

2017

**Bases moleculares de la
alimentación en el ciliado
Stentor coeruleus.**

Iván Sosa Márquez



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



**Bases moleculares de la
alimentación en el ciliado *Stentor
coeruleus*.**

Tesis individual.

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta

Iván Sosa Márquez



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

Opción de titulación
Tesis individual

Bases moleculares de la alimentación en el ciliado *Stentor coeruleus*.

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

Presenta:

Iván Sosa Márquez

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente

Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Secretario

Dr. Nicolás Ramos Lara
Vocal

Dr. Edgardo Ulises Esquivel Naranjo
Sinodal

Dra. Etzel Garrido Espinosa
Sinodal

Esquivel Naranjo Edgardo U.

Dra. Ma. Teresa De Jesús García Gasca
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Querétaro, Qro.
México
Noviembre, 2017

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y posgrado

Resumen

La capacidad del ciliado *Stentor coeruleus* para seleccionar e incorporar las presas que ingiere ha sido caracterizada descriptivamente, pero no se ha logrado desenmascarar el mecanismo que subyace a esta conducta. El proceso de ingesta de presas en ciliados depende de varios pasos funcionales y estructuras celulares específicas, entre las que destacan sistemas de membranelos y microtúbulos en el aparato oral, mismas que preceden a la incorporación de presas en vacuolas alimenticias para su posterior digestión. Organismos eucariotas multicelulares como abejas, moscas y nematodos, poseen fenotipos conductuales relacionados con la alimentación y forrajeo, que dependen en gran medida de un gen denominado *for*, gen codificante de una proteína cinasa dependiente de GMP cíclico (PKG). Las PKGs y guanilato ciclasas (GCs), determinantes de la activación de las primeras, están íntimamente relacionadas con la homeostasis energética, por lo que este sistema de señalización puede estar relacionado con la incorporación de partículas ingeridas en organismos eucariotas unicelulares. En este trabajo se buscó entender los mecanismos detrás de la alimentación en ciliados relacionados con la actividad del sistema de transducción de señales PKG-cGMP. Esto se abordó usando como modelo al ciliado *S. coeruleus* y aplicando técnicas moleculares y farmacológicas para obtener evidencias por pérdida de función en el sistema de transducción de señales propuesto. Este trabajo aporta evidencia de la participación de las PKGs y GCs en el proceso de alimentación en el ciliado, siendo moléculas base para la incorporación diferencial de partículas.

Palabras clave: ciliado, selección de partículas, *Stentor coeruleus*, proteína cinasa, guanilato ciclasa.

Abstract

The ability of *Stentor coeruleus* to incorporate and select the ingested preys has been previously described, but the mechanism underlying this process remains unknown. The prey feeding process in ciliates relies on several steps and specific structures, highlighting membranellar systems and oral apparatus microtubules that precede the incorporation of prey in food vacuoles. Multicellular eukaryotic organisms such as bees, flies and nematods, have different food-related behavioral phenotypes that depend mainly on a gene denominated *for*, which encodes for a cGMP dependent protein-kinase (PKG). PKG proteins and guanylyl cyclases (GC) are closely related to energy homeostasis, thus this group of proteins might be related to the selection of ingested particles in eukaryotic unicellular and multicellular organisms. The aim of this work was to understand the mechanisms underlying food selection in ciliates related to the activity and presence of PKGs, using *S. coeruleus* as a model. In order to understand of the role of PKGs and GCs in this process, genes encoding these proteins were blocked with drugs and RNA interference (RNAi). The role of these proteins on this mechanism was determined based on the change in the incorporation of ingested prey pattern under different treatments. Evidence on the role of both, PKGs and GCs on the feeding process and behavior of the ciliate was achieved in this study, which showed that these molecules are basic elements in the food incorporation process.

Key words: ciliate, particle selection, protein kinase, *Stentor coeruleus*, guanylyl cyclase.

Dedicatorias

Cada organismo vivo, incluyendo al ser humano es la alegre consecuencia de miles de redes formadas entre partículas, planetas y galaxias en un universo extensamente complejo, en el que materia y energía danzan en medio del orden y el caos creando a su paso todo lo que conocemos y estamos por conocer. Así el humano, ser siempre curioso y hermosamente complejizado, busca entenderse en este universo y al hacerlo, con una venda de sentidos, corre en busca de la verdad en un páramo de siempre luz imperceptible para el primate que comienza apenas a retirar la gruesa tela. En su carrera corta y lenta, busca extender cada vez más el conocimiento por la verdad, mientras tropieza erráticamente con el dogma y el ego. Dedico mi trabajo a las miles de personas que buscan la verdad y saben manejar la frustración impulsándose con su motivación por el conocer, aquellos que al verse rodeados de dudas buscan ejercer la virtud humana más valiosa, la razón. Lo dedico a los millones de investigadores que comprenden el amor por la interrogante y entienden el valor que tienen las pequeñas preguntas, y el alcance que pueden tener una vez que llegan a ser grandes cuestionamientos existenciales.

Debo también una dedicatoria especial a los organismos modelo que han logrado ayudar (involuntariamente) al humano a llegar a lo más profundo del mundo vivo conocido, presentando a su vez un enorme mundo de infinitos cuestionamientos por resolver. También lo dedico a los millones de años de evolución que sin estar dedicados a ningún fin, nos presentan una enorme diversidad de especies de interminables formas, estructuras y funciones, conformando el único planeta vivo conocido hasta ahora, planeta que es nuestro deber, como el de cualquier otro ser vivo, mantener como la casa que ha sido para nuestra especie.

Agradecimientos

Las circunstancias actuales parecen convertir la persecución de las virtudes del humano como la curiosidad y la creatividad en lujos inaccesibles para miles de jóvenes, que al verse opacados por la necesidad, renuncian a ellas y viven sobreviviendo en este mundo tan agreste. Agradezco con cariño y respeto a mis padres, cuyo amor y apoyo me han permitido dedicar mi vida a lo que amo, y han impulsado a un soñador a buscar la arquitectura de la vida que le plazca, haciendo en ocasiones sacrificio de sus propios sueños para que sus hijos alcancen los suyos. Amor incondicional.

Gracias a mi director Fausto, por adoptarme a mí y a muchos otros como hijos académicos y como compañeros y colaboradores. Eres un tipo de persona difícil de encontrar y espero mantengas la inocencia y curiosidad de niño que te ha caracterizado desde que te conozco, al mismo tiempo siendo un gran mentor y una persona con enfoque, un caballero con armadura de camisa de cuadros.

Al amor de mi vida, por siempre estar ahí, con tu carácter y tu compasión, con un lazo que nos une con nada más que amor y entendimiento, sin ataduras, sin desvíos, un amor puro, natural.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Ciencias Naturales con sus biólogos rebeldes, vibrantes, efervescentes. Siempre buscando juntos el caos de la vida bohemia y la calma del siguiente día. A mis compañeros y colaboradores, a mi primo Alan Delgado, reguilete humano de emociones que no deja de recordarme por qué estudié biología cada que veo la pasión y el amor por el deber en sus ojos.

