de preacondicionamiento. Durante esta etapa, el organismo transcribe y traduce moléculas entre las que se encuentran las proteínas con un dominio intrínseco desordenado (PID). En especies que requieren de un preacondicionamiento extenso como *H. dujardini* y *P. richtersi*, las PID están sobre reguladas en la desecación mientras que aquellas especies como *Milnesium tardigradum*, no requieren de extensos tiempos prolongados de preacondicionamiento, las PID no responden a la desecación. La resistencia se atribuye a la vitrificación de las proteínas CAHS (proteínas citoplasmáticas abundantes y solubles en calor) durante la desecación al proteger a las biomoléculas al capturarlas dentro de poros en una matriz para protegerlas (Boothby *et al.* , 2017a). Otras proteínas importantes que son empleadas para la resistencia durante el tonel, son las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía o LEA por

sus siglas en inglés (Late Embryogenesis Abundant) las cuales se han asociado sobre todo a estrés hídrico. Estas previenen la agregación proteica formando una barrera física entre proteínas vecinas parcialmente desplegadas para evitar el contacto con otras proteínas.

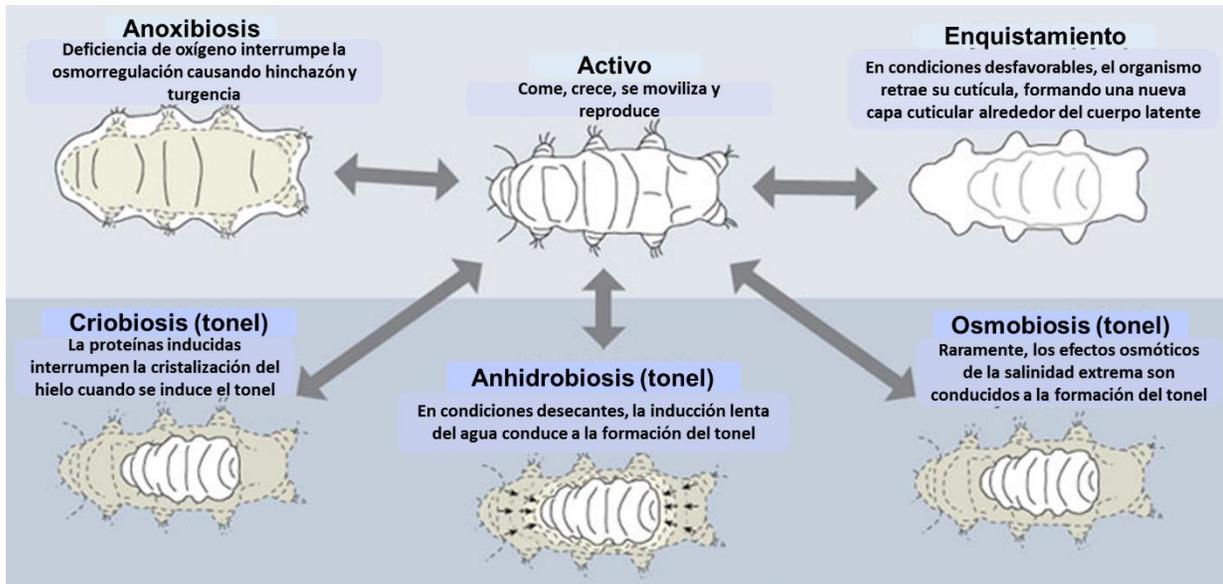


Figura 4. Latencia en tardígrados. Dependiendo el estímulo ambiental, los tardígrados pueden entrar en criptobiosis (Anoxibiosis, criobiosis, anhidrobiosis y osmobiosis). Si el estímulo es endógeno, los tardígrados ingresan en un estado de latencia denominado enquistamiento. La criptobiosis puede ser revertida cuando las condiciones ambientales son idóneas y el organismo vuelve a ser activo. Figura modificada de Tom Dunne (<https://www.americanscientist.org/article/tardigrades>).

2.2 Osmobiosis

Un estudio de Mobjerg *et al.* (2016), desafió a eutardígrados y heterotardígrados a condiciones hipertónicas con diferentes solutos, demostrando que la exposición gradual a NaCl favoreció la resistencia a esta solución. Así mismo, concluyeron que tardígrados limno-terrestres pueden sobrevivir a concentraciones elevadas de sal cuando sintetizan a tiempo las moléculas requeridas para proteger sus tejidos de

las perturbaciones de este choque osmótico. Así mismo, observaron que *Ramazzottius oberhaeuseri* ingresó en osmobiosis en respuesta al elevado contenido osmótico externo (Heidemann *et al.* , 2016).

2.2.1 *Hypsibius dujardini*

Hypsibius dujardini fue el primer modelo eutardígrado establecido con su genoma secuenciado. A pesar de ser un anhidrobionte débil, es un excelente modelo de estudio de comparación de respuestas fisiológicas así como de estudios de desarrollo embrionario (Gabriel *et al.* , 2007). Es de fácil manipulación y mantenimiento en laboratorio y presenta cortos tiempos generacionales que van de los 13 a 14 días (Boothby *et al.* , 2015). Además, las estructuras morfológicas embrionarias y adultas son fácilmente distinguidas debido a la transparencia de su cuerpo, lo que lo vuelve un organismo adecuado para estudios de biología del desarrollo y de viabilidad para los estudios genéticos mediante la tecnología del ARN interferente (Arakawa *et al.* , 2016). Actualmente se cuenta también con el genoma del eutardígrado *R. varieornatus* lo cual adiciona información comparativa entre estas dos especies de tardígrados.

2.3 Osmosensación y osmorregulación

La habilidad de detectar y responder ante diferentes estímulos ambientales, son claves para la supervivencia de los organismos (Garrity *et al.* , 2010; Montell, 2008). Por ello, los animales presentan una amplia variedad de sistemas sensoriales para luz, temperatura, tacto, saborizante, olor y dolor, aunado a la capacidad de codificar la información para cambiar comportamientos específicos con el fin de mantener su

homeostasis, regular la reproducción y el crecimiento (Filingeri, 2015). Específicamente, en cambios en la osmolaridad, muchos organismos son sensibles a la estimulación osmótica y son los canales iónicos quienes mide la tensión membranal (Darby *et al.* , 2016).

2.3.1 Osmosensación en mamíferos

La presión osmótica es percibida mediante la regulación por retroalimentación de neuronas en los órganos circunventriculares, como el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) y el órgano subfornical (OSF). Estas se proyectan a neuronas magnocelulares en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas neuronas son osmosensibles al excitarse por un estímulo hipertónico y sintetizan la hormona vasopresina o antidiurética (HAD) que es secretada a la sangre y que induce el comportamiento de beber (Bourque, 2008; Liedtke y Friedman, 2003). Las neuronas en el OVLT expresan a las proteínas TRPV1 y TRPV4. En células transfectadas, TRPV2 y TRPV4 forman canales catiónicos que pueden ser activados por hiposmolaridad. Ratones mutantes de TRPV1 han mostrado que esta proteína es necesaria para la inducción de la hipotonicidad inducida por la liberación de ATP en células uroteliales (Bourque, 2008). Mientras que TRPV4 *in vitro* es bloqueado por el estrés osmótico, y responde a estímulos hipotónicos. Así mismo, se determinó que TRPV4 forma parte de un complejo multimérico por el que puede estar anclado al citoesqueleto y que en mutantes de TRPV4, que carece de repeticiones de ankirina, responda aunque en menor manera en comparación con el control (Liedtke *et al.* , 2000).

En otro estudio, se determinó que TRPV4 actúa como un sensor osmótico por pequeños cambios en la presión osmótica en un modelo *in vivo* con ratones mutantes de esta proteína. Además, se observó que los mutantes segregaban menos HAD cuando estaban siendo desafiados con una solución hipertónica y

mostraron tener una regulación osmótica alterada. También, en conjunto con otro estudio, se determinó que TRPV4 rescató el fenotipo de nematodos mutantes para *osm-9*, proteína involucrada en la detección de ambientes hipertónicos. Por lo que sugieren que TRPV4 responde a estímulos hipertónicos y esta respuesta puede estar determinada por la composición lipídica de la membrana plasmática (Liedtke y Friedman, 2003) contrario a lo que se había reportado anteriormente.

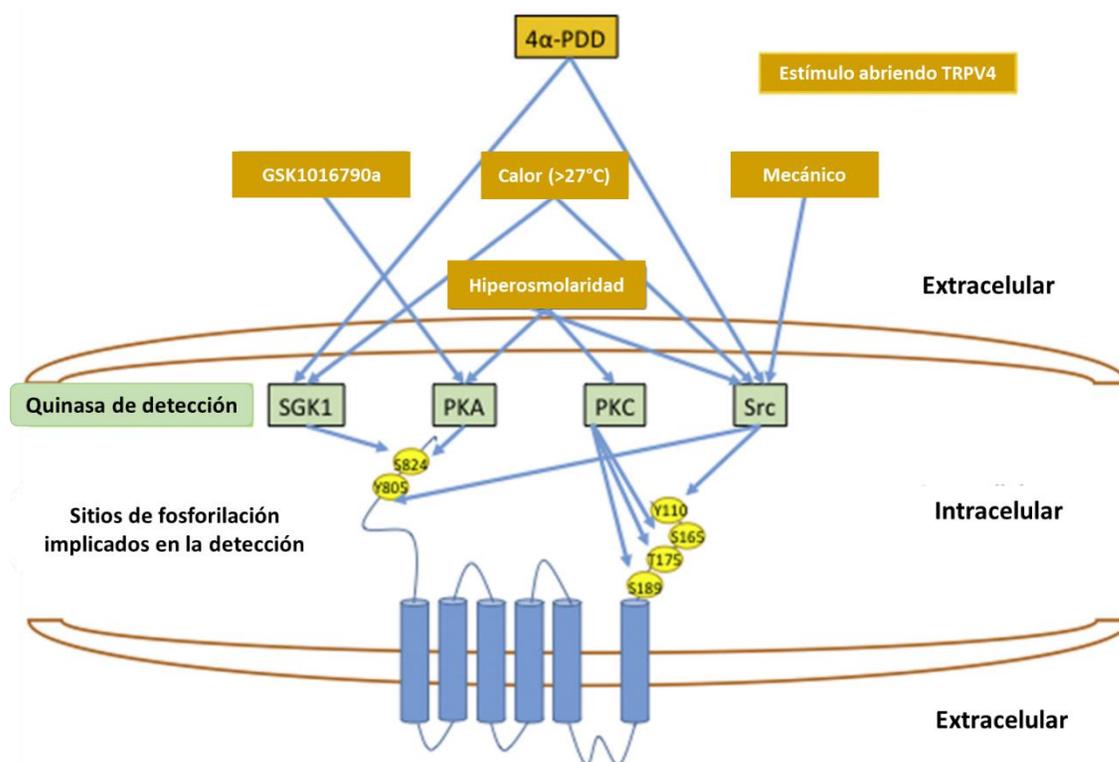


Figura 5. Diversos estímulos que activan al canal TRPV4 mediante proteínas Quinasas STK-1 (Quinasa-1 serina/treonina), PKA (proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico), PKC (Proteína quinasa C) y Src (proteínas de la familia Src). El canal TRPV4 está representado en color azul. Figura modificada de (Darby *et al.* , 2016).

En otros estudios con cultivos celulares, se demostró que diversas fosforilaciones en sitios claves en la región N y C-terminal, sensibilizan a las células que expresan al canal TRPV4 ante condiciones hipotónicas e hipertónicas. En particular, las

fosforilaciones mediante las proteínas PKC en serinas 162, 189, treonina 175 y la fosforilación de PKA en la serina 824 (Figura 5) (Darby *et al.* , 2016).

2.3.2 Osmosensación en levaduras

En otros organismos, como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los cambios en la osmolaridad ambiental son detectados por un sistema de dos componentes SLN1-YPD1-SSK1 y por los sensores SHO1, MSB y Sln1 (Solomon *et al.* , 2004). El sensor Sln1, localizado en la membrana plasmática, controla a la vía Sln1. Este sensor Sln1 es inactivado ante un choque hiperosmótico, desencadenando la vía Sln1 que activará a la proteína Hog1 para mantener a la célula preparada ante el estímulo hipertónico (Hohmann, 2009). La vía glicerol de alta osmolaridad (HOG, por sus siglas en inglés, High Osmolarity Glycerol), está relacionada con la vía de las Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés, Mitogen Activated Protein Kinase) que es la responsable de coordinar la adaptación ante el incremento de la osmolaridad en el medio para evitar la deshidratación celular. La proteína Hog1 es fosforilada inmediatamente tras el choque hiperosmótico por las fosfotirosina fosfatasas PtP2 y PtP3 y la fosfotreonina fosfatasa Ptc1. La activación de Hog1 conlleva a su importación al núcleo para incidir en genes blanco como Gdp1 y a la activación de moléculas blanco en el citoplasma necesarias para la osmoadaptación (Figura 6). Parte importante de esta vía, es el control de la acumulación del glicerol, que es fundamental para la osmorregulación y el balance redox. El glicerol reemplaza el agua y protege a las biomoléculas, además, aumenta el potencial hídrico intracelular. Por lo que, la acumulación de glicerol en la célula está mediada por la activación de esta vía (Hohmann, 2009). Los sensores de los cambios osmóticos están dados por las vías Sln1 y Sho1 que convergen en la proteína Pbs2, una MAPKK.