Al universo por permitirme vivir en este pedazo de realidad y no dirigirme por otra vertiente espacio-temporal que me llevara a ser un guerrillero, asesino, político o cura.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Dedicatorias.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Tabla de contenidos.....	v
Índice de figuras.....	vi
Índice de cuadros.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1-3
2. ANTECEDENTES.....	3-9
3. HIPÓTESIS.....	10
4. OBJETIVOS.....	10
4.1. Objetivo general.....	10
4.2. Objetivos particulares.....	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11-23
5.1. Colecta y cultivo de <i>S. coeruleus</i>	11
5.2. Selección de organismos presa.....	11
5.3. Obtención de organismos presa.....	12
5.4. Cultivo de organismos presa.....	12
5.5. Descripción del proceso de ingesta.....	12-14
5.6. Bioensayo de preferencia de presa.....	14-16
5.7. Descripción de preparación de fármacos y citotoxicidad.....	17
5.8. Análisis de los efectos farmacológicos de la Acenftenoquinona y la Estauroesporina en la ingesta de presas.....	18- 19
5.9. Localización de genes candidatos como participantes en el proceso de alimentación del ciliado <i>S. coeruleus</i>	19-21
5.10. Diseño de árbol cladístico filogenético de las guanilato ciclasas presentes en el genoma de <i>S. coeruleus</i>	21

5.11.	Efecto del ARN interferente dirigido a guanilato ciclasas en la selección de alimento.....	21-22
5.12.	Análisis de datos.....	23
6	RESULTADOS.....	23-43
6.1	Descripción del proceso de ingesta.....	23-26
6.2	Preferencia de presa.....	27-28
6.3	Efectos farmacológicos y citotóxicos de los fármacos Acenofenoquina y Estauroesporina en la ingesta de presas	28-32
6.4	Localización de genes candidatos como participantes en el proceso de alimentación del ciliado <i>S. coeruleus</i>	33
6.5	Árbol cladístico filogenético de las Guanilato ciclasas presentes en el genoma de <i>S. coeruleus</i>	34-36
6.6	Efecto del ARN interferente dirigido a guanilato ciclasas en la preferencia de alimento.....	37-41
6.7	Ingesta de alimento en inanición.....	42
6.8	Propuesta esquemática descriptiva del proceso molecular que subyace la alimentación en <i>S. coeruleus</i>	43
7	DISCUSIÓN.....	44-48
8	CONCLUSIONES.....	49-50
9	REFERENCIAS.....	51-52

Índice de figuras

1. Partes anatómicas de <i>S. coeruleus</i>	1
2. Diversidad de presas ingeridas por una célula de <i>S. coeruleus</i>	2
3. Ilustración del papel de los microtúbulos en la formación de la vacuola alimenticia.....	6
4. Efecto del cloruro de potasio 0.3 mM en el número total de células presa ingeridas.....	24
5. Esquema ilustrativo del proceso de contracción.....	26
6. Vacuolas alimenticias llenas en una célula de <i>S. coeruleus</i>	26
7. Tamaño del vacuola alimenticia según la presa ingerida	27
8. Tasa porcentual de supervivencia de células tratadas con Acenefteñoquina.....	28
9. Tasa porcentual de supervivencia de células tratadas con Estauroesporina.....	29
10. Efecto de la Acenefteñoquina en la ingesta de presas.....	30
11. Vacuolas alimenticias llenas de presas combinadas (Acq).....	31
12. Efecto de la Estauroesporina en la ingesta de presas.....	32
13. Vacuola alimenticias llenas de presas combinadas (Stau).....	32
14. Árbol filogenético por clados (Neighbour joining) de las guanilato ciclasas.....	35
15. Efecto de la aplicación en combinación de los 11 iARNs dirigidos a guanilato ciclasas.....	36
16. Efecto de ARN interferente (iARN) dirigido a las 11 guanilato ciclasas seleccionadas.....	37
17. Efecto de la aplicación de los 2 iARN que mostraron resultados significativos.....	38
18. Preferencia de presa ingerida en vacuola alimenticias con efecto de ARN interferente...39	
19. Preferencia general de presa ingerida en vacuola alimenticias con efecto de ARN interferente.....	40
20. Vacuola alimenticia sobrecargada post-inanición de 3 días.....	41
21. Esquema ilustrativo del proceso molecular hipotético que se propone como mecanismo de acción.....	42

Índice de cuadros

1. Organismos presa utilizados y sus características.....11
2. Preferencia de presas ingeridas proporcionadas por separado y en combinación.....28
3. Guanilato ciclasas seleccionadas para el tratamiento con iARN.....33

Bases moleculares de la alimentación en el ciliado *S.coeruleus*.

Iván Sosa Márquez.

Director de tesis: Fausto Arellano Carbajal

**Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales,
Laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva.**

Introducción

El ciliado *Stentor coeruleus*, perteneciente a la familia Stentoridae y a la clase Heterotrichidea es, como la mayoría de organismos del grupo, un organismo filtrador. Esto se refiere a que obtiene los nutrientes necesarios para sustentarse del medio acuoso en el que se desarrolla. Tiene como peculiaridad la capacidad de anclarse a un sustrato y establecerse en un estadio sésil temporal, extendiendo su cuerpo hasta una longitud de 0.5 mm para llevar a cabo un movimiento pendular y atrapar las presas que puedan recorrer la periferia de su alcance. Esto es logrado con un movimiento ciliar de membranelos especializados localizados en la zona aboral de membranelos, parte celular que con el batido efectuado por los cilios crea un vórtex que genera la fuerza suficiente para atraer a distintos tipos de presas al aparato oral del ciliado, para después ser consumidos (*fig.1*) (Tartar, 1961).

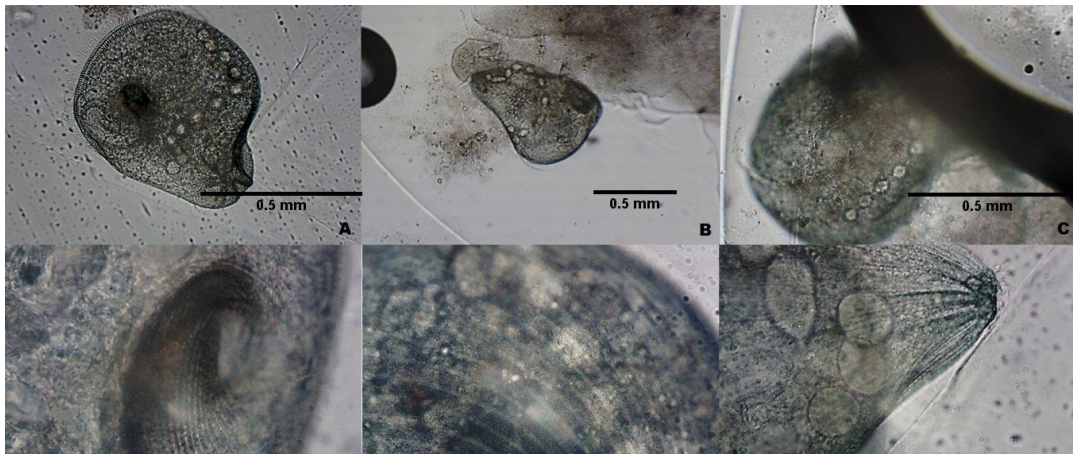


Figura 1: Partes anatómicas de *S. coeruleus*; (A, B y C) Distintos ángulos del núcleo moniliforme visible en forma de perlas en células contraídas completas. (D) aparato oral y apertura de citofaringe, con la bolsa oral apenas visible en el centro. (E) estrías pigmentadas. (F) pie de anclaje. Tomado de Sosa-Márquez (2015).