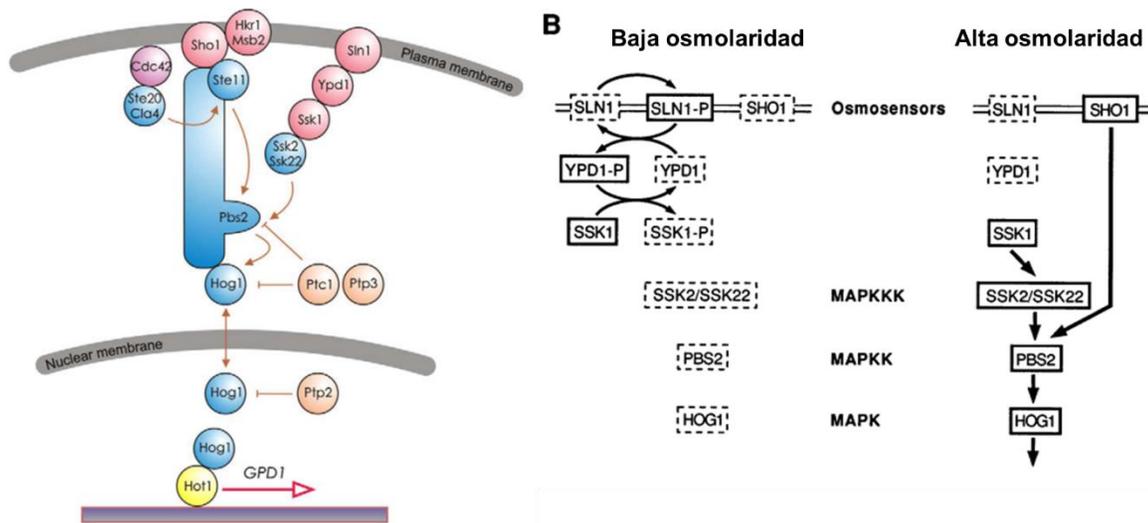


Figura 6. Ilustración de la vía Hog1 y la vía por medio de dos componentes principales en *Saccharomyces cerevisiae* que detectan los cambios en la osmolaridad ambiental. Figura modificada de (Hohmann, 2009; Posas *et al.* 1996).

2.3.3 Osmosensación en invertebrados

En *Caenorhabditis elegans*, la osmosensación depende de la función de los órganos osmosensoriales ámfidos y fásmidos y de las neuronas sensoriales ASH en la cabeza (Figura 7) (Chalfie, 2009). Estas neuronas al ser estimuladas, median el comportamiento de evasión al sentir un toque, una solución hipotónica y a los olores que repelen. En nematodos mutantes de *osm-9* y *ocr-2* hay una pérdida en la capacidad de toque de nariz, evasión de odorantes y específicamente, a ambientes hiperosmóticos. No obstante, al expresar TRPV4 en mutantes de *osm-9*, el fenotipo de toque de nariz y aversión a la hiperosmolaridad, se restauró, sugiriendo que las proteínas TRPV dirigen el comportamiento mecanosensorial y osmótico en las neuronas ASH (Liedtke *et al.*, 2003) comprobando su función ortóloga y la conservación de la función de manera filogenética. OSM-9 transduce las señales de

los diferentes estímulos y se expresa en neuronas ciliadas, mientras que OCR-2 es necesaria para su localización y función en la trasducción (Kim *et al.* , 2003).

Por otra parte, de acuerdo al estudio de Solomon *et al.* , (2004), la proteína OSR-1 integra respuestas de detección a ambientes hiperosmóticos y adapta respuestas que promueven la supervivencia en *C. elegans* mediante la ruta p38 MAPK. En un 50% de las mutantes de *osr-1*, los nematodos mantuvieron su volumen corporal y la motilidad, distinto a lo que se observa con el fenotipo de resistencia al choque hiperosmótico. A diferencia de las mutantes *osm-9*, no se ve alterada la función de las neuronas ASH y difieren también de la evasión osmótica defectuosa.

En el modelo de estudio, *Drosophila melanogaster*, está presente la proteína Nanchung (Nan) la cual que mantiene los dominios principales de la familia de los canales TRPV. Nan tiene un 37% de similitud a la proteína OCR-4 y en menor porcentaje con otras proteínas OCR y OSM-9 de *C. elegans* (Kim *et al.* , 2003). Aunque en otros estudios se determinó que Nan participa en la percepción de la humedad durante la higrosensación (Liu *et al.* , 2007), se ha observado que Nan participa en numerosas cascadas en respuesta a distintos estímulos como la audición, percepción de la temperatura y detección en cambios en la osmolaridad (Gong *et al.* , 2004; Liu *et al.* , 2007). Específicamente en cambios osmóticos, Kim y colaboradores (2003), sugirieron que células de ovario de hámster que expresaron NAN puede formar un canal catiónico que es activado por bajo condiciones hiposmolares. Así mismo, se determinó en embriones de *D. melanogaster* que esta proteína se expresa únicamente en órganos cordotonales (Figura 7). Adultos mutantes de Nan tuvieron defectos en la función del órgano cordotonal, además de tener movimientos descoordinados y una respuesta lenta en el comportamiento de escalamiento en comparación a adultos control. Sin embargo, Nan no actúa por sí sola. Para el comportamiento de higrosensación, interactúa con el canal *water witch*

mientras que para la audición y detección de cambios en la osmolaridad, interactúa con la proteína IAV así como para su colocación en neuronas cordotonaes.

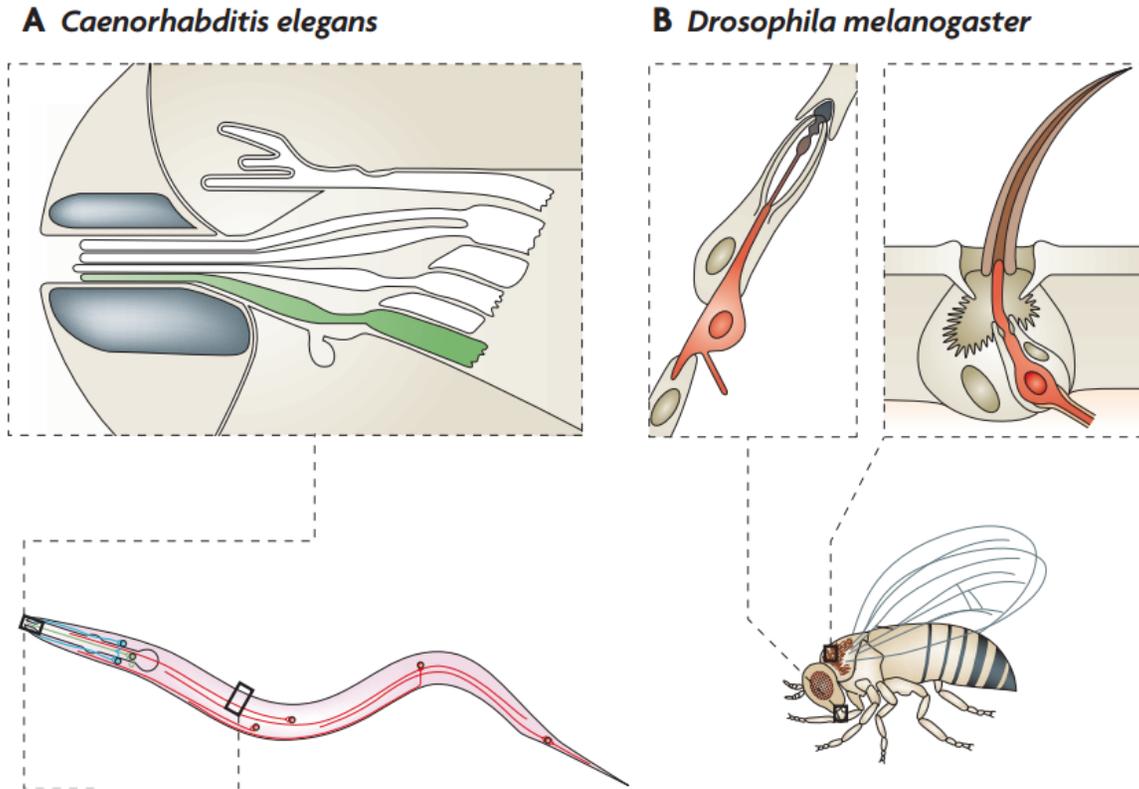


Figura 7. Representación de las células mecanoreceptoras de nemátodos y mosca de fruta. A) En *C. elegans*, las neuronas receptoras del toque y las neuronas ciliadas ASH en el ámfido de la “nariz” del nematodo están representadas en color rojo y verde, respectivamente. B) De lado izquierdo, se encuentra el órgano cordotonal y las neuronas sensoriales están representadas en rojo. Figura modificada de (Chalfie, 2009).

2.4 Desarrollo en el sistema nervioso de Panartrópodos

El taxón Panarthropoda, está conformado por tardígrados, onicóforos y artrópodos. Estudios recientes han apoyado la estrecha relación entre tardígrados y artrópodos, ya que ambos, tienen un patrón metamérico único que consiste en una cabeza y

cuatro segmentos en el que se incluyen las patas. Así mismo, se sugiere que la diferenciación segmentaria de éstos, se da por mecanismos de desarrollo compartidos (Smith y Jockusch, 2014). Otro patrón revelado del desarrollo del cerebro, apoya esta la hipótesis de que los tardígrados son un grupo cercano a artrópodos, ya que las estructuras de los ganglios segmentarios cerebrales y el par de cordones nerviosos, son estructuras homólogas (Figura 8) (Gross y Mayer, 2015). Además, estudios filogenéticos basados en la similitud del gen ribosomal 28S, apoya el parentesco Ecdysozoa (clado en el que se encuentran los tardígrados y onicóforos) con artrópodos (Mallatt *et al.* , 2004).

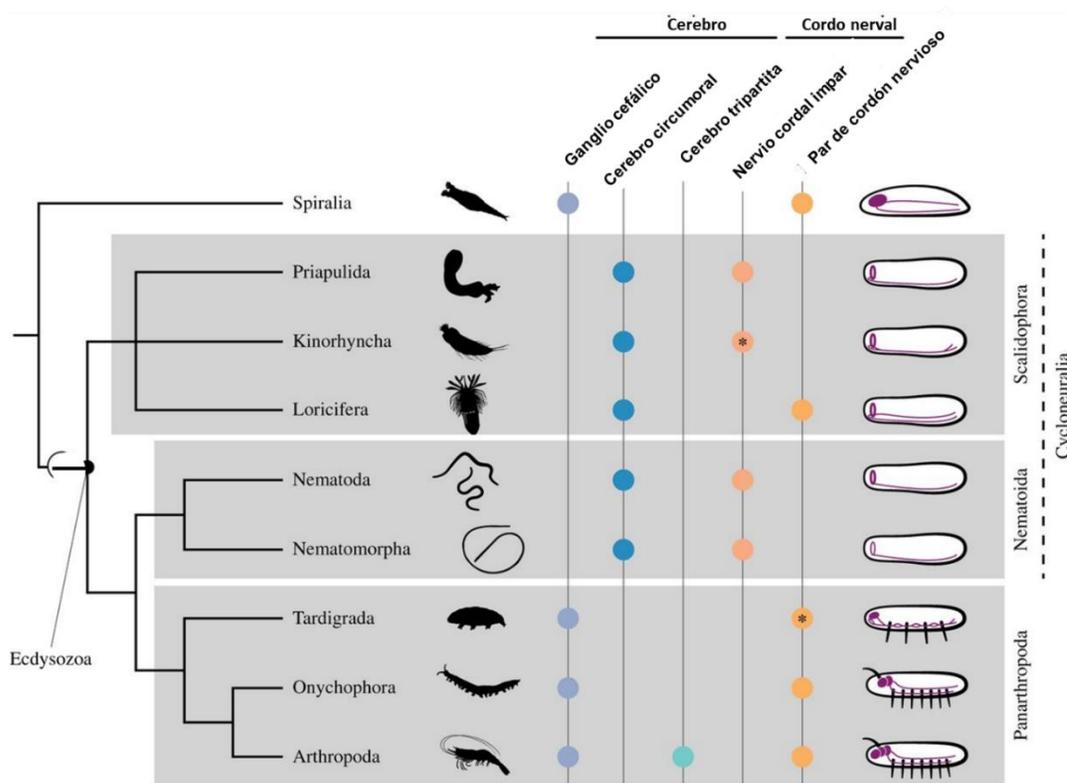


Figura 8. Desarrollo del sistema nervioso del clado Ecdysozoa. Distribución anatómica de las características del sistema nervioso central del clado Ecdysozoa en el que integra las características semejantes por grupos cercanos. Figura modificada de Martín-Durán *et al.* , (2015).

Por ello, de acuerdo al marcado parentesco a nivel de las principales estructuras del sistema nervioso entre tardígrados y artrópodos y al no existir información acerca de los mecanismos de detección de los cambios osmóticos en el ambiente en tardígrados, se empleó como modelo de estudio a *H. dujardini*, y se exploró con base en la disponibilidad de su genoma, si se encuentra presente una proteína ortóloga a NAN que esté implicada en la detección de cambios osmóticos y si de la función de esta proteína depende que los tardígrados adultos ingresen en el tonel criptobiótico inducido por hiperosmolaridad.

3. HIPÓTESIS

El canal TRP ortólogo a NANCHUNG detecta cambios en la osmolaridad y permite el ingreso al estado de tonel en *Hypsibius dujardini*.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la función fenotípica del canal ortólogo TRP *nanchung* durante la osmobiosis en el tardígrado *Hypsibius dujardini*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia del canal ortólogo a *nanchung* en *Hypsibius dujardini*.
2. Establecer la función del canal TRP en el comportamiento de osmobiosis y su morfología asociada en tardígrados de tipo silvestre y silenciados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Análisis bioinformático

Con base en las secuencia proteica del canal TRP *nanchung* de *Drosophila melanogaster* (NP_001261833.1 y NP_648696.2), se realizó un alineamiento por homología en el genoma de *Hypsibius dujardini* (Acceso: MTYJ01000000) empleando la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se seleccionaron las secuencias con más del 27% de identidad. Las secuencias fueron alineadas en el programa MUSCLE de MEGA 7.0.26. Se generó un análisis filogenético con el software de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP 4.0a y mediante una búsqueda heurística: se corrieron 1, 000, 000 de réplicas a través de una adición secuencial. Se determinó el árbol consenso estricto y se determinaron los valores de soporte (10,000 réplicas) reteniendo los grupos que presentaban una frecuencia superior al 50%. Para explorar los principales dominios de acción de las proteínas, se utilizó el programa InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). La probabilidad de sitios predictivos serina, treonina y tirosina se realizó con el software NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>).