S. coeruleus es un organismo emergente como modelo de estudio en diferentes áreas y puede ser una herramienta experimental para entender los mecanismos genéticos y fisiológicos implicados en el comportamiento de forrajeo y alimentación en ciliados debido a sus características como modelo experimental, dado que es una célula gigante de alrededor de 0.5 mm con organelos fácilmente visibles (Slabodnick, *et al.* 2017, Tartar, 1961).

Una serie de comportamientos relacionados a la alimentación han sido catalogados y estudiados descriptivamente en el género *Stentor*. Existen estudios referentes a la preferencia de ingesta por *S. coeruleus* donde se han catalogado qué tipo de alimentos “decide” incorporar a su aparato digestivo después de ser “seleccionados” en la estructura aledaña al aparato oral llamada bolsa oral, presente en sólo algunas especies del género (Tartar, 1961, Shaeffer, 1910).

Una de las ventajas que presenta *S. coeruleus* como organismo modelo es la fácil visibilidad de vacuola alimenticias a lo largo de la estructura celular semi-traslúcida, lo que permite visualmente cuantificar objetivamente cuántas células está ingiriendo y cuál es su naturaleza, con ayuda de un microscopio simple de luz blanca.

El sistema PKG-cGMP puede tener importantes implicaciones en el proceso de alimentación del ciliado, por lo que se convierte en el principal sospechoso a descubrir. En este trabajo se busca entender cuáles son los mecanismos detrás del comportamiento alimenticio del ciliado *S. coeruleus* así como plantear una conexión del ciliado con modelos multicelulares sobre el esquema de la biología de la conducta.

Existen inhibidores específicos de guanilato ciclasas y proteínas cinasas tipo G que han probado una importante eficiencia deteniendo los procesos celulares que involucran a estas moléculas. Dos de estos fármacos son la Acenefteñoquinona y la Estauroesporina (Tamaoki, *et al.* 1986).

Recientemente se han implementado técnicas de silenciamiento de genes por medio del aprovechamiento de la maquinaria de ARN interferente (iARN) para catalogar funciones de ciertos genes involucrados en los procesos celulares de *S. coeruleus* (Slabodnick, *et al.* 2014). Una vez localizado el gen blanco a partir del mapa genético del ciliado, se pueden diseñar secuencias que empalmen con el

mismo, después provocando su expresión en un vector en forma de una doble cadena para activar el mecanismo de silenciamiento. Estas técnicas pueden ayudar a entender cómo los genes participan en un comportamiento desde sus interacciones y si estas funciones son conservadas a lo largo de la evolución.

En este trabajo se buscó descubrir los procesos moleculares participantes en el proceso de alimentación en *S. coeruleus*, así como plantear las bases para el estudio de la toma de decisiones y la preferencia de alimento en el ciliado.

En la serie de ensayos experimentales aquí presentados se obtuvo evidencia de la participación de las guanilato ciclasas y las cinasas en los procesos de alimentación y selección de presa en el ciliado *S. coeruleus*.

Antecedentes

Alimentación en el ciliado *S. coeruleus*

La variedad de la dieta de *S. coeruleus* ha sido descrita y catalogada en varias ocasiones, siendo resaltante el hecho de que puede consumir gran variedad de presas en su medio natural. Esta dieta puede incluir inclusive animales pequeños como rotíferos y ácaros, lo que hace resaltar a *S. coeruleus* entre otros organismos unicelulares como depredador (*fig. 2*). Se conoce la capacidad de seleccionar partículas en el medio por parte del ciliado *S. coeruleus*, mismo al que se le pueden presentar distintos tipos de partículas y éste incorporará diferencialmente las mismas en vacuola alimenticias, ingiriendo o desechando las mismas desde su aparato oral. Esta capacidad es inversamente proporcional al estatus de alimentación óptima del ciliado ya que en inanición, este puede llegar a ingerir indistintamente lo que se le presente, incluyendo carmín o tinta china suspendida (Shaffer, 1910).

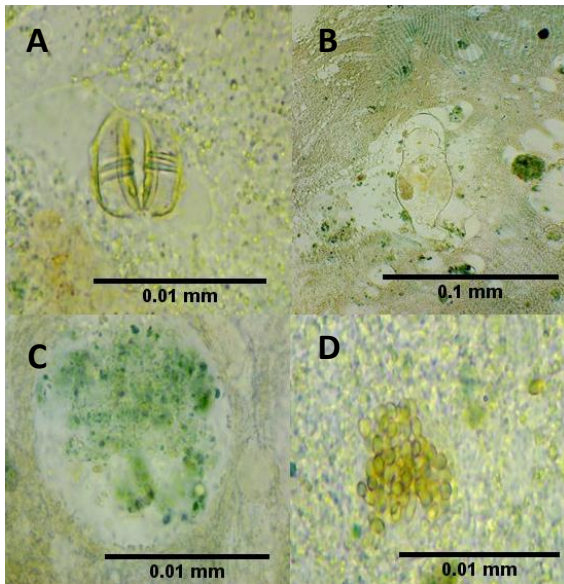


Figura 2: Diversidad de presas ingeridas por una célula de *S. coeruleus*. Se observan organismos variados atrapados en vacuolas alimenticias; Diatomeas (A), rotíferos (B), algas (C) y otros ciliados (D).

Las partículas incorporadas por las células de *S. coeruleus*, de pasar por el filtro de selección presente en la bolsa oral, son incorporadas en vacuolas alimenticias para su próxima digestión después de aproximadamente 20 minutos, tiempo en el que las vacuolas alimenticias se fusionan en lisosomas y se digiere completamente el alimento. Después de su digestión, y la incorporación de los nutrientes obtenidos, el excedente es expulsado por un poro presente en la membrana celular sujeto a una vacuola contráctil. (Rapport, 1972; Shaeffer, 1910).

Se sabe que la capacidad de selección e ingesta no solo depende del tipo de partícula, sino de la naturaleza de la presa a ser ingerida. Una vez presentados distintos tipos de presa, se notó que el ciliado *S. coeruleus* seleccionaba con mayor avidez y aparentemente prefería a los organismos heterótrofos (como otros ciliados) antes que a los autótrofos (como algas o células de *Euglena*) (Hetherington, 1932). A pesar de que el proceso de alimentación ha sido catalogado y bien estudiado en otros ciliados de los géneros *Paramecium* y *Tetrahymena*, no se conocen los mecanismos moleculares por los cuales los ciliados son capaces de ingerir las presas atrapadas (Satir, *et al.* 1993). Estos procesos incluyen la capacidad de los ciliados para atraer, atrapar, seleccionar e incluir a la presa en vacuolas alimenticias.