6.2 Cultivo y mantenimiento de tardígrados

Los tardígrados fueron obtenidos del centro Carolina Biological Supply Company, Burlington, Carolina del Norte (etiqueta: 13-3960). De acuerdo al protocolo modificado por (McNuff, 2007), los tardígrados se mantuvieron en agua de manantial a temperatura ambiente en un periodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Como fuente de alimento se adicionó concentrado de microalgas del género *Chlorella sp*, las cuales se mantuvieron en agua destilada estéril adicionada con 3 esferas de fertilizante oscuro y transparente en fotoperiodos de luz: oscuridad

12:12 a temperatura ambiente. Para la observación de los cultivos de tardígrados, cada semana se tomaron 5 ml de cultivo Chalkley y se observaron en un microscopio estereoscópico de disección.

6.3 Extracción de ARN y preparación de ADN complementario

La extracción de ARN se realizó empleando el protocolo modificado de (Boothby *et al.* , 2017b). Se emplearon 200 tardígrados resuspendidos en 100 µl de TRIzol en un tubo de centrifuga de 1.5 ml. Los tubos con la muestra se sumergieron en nitrógeno líquido y se maceraron con un pistilo plástico. El proceso se repitió cinco veces. Después, el pistilo se lavó con 100 µl de Trizol en el tubo con la muestra macerada. Se agregó 100 µl de cloroformo y se homogenizó por 20 segundos suavemente. La muestra se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos y fue centrifugada a 10,000 rpm por 18 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo de centrifuga. Se agregó un volumen de etanol absoluto y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Finalmente, se agregó 35 µl de agua grado biología molecular para resuspender la pastilla. El ARN se almacenó a -80°C. La concentración y calidad del ARN se cuantificó por espectrofotometría de luz UV midiendo la absorbancia en una relación 260 y 280 nm en un NanoDrop modelo 2000c marca Thermo Scientific. La síntesis de la cadena complementaria se realizó con Random Hexamers (Invitrogen) como primer y con el kit SuperScript II® Reverse Transcriptase (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del cDNA se cuantificó por espectrofotometría de luz UV NanoDrop modelo 2000c marca Thermo Scientific (Tenlen *et al.* , 2013).

6.4 Extracción de ADN

Para liberar la cutícula, se colocaron diez y cien tardígrados, por separado, resuspendidos con el mínimo de agua en tubos de centrifuga de 1.5 ml. Los tubos

fueron sumergidos en nitrógeno líquido, se removieron y se aplastó el contenido con un pistilo de plástico. La sumersión con nitrógeno líquido y el aplastamiento se repitió por cuatro veces para destruir la cutícula de los tardígrados. Posteriormente, la extracción y purificación del ADN genómico se realizó con el protocolo para insectos sugerido en el kit DNAeasy Blood and Tissue (QIAGEN). Al final de la purificación, el ADN se eluyó dos veces con el buffer AE. Se cuantificó la concentración y calidad del ADN en el espectrofotómetro de luz UV y se corroboró la integridad en un gel de agarosa al 1%.

6.5 Amplificación del marcador citocromo oxidasa I (COI)

Se utilizaron los oligonucleótidos propuestos por Folmer *et al.* (1994) para obtener un fragmento de 658 pb a partir de ADN genómico. Se emplearon las siguientes condiciones en un termociclador BIORAD: un primer ciclo a 95°C por 3 minutos, seguidos de un bloque a 35 veces de 94°C por 30 segundos, después de 46.9°C por 40 segundos y otra de 72°C por un minuto. Finalmente, un paso de extensión a 72°C por diez minutos. Se corroboró el amplicón de 658 pb en un gel de agarosa al 1%. Las muestras se enviaron a secuenciar a MacroGen Korea.

6.6 Amplificación y clonación de la secuencia ortóloga a nanchung en *H. dujardini*

Se diseñaron cebadores específicos en ambos sentidos para el canal TRP γ de *H. exemplaris* (Cuadro 1). Las condiciones de amplificación para el canal TRP γ fueron de un primer ciclo a 94°C por tres minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, un gradiente de 68°C a 58°C por 40 segundos, 72°C por un minuto y un tiempo de extensión a 72°C por diez minutos. Se estandarizó la temperatura de alineamiento a 58°C por 35 ciclos para los primers de TRP γ y 57.6° para beta tubulina. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR 4-TOPO vector (Invitrogen K4575-01) (Figura 9), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se transformaron colonias bacterianas de *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen) con el vector. Se realizó un PCR

de colonia con los cebadores del canal para corroborar la inserción del fragmento en cada colonia seleccionada. Las colonias fueron crecidas en medio Luria-Bertani suplementado con ampicilina como marcador de selección (100 mg/ml) por 18 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Se extrajo el ADN de plásmido utilizando el método por lisis alcalina SDS. El ADN fue resuspendido en agua libre de nucleasas y almacenado a -20°C. Así mismo, para corroborar la identidad del producto insertado, los plásmidos fueron secuenciados en MacroGen Korea.

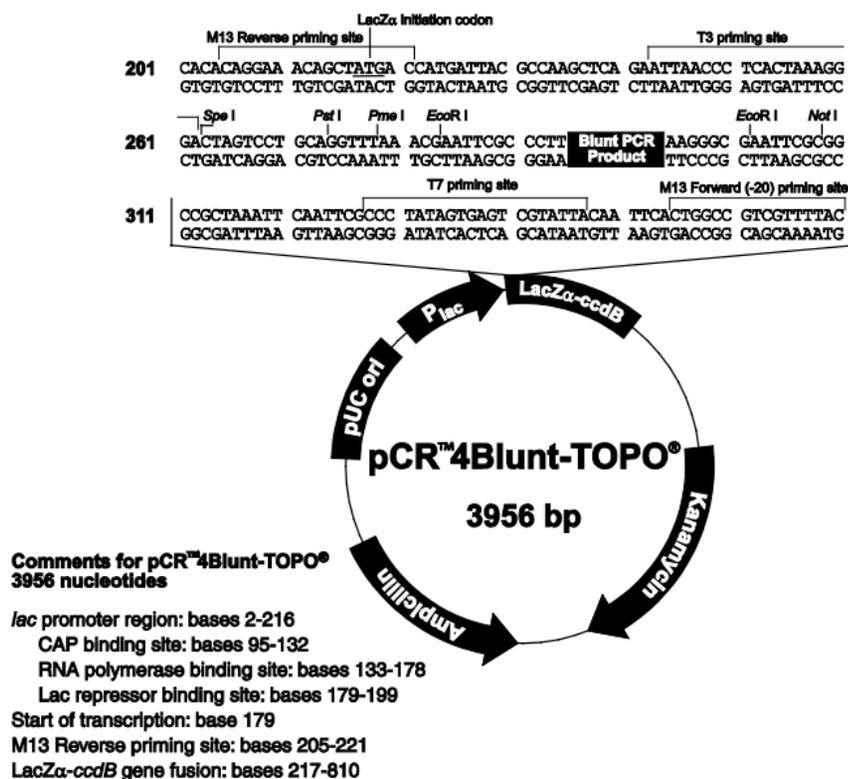


Figura 9. Mapa del plásmido PCR4 blunt-TOPO TA Cloning de Invitrogen.

6.7 Silenciamiento génico por ARN de interferencia

A partir del ADN de plásmido, se alineó el ADN molde con una amplificación PCR con cebadores etiquetados con el promotor mínimo de la ARN polimerasa T7 en el extremo 5' de cada primer y se hizo la amplificación bajo las siguientes condiciones: 95°C por tres minutos, 35 ciclos a 94°C por un minuto, 57.6°C por 40 segundos, 72°C por un minuto y 72°C por diez minutos. El producto se corroboró el fragmento en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1.2 µl). Con base en el producto amplificado y asegurando que el amplicón tuviera una concentración cercana a 1 µg/µl, se realizó la transcripción *in vitro*, alineamiento y el tratamiento con nucleasas del fragmento del canal TRPγ con el kit MEGAscript® RNAi (Thermo Fisher). Para la transcripción, se incubó 16 horas a 37°C. La purificación del ARN de doble cadena se realizó con el protocolo de D. Zamore y Li (2012) donde, después del tratamiento con nucleasas se separó la fase acuosa y orgánica de la reacción, con un volumen de fenol:cloroformo (1:1, v/v) y se precipitó el ARNcd con 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5.2) y 2.5 volúmenes de etanol. El ARNcd se resuspendió la pastilla en agua libre de nucleasas y se cuantificó por espectrometría de luz UV y se analizó en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. El ARNdc se almacenó a -20°C.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por reacción de la polimerasa de los genes COI, TRP γ , beta tubulina, actina y adición del promotor de la ARN polimerasa T7 para las mismas secuencias blanco.

Nombre	Secuencia	Tamaño	Fuente
HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	658	Folmer <i>et al.</i> 1994
LC01490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	658	Folmer <i>et al.</i> 1994
TRPPF	TGCAGATCTCACTCGGTCTG	431	Este estudio
TRPPR	AGCGAACTTCCACTCGCTG	431	Este estudio
btubF	CCAAGTGAACGCCGATCTCCGCAAG	535	Tenlen <i>et al.</i> 2013
btubR	GGTACTCCGAGATGAGATCG	535	Tenlen <i>et al.</i> 2013
FiTg	TAATACGACTCACTATAGGGAGATGCAGATCTCACTCGGTCTG	465	Este estudio
RiTg	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGAACTTCCACTCGCTG	465	Este estudio
Fibt	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAACTGAACGCCGATCTCCGCAAG	569	Este estudio
Ribt	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGTACTCCGAGATGAGATCG	569	Este estudio
Hd-act-1 (Fact)	GTTTCGCGTAATCCCTCAGAAC	640	Tenlen <i>et al.</i> 2013
Hd-act-1 (Ract)	AGCGTTGTGACGAAGCTGTA	640	Tenlen <i>et al.</i> 2013
FacT7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTCGCGTAATCCCTCAGAAC	744	Este estudio
RacT7	TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGCGTTGTGACGAAGCTGTA	744	Este estudio

6.8 Microinyección

El diámetro de la punta de los capilares de vidrio con filamento (GD-1.2, NARISHIGE) que se adaptaron a los tardígrados, fue generado con el Puller PC-10 (NARISHIGE) con dos programas a 65°C y a 96°C y dos bloques de carga. La punta del capilar fue cortada con tijeras estériles y se sumergió en rojo fenol (1:100) y en el dcARN (de , por sus siglas en inglés double strain, cadena doble) de TRP γ . El capilar fue montado en un micromanipulador PC-100 (NARISHIGE) adaptado en un microscopio invertido (TRITECH, Research).

Para asegurar si la microinyección no es un procedimiento letal para los organismos, se inyectó una solución de fenol rojo diluido a 1:100 en agua de manantial para observar la internalización del contenido en la gónada o intestino del organismo y

su letalidad. Para anestesiar a los animales, se agregó levamisol (Sigma-Aldrich) disuelto en el agua de manantial a una concentración final de 5 mM. Los tardígrados se colocaron de manera vertical en contraposición de un cubreobjetos y mediante presión del capilar con la solución a inyectar y nitrógeno, se transfirió el ARNi (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en el tardígrado. Por hinchazón en la gónada o en el intestino, se corroboró la microinyección. Los tardígrados inyectados se transfirieron a una placa de petri con agua de manantial y alimento a temperatura ambiente hasta su recuperación por 24 horas. Después del tiempo de recuperación, los individuos inyectados fueron sometidos a un ensayo de estrés hiperosmótico con NaCl a 0.1 M para evaluar su respuesta.

6.9 Tratamiento con bloqueadores del canal TRP γ

Se emplearon los fármacos inhibidores del canal TRP γ descritos para *D. melanogaster* y *P. americana*, 8-Bromoadenosine 3',5'-monofosfato cíclico (8-br-cAMP) a una concentración de 20 nM y 2-Aminoetoxidifenil borato (2-APB) a una concentración final de 1 μM . Se expusieron seis grupos de doce individuos adultos por 5 horas a temperatura ambiente. Como control, se expusieron individuos al vehículo (DMSO 0.001%). Después del tiempo de exposición, los individuos fueron desafiados a un ensayo de hiperosmolaridad para evaluar su respuesta.

6.10 Inducción de tonel criptobiótico mediante estrés salino

Grupos de diez individuos fueron sometidos a diferentes concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). De manera inicial, se empleó 0.1 M, 0.2 M, 0.25 M, 0.3 M y 0.5 M y se cuantificó el número de individuos que lograron ingresar al tonel criptobiótico a diferentes tiempos (15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min y 300 min). Posteriormente, se seleccionó la molaridad que indujo el tonel criptobiótico y se continuó la búsqueda de la concentración exacta mínima para el ensayo de osmolaridad con las concentraciones 0.05 M, 0.06 M, 0.07 M, 0.08 M, 0.09 M, 0.1

M, 0.2 M, por 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 120 min y 180 min. En este trabajo se consideró tonel criptobiótico cuando el organismo presentó contracción parcial o total de los lobópodos.

6.11 Ensayo de hiperosmolaridad

Por triplicado, doce tardígrados fueron transferidos a placas de Petri (35 mm) con 3 ml agua de manantial y sin alimento por 24 horas. Después del ayuno, los tardígrados fueron transferidos a placas con solución de NaCl 0.1 M y se observó por dos horas el cambio en la morfología de los individuos. Se registró el número de individuos capaces de ingresar al tonel así como de aquellos que no lograron ingresar.