Funciones del citoesqueleto en la ingesta y procesamiento de presas

La remodelación citoesquelética es fundamental para que el proceso de ingesta se lleve a cabo, ya que distintos factores citoesqueléticos concertan la formación de las nuevas vacuolas alimenticias y el transporte de las mismas por la vía de digestión citoplasmática (Gaerting, *et al*, 2010). El citoesqueleto no sólo es indispensable para llevar a cabo la ingestión de presas, sino también los pasos subsecuentes (Allen, *et al*. 1974).

Se ha encontrado que los ciliados junto con otros protistas (como los microflagelados) se mueven hacia fuentes de alimento por medio de percepción basada en mecanismos de klinotaxis helical, respuestas cinéticas y percepción temporal de gradientes. Este movimiento es generalmente dirigido por la constante remodelación del citoesqueleto en coordinación con estas moléculas (Fenchel, 1999).

La implicación esencial del citoesqueleto en el proceso de alimentación para la formación de nuevas vacuolas alimenticias ha sido descrita con anterioridad.

Los microtúbulos son un factor importantemente implicado en el proceso de ingestión, seguido por el proceso de egestión descrito en ciliados como aquellos del género *Paramecium*, proceso logrado por el transporte de las vacuolas alimenticias a través del citoplasma por una serie de “rieles” de micro túbulos que direccionan el lisosoma después de su formación y cumplimiento de función (Allen, *et al*. 1974).

Se sabe que existen estructuras especializadas para los procesos de ingesta y formación de vacuolas alimenticias en ciliados, que efectúa movimientos parecidos a los de un esfínter, transfiriendo la presa del aparato oral a las vacuolas alimenticias. La cavidad oral de *Tetrahymena pyriformis* presenta estructuras denominadas “costillas” de microtúbulos, además de factores de contracción citoesquelética tipo miosina que permiten un movimiento de contracción que emula la función de un esfínter muscular. Este movimiento influye en la ingesta de partículas presa incorporada en vacuolas alimenticias, siendo el principal mecanismo por el que el contenido de presas en la zona aboral pasa a ser endocitado (Allen, *et al*. 1974). El movimiento descrito puede estar fuertemente

influenciado por proteínas motoras y estructurales del micro-filamento proteico en la célula.

Se conocen estructuras basadas en tubulina y miosina presentes en ciliados como *T. pyriformis* que permiten un movimiento de contracción tipo esfínter. (Sattler, *et al.* 1978).

La miosina es una proteína citoesquelética y estructural, cuya función permite contracciones y relajación de distintas estructuras celulares, con base en movimientos coordinados del citoesqueleto. La miosina en ciliados se concentra en todo el cito esqueleto, pero existe una concentración resaltante de la misma alrededor del aparato oral, lo cual podría indicar una interacción de ésta con los procesos de ingestión de presas en vacuolas alimenticias, más allá de su función en la estructuración de costillas orales (Gaerting *et al.*, 2010).

La formación de la vacuola alimenticia *de novo* depende de la interacción entre muchos factores, de los cuales los más importantes son tubulinas especializadas que permiten la separación de membranas por presión y halado físico. Las franjas presentes en el aparato oral funcionan como cordeles que halan y constriñen la membrana próxima al mismo, permitiendo la formación de la vacuola una vez que se ha incorporado alimento o partículas en la misma (Allen, *et al.* 1974) (*fig.3*).

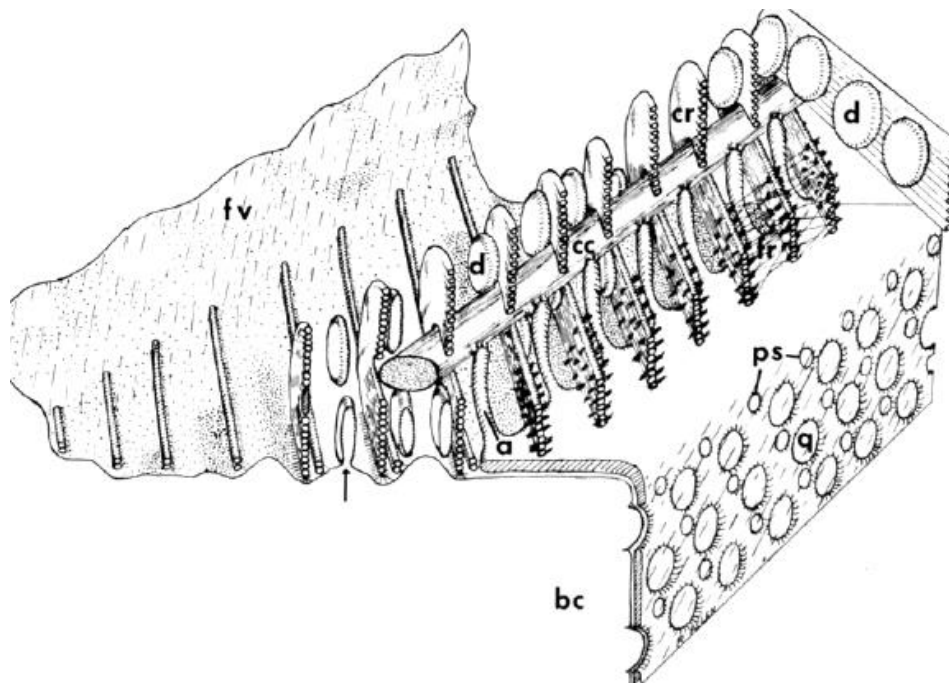


Figura 3.- Ilustración del papel de los microtúbulos en la formación de la vacuola alimenticia en *Paramecium caudatum*. Quadrulus (q), sacos parasomales (ps), vacuola alimenticia (fv), costillas citofaríngeas (cr), retículo filamentoso (fr), cordón articular (cc), discos limitantes de membrana (d). Tomado de Allen, *et al.* 1974.

Batido ciliar en la zona aboral de membranelos como factor esencial en la captura de presa

La dirección de batido ciliar es esencial para la ingesta de comida, ya que el primer paso de este proceso depende de atrapar a la presa. El movimiento ciliar y la dirección de batido determinan si la célula presa entra al aparato oral o se queda fuera de éste. La dirección del batido depende del potencial de membrana interno de la célula (Satir, *et al.* 1993).

Bases moleculares de la homeostasis energética en ciliados

Se han relacionado genes con el comportamiento de forrajeo e ingesta de alimento diferencial según polimorfismos o variantes alélicas en varios organismos eucariotas, siendo *Drosophila melanogaster* el primer organismo modelo en este aspecto (Osborne, *et al.* 1997).