6.12 Pruebas estadísticas

Las pruebas se analizaron en el software R Studio 3. 4. 0. Se realizó una pruebas de normalidad de Shapiro para determinar si lo datos tenían una distribución paramétrica o no paramétrica. Posteriormente, para los datos normales se hizo una prueba de homocedasticidad de Levene y posteriormente, pruebas de hipótesis para muestras independientes con una prueba de t student de dos colas para un nivel de significancia menor a 0.05. Para datos no paramétricos, se hizo una prueba de rangos con signo de Wilcoxon bajo la hipótesis nula de que la distribución de los grupos a analizar (individuos que ingresaron al tonel contra los que no lograron ingresar al tonel) son iguales con un nivel de significancia menor a 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de *Hypsibius*

Con los oligonucleótidos de Folmer *et al.* (1994), se obtuvo un producto de 658 pb (Figura 10). Debido a la poca intensidad de los productos revelados en el gel de agarosa 1%, se hizo un PCR anidado para incrementar la concentración y la intensidad del amplicón revelado en el gel. Los productos se secuenciaron en ambas direcciones en Macrogen Korea y los resultados del electroferograma se visualizaron con BioEdit 7.2.6. La edición de la secuencia se hizo con base en la calidad de las lecturas para cada nucleótido y se eliminaron los extremos de la secuencia resultante. Se hizo un alineamiento en la base de datos de NCBI y se determinó el género *Hypsibius*. Para determinar la especie de la cepa con la que se realizaron los experimentos, se utilizaron como secuencias de referencia a *H. convergens* (No. Acceso FJ435798), *H. dujardini* (No. Acceso MG818723), *H. exemplaris* (No. Acceso MG818724), *H. klebelsbergi* (No. Acceso KT901831), *Borealibius zetlandicus* (No. Acceso FJ184601), *Montacuta spitzbergensis* (No. Acceso KX347535) empleadas en el estudio de Gąsiorek *et al.*, (2018).



Figura 10. Amplicón del gen citocromo oxidasa I (COI) de *Hypsibius dujardini* en un gel de agarosa 1%. Se empleó el método directo de amplificación por PCR punto final con ADN y el PCR anidado con la finalidad de incrementar la concentración del producto.

De acuerdo al árbol consenso del análisis mediante el método heurístico, se agruparon las secuencias de COI de *H. dujardini* y *H. convergens* en un mismo grupo mientras que las secuencias correspondientes a COI de la cepa de estudio, se agruparon con *H. exemplaris* (Figura 11). Lo cual difiere de la especie registrada del centro de Carolina Biological Supply. Por lo que a partir de este hallazgo, se empleará *H. exemplaris* en lugar de *H. dujardini* a excepción de cuando se haga referencia al genoma base del estudio.

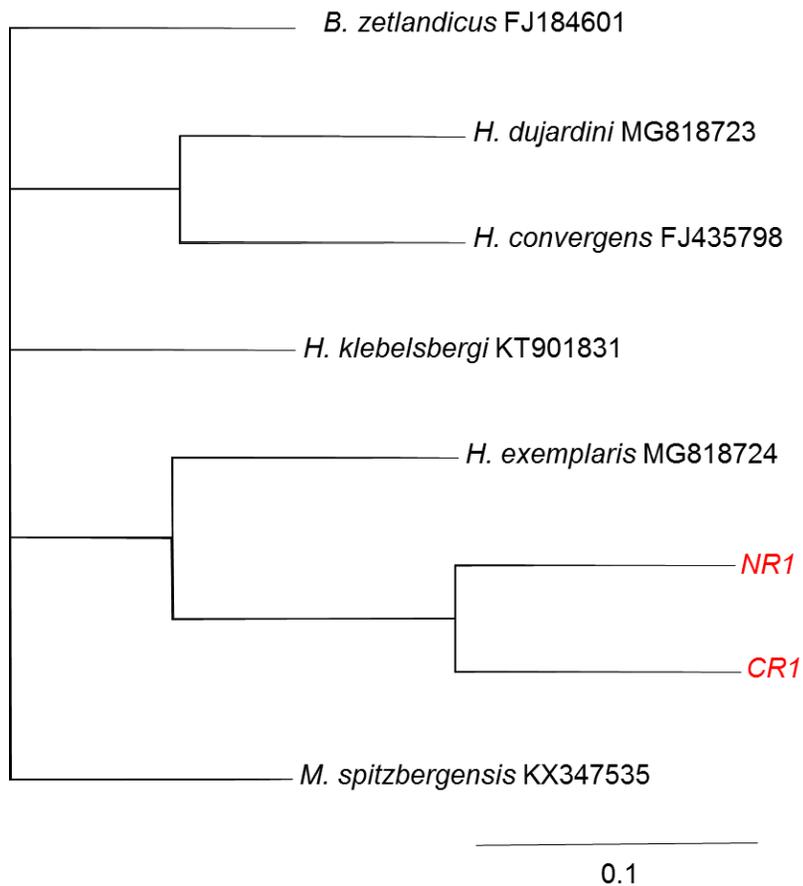


Figura 11. Cladograma de las secuencias de citocromo oxidasa I (COI) de la familia *Hypsibiidae* y de las muestras de la cepa de trabajo. Método búsqueda heurística por Máxima parsimonia. 100 =

valor de Boostrab, el cual indica la probabilidad de que las secuencias agrupadas pertenezcan al mismo clado. La secuencia M_spitsbergensis_KX347535 fungió como secuencia externa. NR1 y CR1 corresponden a las secuencias de la cepa de trabajo.

7.2 Identificación de la proteína ortóloga de *nanchung* (NAN) de *Drosophila melanogaster* en el genoma de *Hypsibius dujardini*.

Se realizó una búsqueda de secuencias similares con el algoritmo de alineamiento de Altschul *et al.*, (1990), mediante la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST, por sus siglas en inglés) empleando la secuencia de aminoácidos del canal Nan de *Drosophila melanogaster* en el genoma del tardígrado *Hypsibius dujardini*. Se obtuvieron un total de 16 proteínas resultantes, de las cuales, se consideraron para este estudio aquellas que tenían más del 27% de identidad y un valor máximo superior de 39. Las secuencias resultantes fueron alineadas en el genoma de *D. melanogaster* con la finalidad de corroborar que corresponden a la misma familia de proteínas. Así mismo, las secuencias se agruparon en distintos clados empleando el Método de búsqueda heurística por Máxima parsimonia. Como se observa en la Figura 12, las secuencias se agruparon en siete clados distintos, el primero corresponde a la proteína TRP-V4 la cual fue utilizado como el grupo externo, seguido de ankirina 2, TRP-A, mecanoreceptores tipo C, Ankirina tipo 3, secuencias tipo ankirina 3 y tipo L-asparaginasa, TRP-gamma y uno grupo donde se agrupan las dos isoformas de Nanchung y sus ortólogos en nemátodos, OCR 1 a 4. De las secuencias empleadas de *H. exemplaris* para el análisis, se seleccionó al clado próximo al que contiene a la proteína Nanchung, el cual fue el clado agrupado con la proteína TRP gamma.

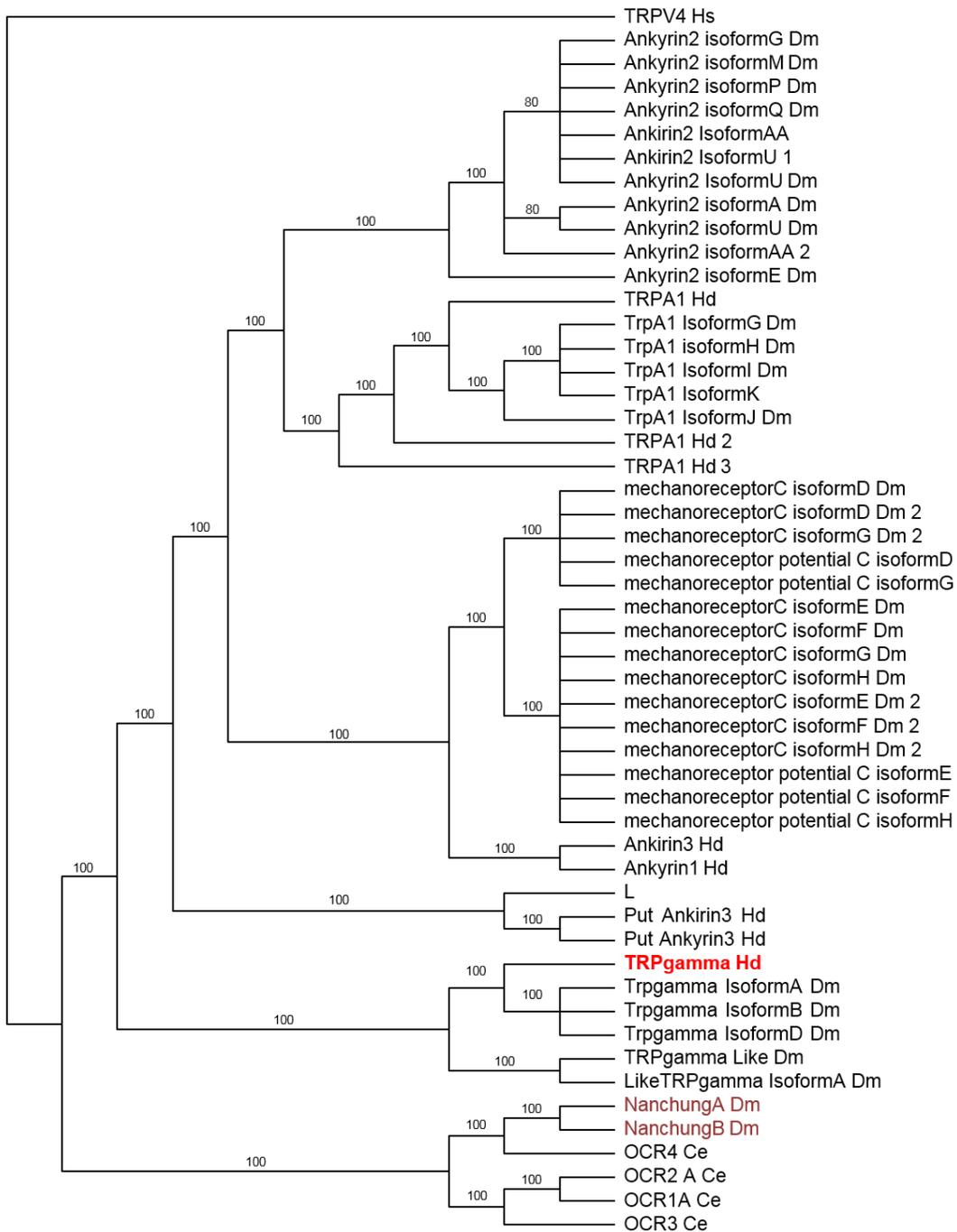


Figura 12. Cladograma de la secuencias proteicas resultantes de nan en el genoma de *Hypsibius dujardini*. Método búsqueda heurística por Máxima parsimonia. 100 = valor de Boostrab. Probabilidad de acuerdo a dicho valor de que las secuencias agrupadas pertenezcan al mismo clado. En rojo se

representa la secuencia ortóloga de *H. exemplaris* seleccionada y en café se marcan las dos isoformas de nan. Hs: *Homo sapiens*, Dm: *Drosophila melanogaster*, Hd: *Hypsibius dujardini* (ahora referida como *H. exemplaris*), Ce: *Caenorhabditis elegans*.

Con base en la secuencia TRP gamma Hd (OWA53372.1), se hizo un análisis exploratorio de los principales dominios de acción de la proteína y se compararon con los descritos para nanchung de acuerdo a la base de datos InterPRO (EMBL-EBI) (Figura 13). La secuencia de TRP gamma (TRP γ), en comparación a NANCHUNG, es más grande en cuanto a longitud de aminoácidos. Al clasificar sus principales dominios, se observó que contienen el dominio de la superfamilia TRP, sin embargo tiene un dominio extra denominado DUF1509 que no se encuentra en NANCHUNG. Este dominio DUF1509, forma parte de la familia (Domain unknown function; por sus siglas en inglés) que como lo indica su nombre, se desconoce su función. Así mismo, comprende del aminoácido 962 al 1109. Sin embargo, comparte cinco dominios principales de acción como las repeticiones de ankirina y el dominio de transporte iónico. También, presenta un dominio adicional del receptor potencial transitorio de iones el cual no se encuentra presente en NAN.

A) TRP γ



B) NANCHUNG

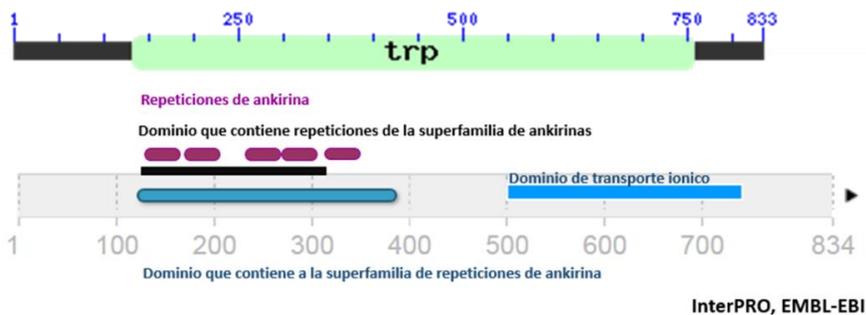


Figura 13. Análisis de principales dominios de acción de TRP γ y NAN. NANCHUNG es una proteína de 834 aminoácidos que contiene cinco principales dominios representados en diferentes colores. En contraste, TRP gamma es una proteína más grande con 1118 aminoácidos.

Otro dominio que presenta TRP γ en *H. exemplaris* y que está ausente en Nan, es el dominio de receptor de potencial transitorio de iones, indicado en color morado en la Figura 13. Este dominio es característico de proteínas TRPC. Mientras que en proteínas de la familia TRPV, como Nan, este dominio está ausente. Por lo que con base en los dominios típicos, TRP γ pertenece a una familia diferente a la que se especulaba. Por lo que, se obtuvieron las secuencias de TRP γ de dos organismos filogenéticamente emparentados, *D. melanogaster* y *Periplaneta americana*. Se hizo un alineamiento de la secuencia de aminoácidos y de acuerdo a la identificación de residuos y dominios de Wicher *et al.* 2006, se identificaron las repeticiones de ankirina, los seis segmentos transmembranales y el dominio de bobina en espiral

(Figura 14). Con ello, se confirma que TRPγ de *H. exemplaris* es una proteína estructuralmente diferente a Nan.



Figura 14. Alineamiento de la secuencia TRPγ de *H. exemplaris* (hTRPγ), *Periplaneta americana* (pTRPγ) y *D. melanogaster* (dTRPγ) basado en el alineamiento de (Wicher *et al.* , 2006). Las repeticiones tipo Ankirina están subrayadas y en negritas, el dominio de bobina en espiral (coiled-coil) se encuentra subrayado en color gris, las regiones transmembranales están subrayadas en color rojo y presentan el símbolo “•”. Los sitios subrayados en amarillo representan sitios serina, en negritas y naranja, los sitios treonina, en negritas y azul se muestran los sitios tirosina.

7.3 Generación de ARNi del canal TRP γ

Se diseñaron oligonucleótidos que amplifican un producto de 439 pb del gen TRP γ . Que en la proteína, corresponde al dominio de transporte iónico que abarca de la posición 587 hasta 619 de la secuencia de aminoácidos de TRP γ (OWA53372.1). Se extrajo el ARN total de 200 individuos adultos que previamente se encontraban ayuno de 24 horas. La cantidad de individuos y el método de liberación de componentes celulares con aplastamiento con nitrógeno líquido y trizol descrito por Goldstein *et al.* (2017) en conjunto con la purificación realizada con el protocolo de Tenlen *et al.* (2013), fueron los adecuados para una mayor concentración y pureza de la muestra (Cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración y pureza de extracciones de ARN total empleando diferentes protocolos de extracción y purificación. La extracción Hd y II se realizaron con 100 individuos. Las demás extracciones se realizaron con 200 individuos.

Nombre de la muestra	Concentración ng/ μ l	260/280	260/230	Protocolo
Hd	23.5	1.88	1.1	Boobthy <i>et al.</i> 2017 con N2 y pistilo
II	10.8	1.83	0.81	Tenlen <i>et al.</i> , 2013 con esferas de vidrio
Alpha	1402.7	1.8	1.06	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Direct-zol RNA miniprep
ARN I	1187.6	1.76	0.51	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Tenlen <i>et al.</i> 2012
ARN II	1429	1.84	0.83	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Tenlen <i>et al.</i> 2013
Sigma	459	1.96	0.98	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Direct-zol RNA miniprep
Wt	30	1.62	0.78	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Direct-zol RNA miniprep
Tun	30	1.66	0.78	Boobthy <i>et al.</i> 2017 y Direct-zol RNA miniprep

Con el ARN, se sintetizó el ADN complementario utilizando oligonucleótidos aleatorios (Random hexamers) como primer y el ADN sintetizado se empleó para la amplificación parcial del canal TRP γ . Como secuencia control se utilizó β -tubulina y actina. Los productos correspondieron al peso esperado y se clonó en el vector TOPO PCR4. De las colonias transformadas, se seleccionaron algunas para

corroborar con un PCR de colonia, el tamaño del fragmento previamente amplificado (Figura 15).

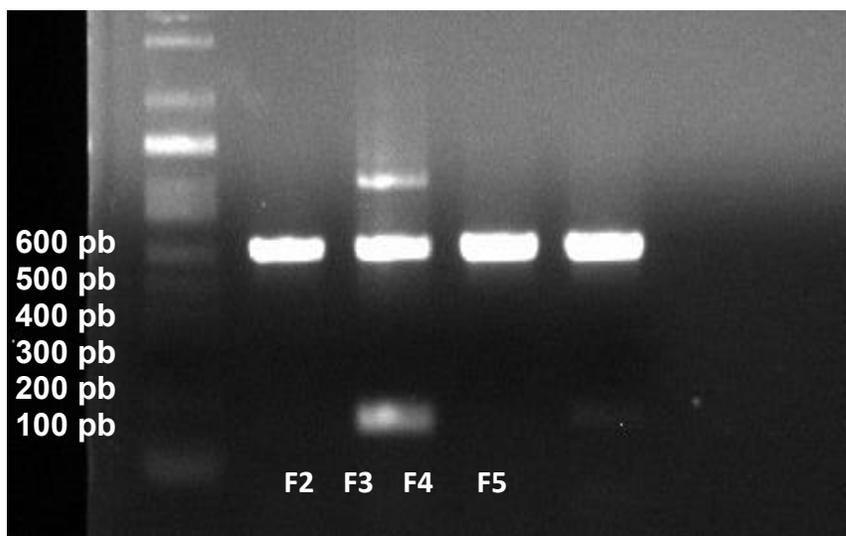


Figura 15. Amplificación de TRP γ de colonias de *E. coli* DH5 α en un gel de agarosa 1% en el cual se corroboró la inserción del fragmento clonados.

Las colonias F2, F3, F4, F5 fueron recuperadas y crecidas en medio LB suplementado con ampicilina (100 mg/ml) para la extracción de plásmidos. Con base en el ADN de plásmido, se realizó la estrategia de alineamiento de ADN blanco sugerida en el manual del kit MEGAscript RNAi (Thermo Fisher Scientific) que consiste en la amplificación del inserto con cebadores etiquetados en la región 5' con el promotor de la ARN polimerasa T7 en ambas direcciones (Cuadro 1).

Se linearizó con las mismas condiciones de amplificación mostradas para el canal TRP γ . Se corroboró el tamaño del amplicón en un gel de agarosa 1%, como se muestra en la Figura 16. A partir de los amplicones, se prosigió a realizar la transcripción *in vitro*.

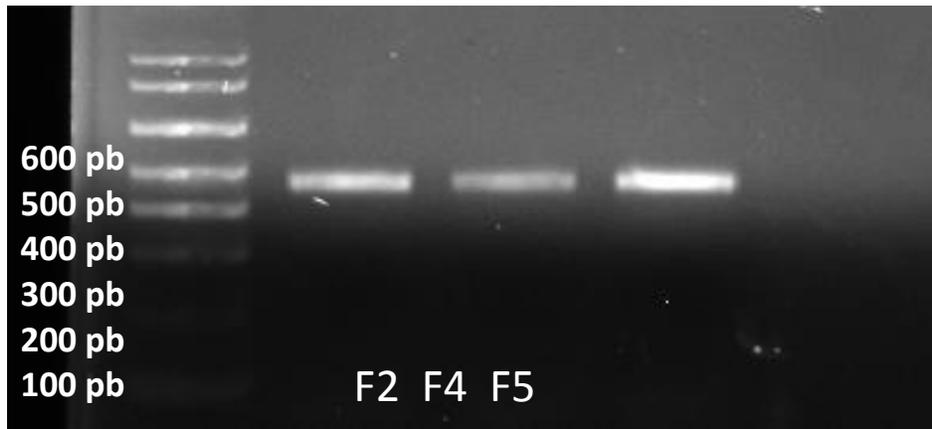


Figura 16. Amplicón de TRPγ a partir de ADN de plásmido para templado de transcripción in vitro en un gel de agarosa 1%.

Para la transcripción, se utilizó como control de la reacción el templado previsto en el kit. El ARNdc control resultante de la reacción tiene un peso de 500 pb aproximadamente. Para el templado de TRPγ, la incubación para la transcripción se dejó por 16 horas mientras que para el control fue por dos horas. Inmediatamente después de la reacción de transcripción, se sugiere corroborar la integridad en un

gel de agarosa al 1%, al hacerlo; se observa que la banda coincide con el peso esperado (Figura 17, carril 3).

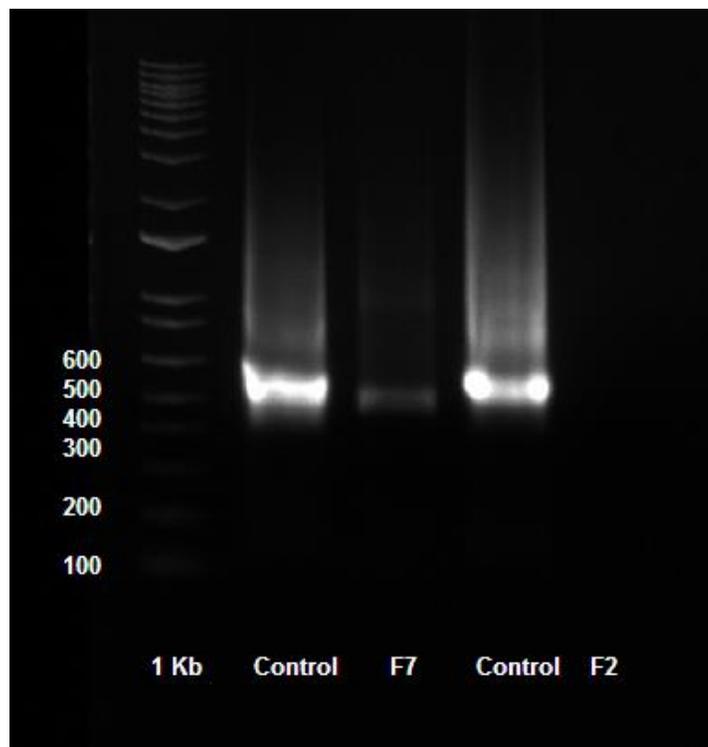


Figura 17. *Integridad del ARN de doble cadena después de la transcripción a 37°C en un gel de agarosa 1% resultante de la transcripción in vitro. En el segundo carril se muestra el control de la reacción de transcripción del kit. En el segundo carril, se muestra el ARN interferente del canal TRPy.*

Posteriormente, se alineó y purificó el ARNcd. Para estos pasos se utilizaron dos protocolos, el sugerido por el fabricante y el otro por la purificación del manual (Sambrook, 2001). Esto con la finalidad de establecer una estrategia de purificación distinta en caso de que faltara algún reactivo en el kit de síntesis de ARNi. De acuerdo a las purificaciones fueron reveladas en un gel de agarosa al 1% (Figura 18) y cuantificadas por espectrofotometría de luz UV, la concentración y la pureza fue adecuada con el segundo protocolo de purificación y se empleó la muestra del segundo protocolo (F7) para la microinyección.

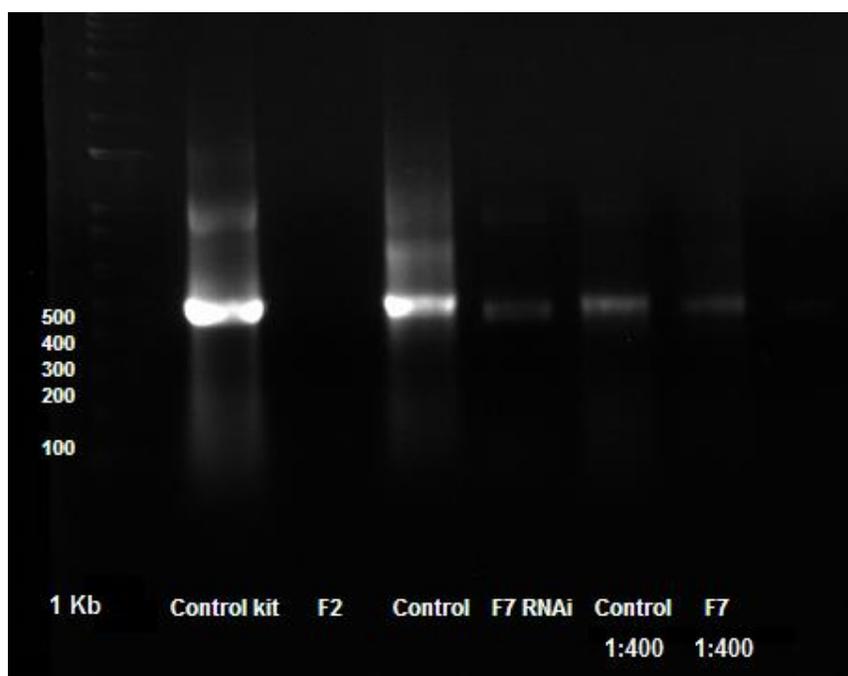


Figura 18. ARNcd para microinyectará purificado a través de dos protocolos. Las muestras F2 y F7 corresponden a ARNcd de TRPγ. Los últimos carriles son las muestras Control y F7 del segundo protocolo de purificación pero diluido 400 veces.

7.4 Microinyección

Se seleccionaron diez individuos adultos para microinyectar por triplicado con rojo fenol (1:100) y con el ARN de cadena doble para producir el ARN interferente del canal TRP gamma ($1.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Los individuos fueron colocados en un soporte que a su vez se colocó en la base de una caja de Petri de 35 mm que contiene dos cubreobjetos fijos con agua y del cual, se empleó el borde del portaobjetos colocado arriba para colocar a los tardígrados en línea (Figura 19). La exposición con levamisol 5 mM disminuyó la locomoción de los individuos a los cinco minutos de exposición. De esta forma, se procedió a colocar el capilar generado y sumergirlo en la solución a inyectar por cinco minutos hasta que por capilaridad, se visualizó el líquido en la punta. La punta del capilar fue roto con tijeras estériles ya que al ser sumamente delgado, no se pudo romper en el cubreobjetos. Una vez montado el capilar y el soporte, se manipuló la dirección del capilar hacia el mismo campo visual en el que se observó a los tardígrados. En el objetivo 40 X, se localizó la gónada o intestino del individuo y se inyectó aproximadamente $1 \mu\text{l}$ de la solución. Se dieron dos pulsos de nitrógeno por individuo. Se recuperaron los tardígrados y se mantuvieron en agua de manantial suministrado con alimento toda la noche. El procedimiento no fue letal ya que todos los tardígrados inyectados mantenían su actividad motora u otro comportamiento diferente.