El guanilil monofosfato cíclico (cGMP) funciona como señal en muchos procesos celulares en distintas rutas de señalización. Además de funcionar como regulador de la homeostasis energética, ayuda a reestructurar el citoesqueleto y generar estructuras emergentes, entre las que se encuentran las vacuolas. Este proceso es llevado a cabo gracias a la activación de la fosforilasa de cadena ligera de miosina, a través de la interacción por proteínas cinasas dependientes de cGMP y canales iónicos permeables a calcio y potasio (Allen, *et al.* 1974).

Una de las rutas que influyen la formación de vacuolas *de novo* es consecuencia de la activación de proteínas cinasas dependientes de cGMP y la previa activación de su efector inmediato, las guanilato ciclasas. Se sabe que bajo ciertos estímulos, las guanilato ciclasas pueden influir en la activación de la fosfatasa de miosina de cadena ligera, utilizando como intermediaria la activación de la subunidad alfa de una proteína cinasa dependiente de cGMP. Este proceso provoca la reestructuración de las cadenas de micro túbulos basados en actina y miosina, e influye en la

contracción o relajación de las mismas, influenciando los procesos que dependen de cambio de estructura en secciones celulares específicas (Sharma, 2002).

Distintos fenotipos conductuales en forrajeo y alimentación parecen redundar en genes que codifican para proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico (PK-cGMP) a lo largo de la filogenia eucariota, presentándose distintos fenotipos conductuales dependientes de este sistema molecular en organismos base de los animales pluricelulares como lo son los nematodos (Fujiwara, *et al.* 2002).

Homeostasis energética regulada por guanilato ciclasas y proteína cinasas en organismos eucariontes

Los comportamientos de alimentación y forrajeo son buenos ejemplos del impacto que pueden tener pocos genes en un fenotipo conductual (Marler, 1990). Se ha encontrado en diversos organismos modelo que existen dos fenotipos conductuales dependientes de alelos o de regulación variable de un gen conservado llamado *for* por "Foraging", cuyo producto es una proteína-cinasa dependiente de cGMP (Osbourne, *et al.* 1997). El gen *for* ha demostrado ser determinante para ciertos fenotipos conductuales en algunos grupos muy separados evolutivamente como artrópodos (*D. melanogaster*) y nematodos (*Caenorhabditis elegans*), donde existen en ambos casos dos tipos de individuos con distintos modos de forrajeo. En este esquema y en la misma especie se encuentran aquellos que buscan el alimento en áreas grandes con mayor movilidad dentro de su medio ("rover" y "roamer"), y los que se quedan cerca de un área determinada y no exploran el medio de modo tan intensivo en busca de alimento ("sitter" y "dweller" respectivamente). Los mismos procesos en otros organismos (abejas, hormigas) tienen un impacto dependiente de la etapa de desarrollo del organismo, en la que este grupo de genes se ve expresado de distinta manera a lo largo de la vida del sujeto por procesos epigenéticos como metilaciones. Se ha encontrado que dichos procesos presentan una relación similar gen-comportamiento cuyo punto de control y mecanismo parece girar en torno a ortólogos de la proteína-cinasa dependiente de cGMP, *for* (Osborne, 1997; Fujiwara, *et al.* 2002, Marler, 1990).

La capacidad de percibir nutrientes está conservada en todos los seres vivos, y es fundamental para la supervivencia y adecuación de todos los organismos conocidos. Genes implicados en la capacidad de percepción de nutrientes han sido catalogados en varios grupos taxonómicos, destacando genes únicos de eucariotas que tienen dicho efecto como los predecesores de proteínas tipo *AMPK*, *GCN2* y *TOR*. Estos genes son esenciales en los organismos heterótrofos como sensor de fuentes de energía como azúcares, lípidos y moléculas estructurales, como aminoácidos. Lo anterior refiere a un proceso complejo con muchos factores que están dirigidos a la decisión de incorporar alimento, y al proceso de preferencia y selección de alimento que el organismo va a incorporar a su sistema (Chantranupong, 2015).

Se tiene muy poca información respecto a la presencia de ortólogos del gen *for* (proteínas-cinasas dependientes de cGMP) o de alguno de los genes anteriormente mencionados implicados en la decisión de ingesta o preferencia de la misma en protistas. La mayoría de los trabajos que engloban procesos y mecanismos de la incorporación y preferencia de alimento han hecho a un lado a los organismos protistas, a pesar de ser una pieza base de la evolución de los eucariontes, por lo que hace falta indagar al respecto.

Las guanilato ciclasas influyen en el proceso de reestructuración, relación y contracción de microtúbulos en el cito esqueleto, estando implicadas en procesos específicos y relativamente rápidos. Así mismo, cabe destacar que las guanilato ciclasas presentes en ciliados, presentan una particularidad estructural a diferencia de las guanilato ciclasas del resto de los eucariontes, ya que presentan un dominio de ATP asa sin una función ligada directamente hasta la fecha (Sharma, 2002).

Concentraciones altas de miosina han sido ubicadas cerca de la zona aboral en el ciliado *Paramecium* (Gaerting, *et al.* 2010), por lo que la interacción entre la misma con las guanilato ciclasas y las proteína cinasas puede tener efecto en los primeros pasos (captura de presa y formación de vacuolas alimenticias) de la alimentación en ciliados.

Hipótesis

El proceso de ingesta e incorporación de presas a las vacuolas alimenticias está influenciado por el sistema molecular de guanilato ciclasas y proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico.

Objetivo general

Encontrar los grupos de genes y proteínas involucradas en el comportamiento de alimentación, selección e incorporación de presas en vacuolas alimenticias en el ciliado *S. coeruleus*.

Objetivos específicos

- 1.- Determinar el número de células presa y la preferencia entre distintas especies que el ciliado incorpora en vacuolas alimenticias.
- 2.- Identificar grupos de proteínas candidatas que pudieran estar implicados en el comportamiento de incorporación y preferencia de presas ingeridas.
- 3.- Encontrar genes específicos implicados en los procesos funcionales de ingestión y preferencia de presas
- 4.- Esquematizar un posible sistema funcional con los resultados encontrados según los genes involucrados.

Materiales y métodos

Colecta y cultivo de *S. coeruleus*

El ciliado *S. coeruleus* fue localizado y colectado en la presa de Juriquilla, en la provincia de Juriquilla, Querétaro, México (20°42'07.59" N, 100°27'37.75" O) en distintas colectas, iniciadas en octubre del año 2014. Se aisló y cultivó en medio modificado de *S.*(MSM), a 23 °C en luz tenue indirecta, dentro de un matraz de medio litro; 0.75 mM Na₂CO₃, 0.15 mM KHCO₃, 0.15 mM NaNO₃, 0.15 mM KH₂PO₄, 0.15 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, y 1.47 mM NaCl (Tartar, 1961; De Terra,1966). Para los procesos experimentales, el ciliado *S.*fue aislado y cultivado en agua de manantial limpia y sellada a 23 °C en luz tenue indirecta, dentro de un matraz de medio litro.

Selección de organismos presa

En este estudio se utilizaron tres organismos presa con diferentes características estructurales y una distancia filogenética considerable entre sí, esto para presentar opciones sustancialmente diferentes a *Stentor*, de manera que la preferencia de ingesta de éstos fuese más notoria. Los organismos seleccionados para este estudio son *Chlorella vulgaris* (Plantae), *S. cerevisiae* (Opisthonokontes) y *Euglena gracilis* (Excavata), cada uno con características morfológicas y anatómicas distintas (Cuadro 1) (Bicudo, 2016).

Organismo	Tipo de pared celular	Tamaño (µm)	Motilidad
<i>Chlorella vulgaris</i>	Celulosa	8-10	Mínima
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Quitina	10-13	Nula
<i>Euglena gracilis</i>	-	30-50	Media

Cuadro 1.- Organismos presa utilizados y sus características (pared celular, tamaño y motilidad)

Obtención de organismos presa

C. vulgaris se obtuvo del laboratorio de algas continentales de la Universidad Nacional Autónoma de México por transacción indirecta.

S. cerevisiae se adquirió de la marca comercial “tradipan®” en presentación seca y sellada.

E. gracilis se obtuvo de Carolina Supplies Company® por medio de la UCSF, California, San Francisco.

Cultivo de organismos presa

C. vulgaris fue mantenida en medio Bold modificado, utilizando como fuente de nitrógeno y sulfatos fertilizante comercial y la proporción de sales siguiente; 0.5 mM Na₂CO₃, 0.15 mM KHCO₃, 0.1 mM NaNO₃, 0.1 mM KH₂PO₄, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, y 1.5 mM NaCl. El alga creció de manera adecuada y constante en luz indirecta y a temperatura ambiente con oxigenación constante. Lo anterior logra una

concentración aceptable después de 5 días de crecimiento posteriores a la incorporación en medio fresco de un inóculo de 5 mL de un cultivo previo.

S. cerevisiae fue cultivada en medio LB (NaCl 5.0g, Extracto de levadura 5.0g, Peptona 10.0g por cada 500mL) a temperatura ambiente (2 mg en 15ml de LB por 24 horas).

E. gracilis se mantuvo en extracto de arroz y trigo (8 granos de trigo por cada 20 de arroz) y K_2HPO_4 0.1 M con luz indirecta a temperatura ambiente.

Descripción del proceso de ingesta

El proceso de ingesta en *Stentor* no ha sido descrito a profundidad, por lo que parte de este ensayo experimental incluye una descripción puntual del mismo.

- Dirección de movimiento ciliar de la banda aboral de membranelos y atracción de presas a vórtex oral

Se observó la capacidad de atrapar presas de una célula de *Stentor* según la dirección de batido ciliar. Se colocó una célula de *Stentor* previamente aislada (24 h) en un pozo de plástico con 0.5 ml de agua de manantial. Se saturó el medio con *S. cerevisiae* (500 células x mm^2). Se establecieron dos grupos experimentales. El primer grupo sólo contenía agua de manantial, una célula de *Stentor* y *S. cerevisiae* (aproximadamente 100 células x μL). El segundo grupo se encontraba en una solución 0.3 mM de KCl, una célula de *Stentor* y *S. cerevisiae*.

Se observó la dirección de batido ciliar y el número de células ingeridas de *S. cerevisiae* posterior a 5 minutos de exposición en ambos grupos.

- Visualización de incorporación de presas a bolsa oral

Se saturó el medio de inducción (agua de manantial) con cada una de las presas y se observó el proceso de captura e incorporación de la presa por una célula de *Stentor* previamente colocada y en estado sésil. Se contó el número de células presa ingeridas en un tiempo de 15 segundos. El tiempo que dichas células presa

ingeridas pasaban en la bolsa oral antes de ser incorporadas fue medido. Así se denotó cuántas células se encontraban en la bolsa oral antes de ser ingeridas para ser incluidas en una vacuola alimenticia.

- Formación de vacuola a partir del contenido de la bolsa oral

Se observó el proceso de traslado del contenido de la bolsa oral hacia la formación de una vacuola alimenticia con las tres presas (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*). Los tiempos de traslado y oclusión de la vacuola fueron medidos.

- Caracterización de factores que influyen en el tamaño de la vacuola

Se añadieron distintas densidades de *E. gracilis* y *C. vulgaris* con ayuda de una cámara de Neubauer (100 células x mm², 500 células x mm² y 1000 células por mm²) en 500µL de agua de manantial en un pozo de plástico (caja de 12 pozos) con una célula de *Stentor* sésil previamente aislada (48 hrs) en el fondo del pozo. Lo anterior con el objetivo de discernir si el tamaño de la presa es determinante del tamaño de la vacuola alimenticia o si es el número de presas disponibles lo que lo determina.

Se le permitió a la célula de *Stentor* alimentarse por 5 minutos, después se midió el tamaño de las vacuola alimenticias por medio de análisis digital de imágenes.

- Digestión de los diferentes organismos presa

Se saturó el medio de inducción (agua de manantial) con cada una de las presas y se permitió a una célula de *Stentor* previamente colocada y en estado sésil ingerir a las distintas presas por separado durante un tiempo de 5 minutos. Después se aisló y lavó con agua de manantial a la célula de S.5 veces para eliminar las presas residuales. Se midió el tiempo en el que el número de células ingeridas de cada tipo de presa igualaban a cero, asumiendo así que la digestión se completó y que los materiales celulares de la presa fueron asimilados.

Bioensayo de preferencia de presa

Un día previo al experimento se cultivaron en medios frescos los organismos presa. *C. vulgaris* se colocó en 50 mL de medio Bold modificado (50 mL de inóculo de medio previamente crecido) y se dejó reposar con exposición a luz tenue y buena oxigenación (frasco contenedor destapado) a temperatura ambiente

S. cerevisiae se colocó en forma de inóculo sólido (0.5 g) en 50 mL de medio YPD fresco y estéril a temperatura ambiente.

E. gracilis fue aislada en agua manantial fresca un día previo con luz indirecta y buena oxigenación a temperatura ambiente.

Las células de *Stentor* utilizadas en este experimento fueron puestas en inanición por aislamiento un día previo a cada experimento.

Se colocó una sola célula de *S. coeruleus* en previa inanición en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL en agua manantial una hora previa al experimento. Lo anterior con el fin de que la célula recién colocada se adapte al nuevo ambiente y tenga tiempo de recuperarse de micro lesiones que pudieran haberse generado por el movimiento desde su medio nativo, así como para permitir que la célula se ancle a las paredes del tubo para facilitar su alimentación por filtración.

Los medios preparados el día anterior de los organismos presa fueron agitados y un mL de cada uno con células de la presa respectiva suspendidas colocado en tubos de microcentrífuga estériles de 1.5 mL por separado. Los tubos contenedores de las presas fueron centrifugados a 10,000 RPM por 3 minutos, el sobrenadante fue retirado y el pellet se conservó.