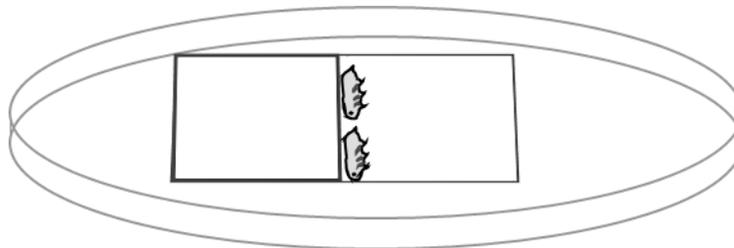


Figura 19. Caricatura de la estructura empleada para el soporte durante la microinyección.

7.5 Ensayo de osmobirosis

Al probar distintas concentraciones de NaCl para determinar cuál concentración no representaba letal e inducía el tonel en *H. exemplaris*, se determinó que 0.1 M de NaCl inducía el cambio morfológico y además no mató a los ejemplares (Figura 20).

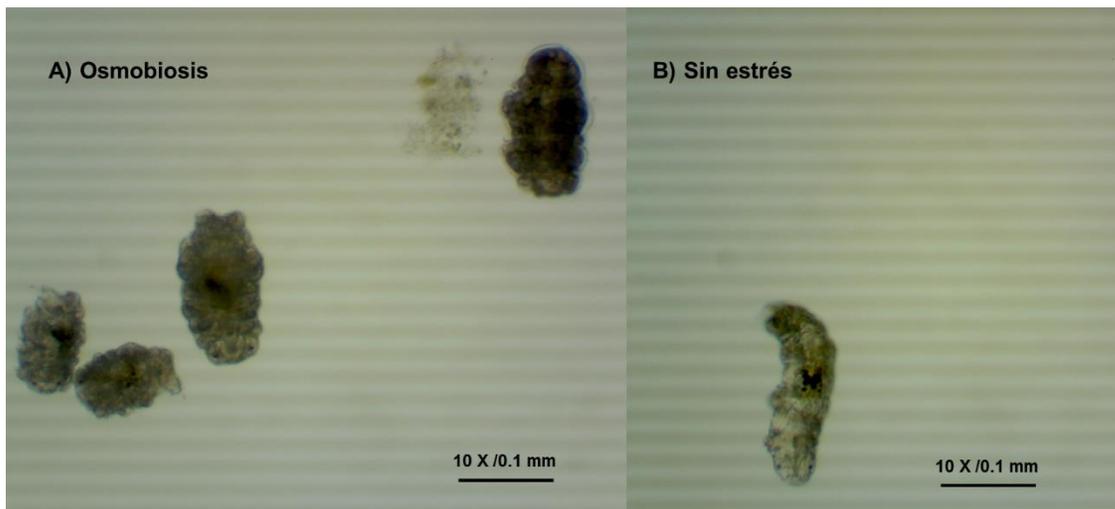


Figura 20. Morfología de *H. exemplaris* ante condiciones hiperosmóticas y sin exposición a estrés salino. Durante el estado osmobiótico, los tardígrados permanecen inmóviles y contraídos de manera parcial o total mientras que en condiciones óptimas, no presentan alteración alguna.

Al hacer un seguimiento detallado del comportamiento de los tardígrados en la exposición a NaCl en esta concentración, se evaluó el efecto en 60 ejemplares. Se registró que a partir de la hora 3, los tardígrados recuperaron su morfología al extenderse pero se mantenían inmóviles. Este cambio se observó hasta las 24 horas (Figura 21). Así mismo, desde los quince minutos de exposición, los individuos comienzan a mostrar cambios como movimientos retardados y la

compactación de sus extremidades. A los 30 minutos, el 70% de la población ya se encuentra en tonel.

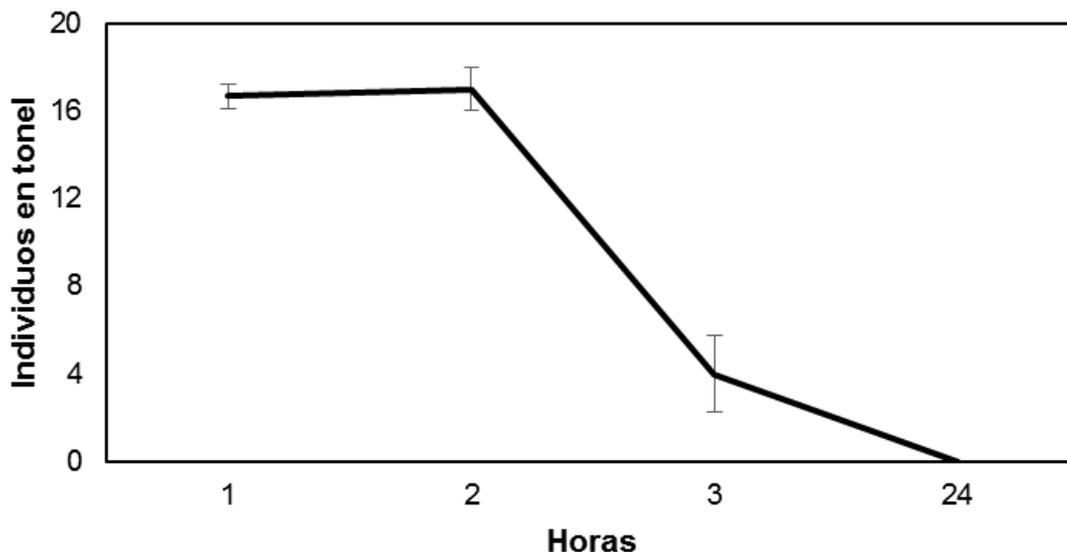


Figura 21. Ensayo de osmolaridad en *H. exemplaris* con NaCl al 0.1 M. Las barras indican la desviación estándar. El ensayo se hizo por triplicado (n=60). Se expuso a tardígrados adultos al medio hipertónico para inducir el tonel. Se realizaron las observaciones a la hora 1, 2, 3 y 24. Se cuantificó el número de organismos en tonel.

7.6 Desafío a hiperosmolaridad en individuos tratados con bloqueadores del TRP γ

Con la finalidad de determinar la participación de la proteína TRP γ durante el comportamiento de osmobiosis, se utilizaron los fármacos 8-br-cAMP y 2-APB para bloquear de manera específica la actividad del canal TRP γ . Por lo que se suministraron los fármacos a la concentración empleada en el trabajo de Wicher *et al.*, (2006) con 200 nM de 8-br-cAMP y 10 μ M de 2-APB y a partir de dicha concentración, se hizo una dilución de la misma para evaluar el efecto letal en los tardígrados. Se empleó la solución de trabajo a una concentración final de 20 nM para 8-br-cAMP y 1 μ M de 2-APB. La exposición se hizo durante cinco horas. Ya

que después de ese tiempo, los organismos se inmovilizaban. Después de la exposición, fueron sometidos al ensayo de osmobiosis para evaluar su ingreso al tonel. De acuerdo a los resultados, a partir de los 15 minutos se observó una disminución marcada en los individuos tratados comparados con el control ya que aquellos tratados con el fármaco no lograron formar el tonel (Figura 22). En cambio, se mantenían extendidos. La diferencia fue marcada para todos los minutos evaluados de acuerdo con la prueba de rangos de signo de Wilcoxon en el que $P < 0.05$.

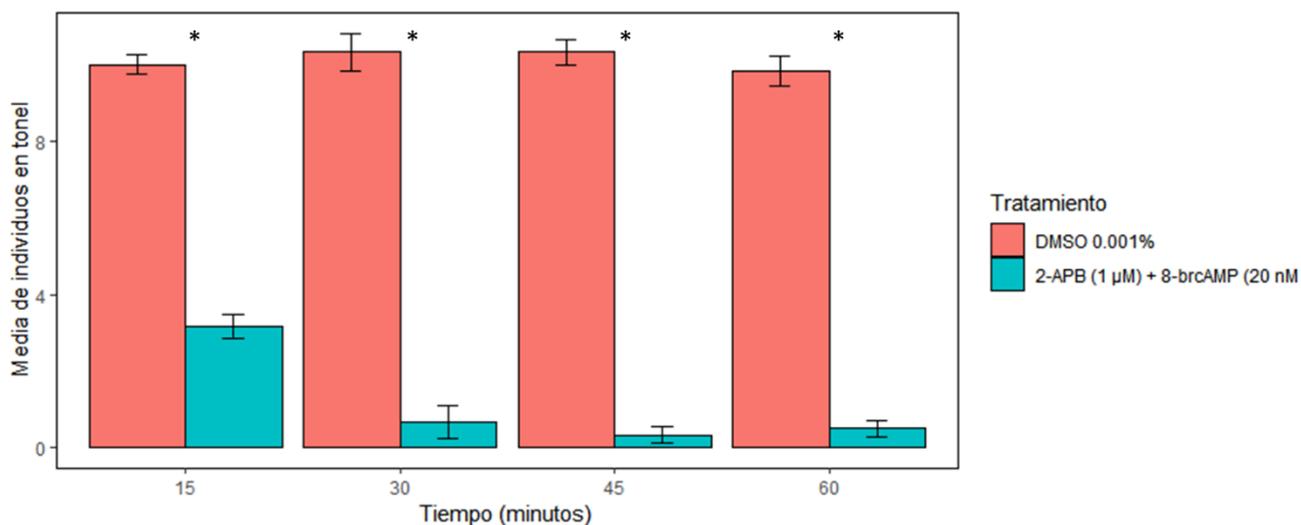


Figura 22. Ensayo de osmobiosis en tardígrados tratados con los bloqueadores del canal TRP γ 8-br-cAMP (20 nM) y 2-APB (1 μ M) y con el control DMSO 0.001%. Las barras indican la desviación estándar. Ensayos por triplicado (n=120). La exposición se hizo con NaCl 0.1 M. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control. Prueba de rangos con signo de Wilcoxon $P < 0.05$.

7.7 Desafío a hiperosmolaridad en individuos silenciados

Después del tiempo de recuperación de los tardígrados inyectados, estos fueron sometidos a estrés hipertónico con la finalidad de observar si el dsARN (ARN de

cadena doble, por sus siglas en inglés double strain) a las 12 horas de ser introducido en el organismo y mediante el procesamiento de éste en ARNi, silenciaba de manera parcial el procesamiento de mensajeros del canal TRPγ. Como se observa en la Figura 23, los individuos en tonel parecían ser menores en comparación al control (rojo fenol). Sin embargo, el número de individuos en tonel no difirió del control durante los distintos tiempos de medición.

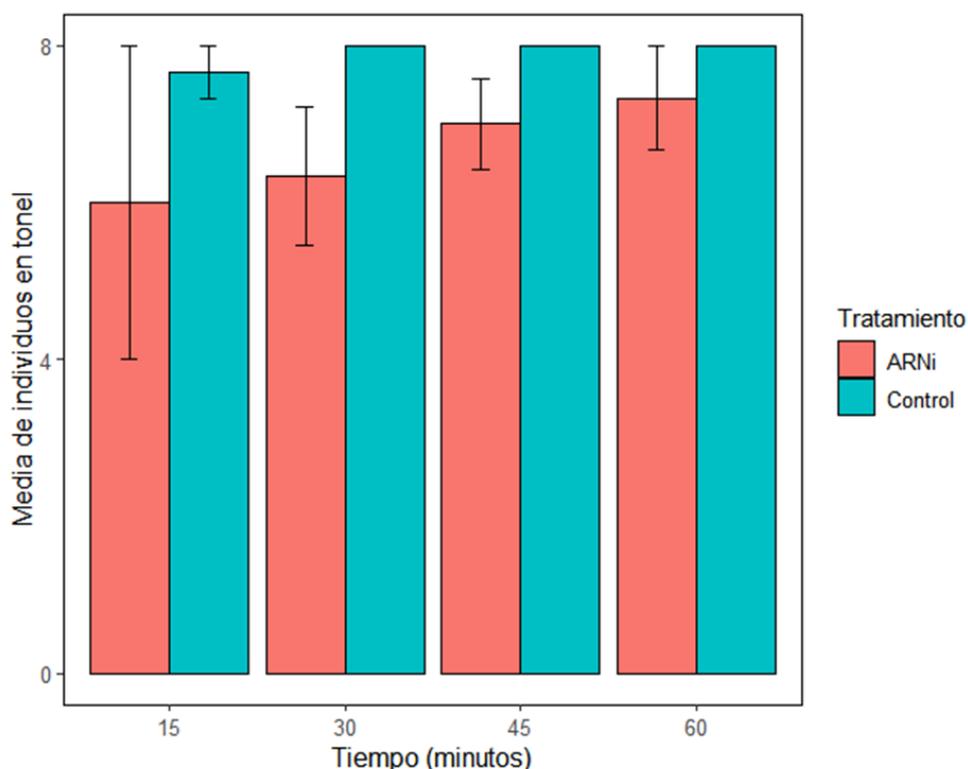


Figura 23. Ensayo de osmobiosis en individuos adultos después de 24 horas de ser silenciados mediante microinyección. Las barras indican el error estándar, en columnas sin barra indica que el error estándar = 0. Ensayos por triplicado (n=48). La exposición se hizo con NaCl 0.1 M y como control, se inyectó rojo fenol (1:100). Las mediciones se realizaron a los 15, 30, 45 y 60 minutos de exposición.

7.8 Respuesta al estrés osmótico de progenie silenciada

Para determinar si en la progenie en individuos inyectados con el ARNcd tenía un efecto en la respuesta de inducción al tonel ante estrés hiperosmótico, se mantuvieron a los organismos adultos inyectados en agua de manantial suministrado con alimento hasta que ovipositaron huevos en la exuvia. Los huevos se transfirieron a un nuevo medio y se esperó a su eclosión y crecimiento a adultos para desafiarlos con NaCl 0.1M.