Se buscó que la masa total del pellet fuera proporcional al tamaño comparado de las presas, de manera que existiera aproximadamente el mismo número de células en cada pellet independientemente del tamaño. Para este fin se pesaron los tubos de microcentrífuga con el pellet y se compararon con el peso de uno vacío. La diferencia en masa entre ambos tubos da como resultado la masa total del pellet. Se buscó que la masa en cada pellet fuera proporcional al tamaño de la presa, de tal suerte que si el tamaño de *C. vulgaris* es 4 veces menor que el de *E. gracilis*, el pellet de *E. gracilis* debió ser 4 veces mayor que el de *C. vulgaris*. Para lograr este

cometido se repitió la centrifugación con medio de crecimiento las veces necesarias para conseguir las proporciones.

Para asegurarse de que el método mantiene el mismo número de células al final del pesaje de pellet, se hicieron conteos celulares en cámara de Neubauer.

Una vez que se obtuvieron números proporcionales en los conteos celulares, las presas se re suspendieron en 500 μ L de agua de manantial por separado.

Se añadieron 20 μ L de cada presa al tubo de microcentrífuga con una sola célula de *Stentor* por separado (10 repeticiones por especie de presa) y se le permitió a la célula de *Stentor* alimentarse libremente por 5 minutos.

Después de la alimentación con especie única de presa la célula de *Stentor* fue extraída del medio y colocada en un portaobjetos de vidrio con 50 μ L de agua de manantial. Una vez colocada, la gota con la célula de *Stentor* fue presionada con un cubreobjetos de vidrio para permitir la observación bidimensional de las vacuolas alimenticias recién formadas con la célula aún viva pero inmóvil.

Se contó el número de células presentes en las vacuolas alimenticias de cada especie de presa por separado, tomando la media de éstos como el 100% de la ingesta de cada tipo celular.

Posterior a la alimentación con presa única se llevó a cabo un ensayo de alimento en combinación, donde se presentaron las 3 presas combinadas en 60 μ L en un mismo evento y se permitió a la célula de *Stentor* alimentarse de las mismas durante 5 minutos.

Después de la alimentación con especies combinadas de presa la célula de *Stentor* fue extraída del medio y colocada en un portaobjetos de vidrio con 50 μ L de agua de manantial. Una vez colocada, la gota con la célula de *Stentor* fue presionada con un cubreobjetos de vidrio para permitir la observación bidimensional de las vacuolas alimenticias recién formados con la célula aún viva pero inmóvil con ayuda de un microscopio de luz blanca con aumento a 20 y 40X.

Se contó el número de células de cada especie presentes en las vacuolas alimenticias, cuya media fue comparada con la media de ingestión de presa única, siendo este segundo conteo un porcentaje de preferencia en condiciones de múltiples presas en el medio.

Las medias de ambos ensayos (presa única y presas combinadas) fueron comparadas en porcentaje, denotando qué presa es la que *Stentor* prefiere sobre las demás y cuál es la que menos incorpora.

Preparación de soluciones de los fármacos Aceneftenoquinona y Estauroesporina.

La Aceneftenoquinona (Sigma Aldrich® presentación en polvo) es soluble en alcohol. Se utilizó una concentración final de 1% en EtOH (0.7% +H₂O) para la preparación de la solución de trabajo, concentración que probó no ser perjudicial para las células tratadas. La Estauroesporina fue utilizada con una pureza (HPLC) 95% según el manual de uso (concentración final 10 mg/mL en DMSO).

Efecto citotóxico del inhibidor de guanilato ciclasas Aceneftenoquinona en células de *S. coeruleus*

Se colocaron 30 células de *S. coeruleus* en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se añadieron distintas concentraciones de Aceneftenoquinona (Acq) (0.001, 0.01, 0.1 y 1 M) al medio, y después de 20 minutos, las células fueron lavadas 3 veces con agua manantial. Se montaron las células en un portaobjetos en gotas de 100 µL por portaobjetos y se observaron en microscopio de luz blanca con aumentos 20X y 40X. Se contó el número de células sobrevivientes al tratamiento (tasa de supervivencia), tomando en cuenta características indicadoras de células dañadas o muertas como parámetro para delimitar el estado de cada célula (apoptosomas, pérdida de la estructura, despigmentación, disolución de nucleómeros).

Efecto citotóxico del inhibidor de Proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico Estauroesporina en células de *S. coeruleus*

Se colocaron 30 células de *S. coeruleus* en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se añadieron distintas concentraciones de Estauroesporina (Stau) (0.001 0.01, 0.025, 0.075 y 0.1 M) al medio, y después de 20 minutos, las células fueron lavadas 3 veces con agua manantial. Se montaron las células en un portaobjetos en gotas de 100 µL por portaobjetos y se observaron en microscopio de luz blanca con

aumentos 20 y 40X. Se contó el número de células sobrevivientes al tratamiento (tasa de supervivencia), tomando en cuenta características indicadoras de células dañadas o muertas como parámetro para delimitar el estado de cada célula (apoptosomas, pérdida de la estructura, despigmentación, disolución de nucleómeros).

Efecto del inhibidor de guanilato ciclasas Acenftenoquinona en la ingestión de presas

Se colocó una sola célula de *S. coeruleus* en previa inanición parcial en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL en agua manantial 1 día previo al experimento. La inanición previa es necesaria para que *Stentor* ingiera una cantidad sustanciosa de alimento en las ventanas permisivas que se efectúan en este experimento.

Se llevó a cabo un ensayo de alimento en combinación, donde se presentaron las 3 presas combinadas en 60 μ L en un mismo evento y se permitió a la célula de *Stentor* alimentarse de las mismas durante 5 minutos. Después de la alimentación combinada se contó el número de células de cada especie que el ciliado ingirió durante el periodo permisivo. Lo anterior funcionó como control positivo para comparar los datos con las presas tratadas con Acenftenoquinona.

Diez minutos previos al periodo permisivo de alimentación (5 minutos) con presas combinadas se añadieron al grupo tratado con el fármaco distintas concentraciones de Acenftenoquinona (Acq) (0.001, 0.01, 0.1 y 1 M). Después de la alimentación con especies combinadas y de la adición de Acq al medio de presa la célula de *Stentor* fue extraída del medio y colocada en un portaobjetos de vidrio con 50 μ L de agua de manantial. Una vez colocada, la gota con la célula de *Stentor* fue presionada con un cubreobjetos de vidrio para permitir la observación bidimensional de las vacuolas alimenticias recién formados con la célula aún viva pero inmóvil con ayuda de un microscopio de luz blanca con aumento a 20 y 40X. Este experimento se llevó a cabo con un número de muestra de 10 células.

Efecto del inhibidor de Proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico Estauroesporina en la ingestión de presas

Se colocó una sola célula de *S. coeruleus* en previa inanición en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL en agua manantial 1 día previo al experimento. La inanición previa es necesaria para que *Stentor* ingiera una cantidad sustanciosa de alimento en las ventanas permisivas que se efectúan en este experimento.