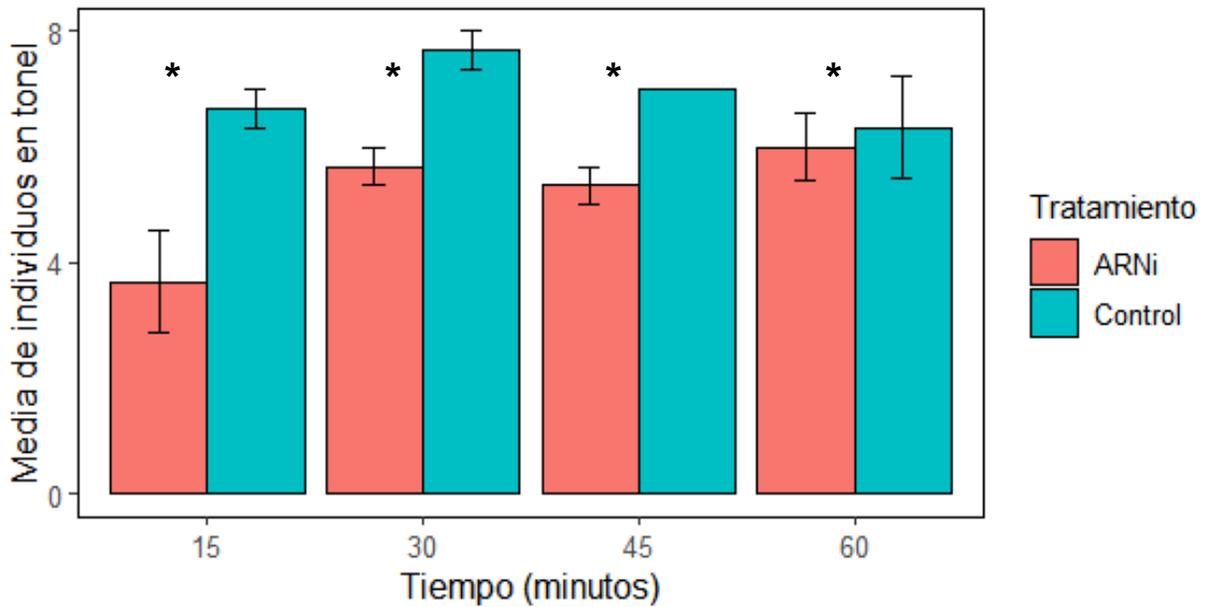


Figura 24. Ensayo de inducción de osmobirosis con NaCl 0.1M en la progenie silenciada para TRPy de *H. exemplaris*. El ensayo se hizo por triplicado (n=30) y los conteos se realizaron a diferentes tiempos (15, 30, 45 y 60 minutos). Las barras indican el error estándar, en columnas sin barra indica que el error estándar = 0. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al control para $P < 0.05$ del valor de P de una prueba de dos colas de t-student y valor de P de la prueba de rangos de Wilcoxon.

Durante los primeros minutos de la exposición, se vio reflejado que los individuos silenciados continuaron extendidos y con movimiento en los lobópodos, contrariamente a lo observado en los individuos no inyectados, en el cual había se inmovilizaron si continuaban extendidos o se iniciaba la compactación corporal, registrado como el tonel (Figura 24). A partir de los 30 minutos de exposición,

algunos individuos lograron formar el tonel, sin embargo, la respuesta aún difirió del control (t-test, dos colas $p < 0.0001$) y los individuos que no lograron formar el tonel, continuaron extendidos e inmóviles, como se observó en el ensayo con la aplicación de los fármacos bloqueadores para TRPy. Lo que sugiere que la disminución de la expresión de TRPy está contribuyendo a que la mayoría de los individuos, no pueda formar el tonel criptobiótico en exposición a estrés salino.

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de los principales dominios de acción de TRP γ en *Hypsibius*

Los canales TRP son proteínas implicadas en la detección de una amplia variedad de estímulos externos y variaciones ambientales como sonido, químicos, luz, toque mecánico, temperatura y alteraciones en la osmolaridad. De hecho, Venkatachalam y Montell (2007) los denominó como integradores de señales múltiples. En general, estos canales contienen seis pasos transmembranales, regiones amino y un carboxi-terminal. Estas proteínas están presentes tanto en mamíferos e invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster*. Los canales TRP se subdividen en familias con base en los segmentos transmembranales y la región carboxi-terminal en el sexto dominio transmembranal. En *Drosophila*, TRP γ pertenece a la subfamilia TRPC junto con TRPL y TRP. La proteína Nan pertenece a la clasificación TRPV. Por lo que, a pesar de ser secuencias cercanas, como lo mostró el cladograma de probabilidades, TRP γ no pertenece a la misma familia que Nan. Por lo que al comparar la secuencia y observar los principales dominios de la proteína de *H. exemplaris* con el de la proteína TRP γ de la mosca de fruta *D. melanogaster*, observó en los dominios correspondientes a superfamilias, ambas tenían el dominio TRP. Sin embargo, el dominio DUF1509 sólo lo presenta *H. exemplaris*. De acuerdo a la base de datos CDD, este dominio forma parte de la familia de proteínas 07420, la cual está constituida por varias proteínas virales no caracterizadas similares a los alfa-herpes virus que causan la enfermedad de Marek (Zheng *et al.* , 2016), sin embargo, este dominio es rico en sitios de fosforilación en serinas, lo cual puede sugerir que puede ser blanco de fosforilación de otras proteínas que participen distintas vías como la descrita durante la fotorecepción descrita en *D. melanogaster*. en la cual, a través de la recepción de luz por una rodopsina, se activan los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas

en inglés) que a su vez, emplean la actividad de la fosfolipasa PLC y activan a las proteínas TRPL y TRP mediante fosforilación por un mecanismo desconocido (Fowler y Montell, 2013).

Dado que TRP γ no pertenece a la familia de TRPV, se comparó con TRP γ de *D. melanogaster* y de la cucaracha americana *Periplaneta americana*. La proteína en *H. exemplaris* además de ser más larga, contiene regiones extra que no presentan *Drosophila* y *Periplaneta* como se demuestra en el trabajo de (Wicher *et al.* , 2006). Aunque, en células transfectadas HEK que expresan TRP γ de *P. americana*, se mostró que la región C terminal parece tener un papel para la unión de AMP cíclico y su modulación (Wicher *et al.* , 2006).

8.2 Obtención de RNAd de TRP γ en *H. exemplaris*

La liberación del material genético en tardígrados suele ser complicada debido a la presencia de la cutícula compuesta principalmente por quitina. Por lo que la complementación de protocolos fue crucial para poder obtener el ARN. En este caso, se utilizó el protocolo de Boothby (2018) en el que los tardígrados fueron resuspendidos en TRIzol y el protocolo de Boothby *et al.* (2017) donde se maceraron a los individuos congelados con nitrógeno líquido repetidas veces para que por la acción mecánica, la ruptura de la cutícula fuera ideal para liberar el material celular. El número de individuos también fue clave ya que cuando se probaron los protocolos para diez, 90 y 200 individuos, la concentración y la calidad incrementaron cuando se utilizó la mayor cantidad posible de organismos. El uso de primers random hexamers durante la retrotranscripción también fue importante para obtener el ADN complementario, posiblemente por su unión a sitios inespecíficos en el ARN mensajero y ayudan a mejorar la síntesis de ADN complementario (ThermoFisher Scientific, página web). Una vez amplificado el producto esperado, la síntesis del RNAd a partir del ADN de plásmido donde se clonó el amplicón, funcionó cuando se dejó incubar la reacción de transcripción por más tiempo a pesar de no ser un

producto menor a 400 pb, como se sugiere en las indicaciones del kit. También, fue sumamente importante la concentración de producto antes de la reacción de transcripción, que se sugiere hacerla a partir del templado a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Tenlen *et al.* , 2013) ya que hacerlo con menos de 500 ng, podría resultar en poca concentración de ARNcd final y no ser apto para experimentos como la microinyección.

Por otra parte, de acuerdo a Tenlen *et al.* 2013, el fenol rojo 1:100 puede ser utilizado como control para la microinyección y este a su vez, puede ser recuperado del sitio de inyección en las gónadas o intestino. Sin embargo, al inyectar el fenol rojo a la concentración sugerida, no se observó un cambio o en la coloración al ingresar al organismo y no fue posible recuperarlo. Se esperaba que al ser un indicador de pH, el interior de las gónadas o el intestino, presentara una transición de color rojo a amarillo, por el pH del ambiente del órgano, pero no se observó y no pudo recuperarse el reactivo del interior del sitio de inyección. Sin embargo, la inyección con fenol no fue letal para los individuos ni tampoco presentaron un comportamiento atípico tras el procedimiento.

8.3 Inducción del tonel por hiperosmolaridad en *H. exemplaris*

Los tardígrados sobreviven y protegen sus tejidos internos de las variaciones osmóticas ambientales mediante la criptobiosis, que les permite sobrevivir en distintos nichos ecológicos. La formación del tonel implica la contracción muscular de manera antero-posterior en los tardígrados. Se conoce que tardígrados marinos como *Halobiotus crispae* resiste condiciones hipertónicas mediante otra estrategia denominada ciclomorfosis, la cual es dependiente de las estaciones del año (Halberg *et al.* , 2009). Sin embargo, en eutardígrados terrestres, el fenómeno de osmobiosis sólo se había reportado en *Ramazzottius oberhaeuseri*, el cual ingresa en tonel a partir de 192 mOsm kg^{-1} de NaCl y a la presencia de soluciones no iónicas como el PEG. Sin embargo, *R. oberhaeuseri* suele ser más sensible a la presencia de sales debido a que los iones Na^+ y Cl^- son los principales iones que se

encuentran en fluidos de tardígrados y forman parte en procesos de la contracción muscular y de impulsos en células nerviosas (Heidemann *et al.* , 2016). En este trabajo, *H. exemplaris* ingreso en tonel a la exposición a 0.1 M de NaCl y tras la recuperación después de cinco horas, el organismo puede volver a su estado activo. Sin embargo, se desconoce por qué a partir de las tres horas de exposición, los tardígrados continúan inmóviles y a su vez, recuperan su forma. También se desconoce el tiempo máximo de tolerancia a la osmobiosis, ya que de todos los tipos de criptobiosis, este es el menos estudiado.

8.4 Actividad de TRP γ durante la osmobiosis

Desde el descubrimiento del ARN de interferencia, el análisis de fenotipos con pérdida de función en genes de interés, lo ha vuelto un método sencillo, específico y carente de efectos secundarios a altas concentraciones de ARNcd (hasta 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en muchos modelos de estudio como *C. elegans* y *D. melanogaster* (Conte *et al.* , 2015) lo cual fue importante para la ejecución de la técnica, ya que el ARNcd a concentraciones menores a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, no era suficiente para observar un efecto fenotípico. En tardígrados, el ARNcd se inyectó en las gónadas o intestino de la muestra y se ha reportado que en *C. elegans*, el efecto del ARNi se propaga a tejidos alejados al sitio original de aplicación, lo que permite el silenciamiento del gen blanco en todo el organismo. Así mismo, el silenciamiento es temporal pero puede ser estable si es transfectado a tejidos específicos o a líneas celulares (Buckingham, 2004). En tardígrados, se ha reportado que al inyectar ARNcd en gónadas e intestino, asegura que el efecto dure al menos hasta la primera generación de la progenie (Tenlen *et al.* , 2013). Aunque en el trabajo de Boothby *et al.* , (2017), se emplearon individuos adultos para los distintos desafíos a otros factores de estrés a las 24 horas del procedimiento y siendo funcional de esta forma. Sin embargo, el desafío ante el estrés osmótico en tardígrados recién silenciados parece no haber tenido efecto alguno sobre la inducción del tonel, es posible que esto se deba al

tiempo de exposición del ARNcd no haya sido suficiente para su procesamiento. Sin embargo, en la progenie de adultos inyectados, se observaron diferencias marcadas sobre la formación del tonel ante la exposición al estrés hiperosmótico en comparación al control, el cuál si se reportó el tonel durante toda la duración del ensayo. Lo que sugiere que TRPy está contribuyendo a la respuesta de formación al tonel y que la actividad óptima permite que al menos el 85% de los individuos pueda ingresar en osmobiosis.

El bloqueo a través de los fármacos 8-br-cAMP y 2-APB, actuó a nivel de función proteica y al suministrarlo en individuos adultos, se observó que su locomoción disminuía con el tiempo. Sin embargo, a las cinco horas de exposición, fue suficiente para que, de manera inmediata se realizara el desafío con NaCl e inducir el estado osmobiótico. Al exponerlos en 0.1 M de NaCl, se registró que a partir de los 15 minutos de desafío, los individuos no eran capaces de formar el tonel. Esta respuesta continuó hasta la hora de observación, por lo que se sugiere que TRPy está implicada en el proceso de señales para inducir el tonel bajo la presión hiperosmótica. Así mismo, por observaciones en el laboratorio, los individuos silenciados y tratados con el bloqueador de TRPy que no lograron formar en su mayoría el tonel criptobiótico en presencia de NaCl 0.1 M, al ser transferidos a un medio óptimo con alimento, recuperaron su movilidad de la misma forma que con los individuos control, sugiriendo que la no formación del tonel por efecto del silenciamiento y bloqueo de TRPy, no es letal para los organismos.

Por otra parte, aunque no se determinaron los sitios de expresión de TRPy en *H. exemplaris*, es posible que pueda encontrarse en células sensoriales en la región anterior de la cabeza donde se ha descrito que se localizan dos campos sensoriales, anterio lateral y circunoral. Donde se plantea que dendritas y células receptoras con cilios pueden ser quimiorreceptoras y mecanorreceptoras. También, puede localizarse en dendritas que subyacen debajo de la cutícula (Bertolani y Rebecchi,

2018). Sin embargo, queda por determinar si la localización de esta proteína se encuentra en estos tipos celulares o en otras regiones del tardígrado. Ya que en *D. melanogaster*, se reportó que se requiere la participación de TRP γ para formar heterodímeros con la proteína TRPL y favorecer las señales receptoras durante la fototransducción en órganos visuales de adultos (Fowler y Montell, 2013). Sin embargo, en *P. americana*, células de la línea HEK293 que expresaron TRP γ , determinaron que se expresa a través de todo el sistema nervioso del organismo, específicamente en cuerpos celulares neuronales en fibras nerviosas involucradas en el procesamiento de la conductividad sensorial. Por lo que Wicher *et al.* (2006), proponen que TRP γ es el único canal de la familia TRPC que tiene una expresión significativa en el sistema nervioso.

9. CONCLUSIONES

La osmobiosis es un estado criptobiótico que presenta el eutardígrado semiterrestre *Hypsibius exemplaris* bajo estrés hiperosmótico con NaCl al 0.1 M y permanece estable hasta la primera hora de exposición, posteriormente, recupera su longitud pero se mantiene inmóvil.

La actividad de la proteína TRP γ juega un papel importante durante la inducción del tonel criptobiótico ya que el bloqueo en la actividad mediante fármacos específicos y el silenciamiento del mensajero de trpy, no permiten la formación del tonel durante la exposición al estrés hiperosmótico.

10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se establecieron las condiciones óptimas para la experimentación molecular y fisiológica del tardígrado *H. exemplaris*. Así mismo, se propone que la proteína TRP γ , está implicada en la inducción del tonel osmobiótico. No obstante, para complementar este hallazgo, es importante establecer los sitios de expresión de los ARN de una manera espacio-temporal en diferentes tejidos del organismo con Hibridación *in situ*. A su vez, esto permitirá describir si se expresa antes, durante o después del estrés hiperosmótico.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Altiero, T., Suzuki, A.C., Rebecchi, L., 2018. Reproduction, Development and Life Cycles. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 211–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_8
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arakawa, K., Yoshida, Y., Tomita, M., 2016. Genome sequencing of a single tardigrade *Hypsibius dujardini* individual. *Sci. Data* 3, 160063.
- Beltrán-Pardo, E.A., Jönsson, I., Wojcik, A., Haghdoost, S., Bermúdez Cruz, R.M., Bernal Villegas, J.E., 2013. Sequence analysis of the DNA-repair gene rad51 in the tardigrades *Milnesium cf. tardigradum*, *Hypsibius dujardini* and *Macrobiotus cf. harmsworthi*. *J. Limnol. Vol 72 No 1s 2013 12th Int. Symp. Tardigrada*.
- Bertolani, R., Guidetti, R., JÖNSSON, I.K., Altiero, T., Boschini, D., Rebecchi, L., 2004. Experiences with dormancy in tardigrades. *J. Limnol.* 63, 16–25.
- Bertolani, R., Rebecchi, L., 2018. Cytology and Cytogenetics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 145–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_6
- Boothby, T.C., 2018. Molecular Biology in Tardigrades. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 331–347. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_13
- Boothby, T.C., Tapia, H., Brozena, A.H., Piszkiwicz, S., Smith, A.E., Giovannini, I., Rebecchi, L., Pielak, G.J., Koshland, D., Goldstein, B., 2017a. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Mol. Cell* 65, 975–984.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.018>
- Boothby, T.C., Tenlen, J.R., Smith, F.W., Wang, J.R., Patanella, K.A., Osborne Nishimura, E., Tintori, S.C., Li, Q., Jones, C.D., Yandell, M., Messina, D.N., Glasscock, J., Goldstein, B., 2015. Evidence for extensive horizontal gene transfer from the draft genome of a tardigrade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15976–15981. <https://doi.org/10.1073/pnas.1510461112>
- Bourque, C.W., 2008. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 519–531. <https://doi.org/10.1038/nrn2400>
- Buckingham, S.D., 2004. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Hum. Mol. Genet.* 13, R275–R288. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh224>
- C. Brusca, R., Moore, W., Shuster, S.M., 2016. Invertebrates, 3rd ed. Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- Chalfie, M., 2009. Neurosensory mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 44–52. <https://doi.org/10.1038/nrm2595>

- Conte, D., Jr, MacNeil, L.T., Walhout, A.J.M., Mello, C.C., 2015. RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 109, 26.3.1-26.3.30. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2603s109>
- Czernekova, M., Jönsson, K.I., 2016. Experimentally Induced Repeated Anhydrobiosis in the Eutardigrade *Richtersius coronifer*. *PLOS ONE* 11, e0164062. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164062>
- Czerneková, M., Jönsson, K.I., Chajec, L., Student, S., Poprawa, I., 2017. The structure of the desiccated *Richtersius coronifer* (Richters, 1903). *Protoplasma* 254, 1367–1377. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1027-2>
- Darby, W.G., Grace, M.S., Baratchi, S., McIntyre, P., 2016. Modulation of TRPV4 by diverse mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 78, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.012>
- Filingeri, D., 2015. Humidity sensation, cockroaches, worms, and humans: are common sensory mechanisms for hygrosensation shared across species? *J. Neurophysiol.* 114, 763–767. <https://doi.org/10.1152/jn.00730.2014>
- Fowler, M.A., Montell, C., 2013. *Drosophila* TRP channels and animal behavior. *TRP Channels GPCRS Endolipids Nat. Prod. Tetr. Makes Sense* 92, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.07.029>
- Gabriel, W.N., McNuff, R., Patel, S.K., Gregory, T.R., Jeck, W.R., Jones, C.D., Goldstein, B., 2007. The tardigrade *Hypsibius dujardini*, a new model for studying the evolution of development. *Dev. Biol.* 312, 545–559. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.055>
- Garrity, P.A., Goodman, M.B., Samuel, A.D., Sengupta, P., 2010. Running hot and cold: behavioral strategies, neural circuits, and the molecular machinery for thermotaxis in *C. elegans* and *Drosophila*. *Genes Dev.* 24, 2365–2382. <https://doi.org/10.1101/gad.1953710>
- Gąsiorek, P., Stec, D., Morek, W., Michalczyk, Ł., 2018. An integrative redescription of *Hypsibius dujardini* (Doyère, 1840), the nominal taxon for Hypsibioidea (Tardigrada: Eutardigrada). *Zootaxa* 4415, 45. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4415.1.2>
- Gong, Z., Son, W., Doo Chung, Y., Kim, J., Shin, D.W., McClung, C.A., Lee, Y., Lee, H.W., Chang, D.-J., Kaang, B.-K., Cho, H., Oh, U., Hirsh, J., Kernan, M.J., Kim, C., 2004. Two Interdependent TRPV Channel Subunits, Inactive and Nanchung, Mediate Hearing in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 24, 9059. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1645-04.2004>
- Gross, V., Mayer, G., 2015. Neural development in the tardigrade *Hypsibius dujardini* based on anti-acetylated α -tubulin immunolabeling. *EvoDevo* 6, 12. <https://doi.org/10.1186/s13227-015-0008-4>
- Guidetti, R., Altiero, T., Rebecchi, L., 2011. On dormancy strategies in tardigrades. *Dormancy Dev. Arrest Invertebr.* 57, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.003>

- Halberg, K.A., Persson, D., Ramløv, H., Westh, P., Kristensen, R.M., Møbjerg, N., 2009. Cyclomorphosis in Tardigrada: adaptation to environmental constraints. *J Exp Biol* 212. <https://doi.org/10.1242/jeb.029413>
- Hashimoto, T., Horikawa, D.D., Saito, Y., Kuwahara, H., Kozuka-Hata, H., Shin-I, T., Minakuchi, Y., Ohishi, K., Motoyama, A., Aizu, T., Enomoto, A., Kondo, K., Tanaka, S., Hara, Y., Koshikawa, S., Sagara, H., Miura, T., Yokobori, S., Miyagawa, K., Suzuki, Y., Kubo, T., Oyama, M., Kohara, Y., Fujiyama, A., Arakawa, K., Katayama, T., Toyoda, A., Kunieda, T., 2016. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of human cultured cells by tardigrade-unique protein. *Nat. Commun.* 7, 12808.
- Heidemann, N.W.T., Smith, D.K., Hygum, T.L., Stapane, L., Clausen, L.K.B., Jørgensen, A., Hélix-Nielsen, C., Møbjerg, N., 2016. Osmotic stress tolerance in semi-terrestrial tardigrades. *Zool. J. Linn. Soc.* 178, 912–918. <https://doi.org/10.1111/zoj.12502>
- Hohmann, S., 2009. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 583, 4025–4029. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.069>
- Horikawa, D.D., Higashi, S., 2004. Desiccation Tolerance of the Tardigrade *Milnesium tardigradum* Collected in Sapporo, Japan, and Bogor, Indonesia. *Zoolog. Sci.* 21, 813–816. <https://doi.org/10.2108/zsj.21.813>
- Kim, J., Chung, Y.D., Park, D., Choi, S., Shin, D.W., Soh, H., Lee, H.W., Son, W., Yim, J., Park, C.-S., Kernan, M.J., Kim, C., 2003. A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* 424, 81–84. <https://doi.org/10.1038/nature01733>
- Liedtke, W., Choe, Y., Martí-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., AndrejŠali, Hudspeth, A.J., Friedman, J.M., Heller, S., 2000. Vanilloid Receptor–Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor. *Cell* 103, 525–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00143-4)
- Liedtke, W., Friedman, J.M., 2003. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-}mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13698–13703.
- Liedtke, W., Tobin, D.M., Bargmann, C.I., Friedman, J.M., 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioral responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14531. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235619100>
- Liu, L., Li, Y., Wang, R., Yin, C., Dong, Q., Hing, H., Kim, C., Welsh, M.J., 2007. *Drosophila* hygrosensation requires the TRP channels water witch and nanchung. *Nature* 450, 294–298. <https://doi.org/10.1038/nature06223>
- Mallatt, J.M., Garey, J.R., Shultz, J.W., 2004. Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.07.013>

- Martín-Durán, J.M., Wolff, G.H., Strausfeld, N.J., Hejnol, A., 2015. The larval nervous system of the penis worm *Priapulid* *Priapulid caudatus* (Ecdysozoa). *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 371. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0050>
- McNuff, B., 2007. *Hypsibius dujardini* collection notes and culture protocol.
- Møbjerg, N., Jørgensen, A., Kristensen, R.M., Neves, R.C., 2018. Morphology and Functional Anatomy. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 57–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95702-9_2
- Montell, C., 2008. TRP Channels: It's Not the Heat, It's the Humidity. *Curr. Biol.* 18, R123–R126. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.001>
- Nelson, D.R., 2002a. Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology1. *Integr. Comp. Biol.* 42, 652–659. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.652>
- Nelson, D.R., 2002b. Current Status of the Tardigrada: Evolution and Ecology1. *Integr. Comp. Biol.* 42, 652–659. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.652>
- Neuman, Y., 2006. Cryptobiosis: A new theoretical perspective. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92, 258–267. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2005.11.001>
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., Saito, H., 1996. Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1–YPD1–SSK1 “Two-Component” Osmosensor. *Cell* 86, 865–875. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80162-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80162-2)
- Rizzo, A.M., Negroni, M., Altiero, T., Montorfano, G., Corsetto, P., Berselli, P., Berra, B., Guidetti, R., Rebecchi, L., 2010. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 156, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.02.009>
- Sambrook, J., 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001.
- Smith, F.W., Jockusch, E.L., 2014. The metameric pattern of *Hypsibius dujardini* (Eutardigrada) and its relationship to that of other panarthropods. *Front. Zool.* 11, 66. <https://doi.org/10.1186/s12983-014-0066-9>
- Solomon, A., Bandhakavi, S., Jabbar, S., Shah, R., Beitel, G.J., Morimoto, R.I., 2004. *Caenorhabditis elegans* OSR-1 Regulates Behavioral and Physiological Responses to Hyperosmotic Environments. *Genetics* 167, 161. <https://doi.org/10.1534/genetics.167.1.161>
- Tenlen, J.R., McCaskill, S., Goldstein, B., 2013. RNA interference can be used to disrupt gene function in tardigrades. *Dev. Genes Evol.* 223, 171–181. <https://doi.org/10.1007/s00427-012-0432-6>
- ThermoFisher Scientific, n.d. Reverse Transcription Reaction Setup—Seven Important Considerations [WWW Document]. URL <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/cloning->

learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/rt-education/reverse-transcription-setup.html

- Weronika, E., Łukasz, K., 2016. Tardigrades in Space Research - Past and Future. Orig. Life Evol. Biospheres. <https://doi.org/10.1007/s11084-016-9522-1>
- Wicher, D., Agricola, H.-J., Schönherr, R., Heinemann, S.H., Derst, C., 2006. TRPY Channels Are Inhibited by cAMP and Contribute to Pacemaking in Neurosecretory Insect Neurons. J. Biol. Chem. 281, 3227–3236. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511741200>
- Yoshida, Y., Koutsovoulos, G., Laetsch, D.R., Stevens, L., Kumar, S., Horikawa, D.D., Ishino, K., Komine, S., Kunieda, T., Tomita, M., Blaxter, M., Arakawa, K., 2017. Comparative genomics of the tardigrades *Hypsibius dujardini* and *Ramazzottius varieornatus*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/112664>
- Zheng, C., Lanczycki, C.J., Zhang, D., Hurwitz, D.I., Chitsaz, F., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., He, J., Geer, L.Y., Han, L., Gwadz, M., Derbyshire, M.K., Thanki, N., Gonzales, N.R., Geer, R.C., Yamashita, R.A., Lu, S., Bryant, S.H., Bo, Y., Wang, Z., Marchler-Bauer, A., 2016. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic Acids Res. 45, D200–D203. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>