Se llevó a cabo un ensayo de alimento en combinación, donde se presentaron las 3 presas combinadas en 60 μ L en un mismo evento y se permitió a la célula de *Stentor* alimentarse de las mismas durante 5 minutos. Después de la alimentación combinada se contó el número de células de cada especie que el ciliado ingirió durante el periodo permisivo. Lo anterior funcionó como control positivo para comparar los datos con las presas tratadas con Acenftenoquinona.

Diez minutos previos al periodo permisivo de alimentación con presas combinadas se añadieron al grupo tratado con el fármaco distintas concentraciones de Estauroesporina (Stau) (0.001, 0.01, 0.025, 0.075 y 0.1M). Después de la alimentación con especies combinadas y de la adición de Acq al medio de presa la célula de *Stentor* fue extraída del medio y colocada en un portaobjetos de vidrio con 50 μ L de agua de manantial. Una vez colocada, la gota con la célula de *Stentor* fue presionada con un cubreobjetos de vidrio para permitir la observación bidimensional de las vacuolas alimenticias recién formadas con la célula aún viva pero inmóvil con ayuda de un microscopio de luz blanca con aumento a 20 y 40X. Este experimento se llevó a cabo con un número de muestra de 10 células.

Localización de genes candidatos como participantes en el proceso de alimentación del ciliado *S. coeruleus*

Utilización de genoma secuenciado de *S. coeruleus*

La base de datos del genoma nuclear secuenciado del ciliado *S. coeruleus* fue proporcionado el grupo de investigación del Dr. Wallace Marshall (Departamento de Bioquímica, Universidad de California en San Francisco (Slabodnick, *et al.* 2017).

Los genes candidatos del genoma de *S. coeruleus* fueron localizados según marcos de lectura abiertos con dominios funcionales conservados con ayuda del software y

lenguaje PYTHON. Los genes modelo fueron anotados en una base de datos con formato FASTA.

Localización de genes ortólogos en *S. coeruleus*

La localización de genes ortólogos se llevó a cabo según los procedimientos planteados por Sokolowski (2005). Se siguieron los siguientes pasos en el software BLAST 2.4.0 del NCBI:

Genes candidatos

1.- Se obtiene el gen candidato (ejemplo hipotético en caso de que se busque el gen *for* de *D. melanogaster*); *for* (PKG-cGMP dependent) de *D. melanogaster* en formato FASTA de la base de datos del NCBI (genbank).

2.- Se localizaron en el gen *for* de *D. melanogaster* los marcos de lectura abiertos presentes (ORFs), analizando cada uno de ellos en el software gratuito en línea HMMER para descartar marcos no funcionales y señalar aquellos con dominios funcionales (quinasas con dominios de unión a cGMP).

3.- Se tradujeron las secuencias de nucleótidos a aminoácidos en el software CLC sequence viewer, confirmando con el producto que se tratase de una cinasa dependiente de cGMP, utilizando la herramienta BLASTp del NCBI.

4.- Una vez confirmada la naturaleza de la secuencia, se creó un folder con la secuencia en una carpeta de trabajo predefinida de la herramienta de BLAST 2.0.4

5.- La carpeta se direccionó en el command prompt cambiando de directorio a la carpeta predefinida, con la base de datos (secuencia del genoma completo de *S. coeruleus*) para obtener un archivo de texto con los distintos loci del genoma que compartían homología con la secuencia obtenida de *D. melanogaster* (ejemplo asumiendo que se guardó el archivo en la carpeta de documentos y que se creó dentro de ésta una carpeta específica denominada blast-2.4.0) ;

```
cd\
```

```
cd\Users\username\Documents\blast-2.4.0+
```

```
makeblastdb -in Stentorgenome.fasta -dbtype nucl
```

```
tblastn -db Stentorgenome.fasta -query ((query.fa)) -out outputfile.txt
```

6.- Se selecciona la secuencia que comparta mayor homología con el gen buscado (ejemplo asumiendo que se busca una proteína cinasa dependiente de GMP cíclico [for]); PKG-cGMP (*for*) de *D. melanogaster*.

Selección de guanilato ciclasas

Se seleccionaron las guanilato ciclasas a utilizarse en este estudio con el método anterior, en las que se buscaron características en común, como dominios de unión a guanilato conservados. Pero también se buscó integrar algunas GCs con características representativas de otro tipo de moléculas, afines al mismo grupo funcional. En éste segundo grupo se incluyeron guanilato ciclasas con afinidad a adenilato y secuencias parciales de la guanilato ciclasa que sólo presentaran en su secuencia el dominio de unión a guanilato y no la estructura completa de la guanilato ciclasa. Cada guanilato ciclasa se seleccionó según su homología por dominios con ayuda de la herramienta en línea HMMER (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer>).

Diseño de árbol cladístico filogenético de las guanilato ciclasas presentes en el genoma de *S. coeruleus*

Se obtuvieron las secuencias de guanilato ciclasas y sus afines del genoma del ciliado *S. coeruleus* gracias a la colaboración con el grupo del Dr. Marshall F. Wallace. Las secuencias de todos los genes de éste tipo (72) fueron manejadas en el software “CLC sequence viewer”. Las secuencias fueron ordenadas y traducidas a aminoácidos, con los cuales se construyó un árbol filogenético cladístico con los parámetros de la función de Neighbour joining, lo anterior con el fin de agrupar las distintas secuencias de proteínas en clados y localizar en cuáles de éstos se encuentran las secuencias previamente seleccionadas por su homología.

Efecto del ARN interferente dirigido a guanilato ciclasas en la selección de alimento

Se utilizaron bacterias transformadas de *E. coli* HT115, con un plásmido transformado que contenía: un gen de resistencia a kanamicina y 11 diferentes genes (uno por cepa) insertados de guanilato ciclasas encontradas en *S. coeruleus* criado

en laboratorio (Carolina supplies®). Las bacterias transformadas fueron provistas por colaboración con la Universidad de California, San Francisco (UCSF), Departamento de Bioquímica y Biofísica, en comunicación con el Dr. Wallace Marshall y la Dra. Tatiana Makushov. Las guanilato ciclasas fueron denominadas por números (3, 11, 14, 16, 23, 24, 30, 31, 34, 35, 38), en orden descendente según su grado de homología secuencial con dominio de unión a guanilato, según los parámetros de la aplicación bioinformática en línea HMMER.

La guanilato ciclasa “11” y la guanilato ciclasa “3”, comparten afinidad por adenilato, además de por guanilato, según los parámetros informáticos manejados.

Se siguió el procedimiento utilizado por Slabodnik, *et al.* (2014) para activar la maquinaria de RNAi en *S. coeruleus* por medio de la alimentación con bacterias transformadas. En el proceso se alimentó durante 5 días a los ciliados con bacterias de la sepa HT115, transformadas con un gen inserto blanco específico de *S. coeruleus* (un gen por cepa) y un gen de resistencia a antibiótico para su selección. La expresión del gen a partir del plásmido vector fue inducida 6 horas antes de la alimentación con IPTG, posteriormente aislando, lavando y alimentando a los ciliados con las bacterias según su grupo experimental. Para el proceso anteriormente descrito se utilizaron un control negativo (plásmido sin genes de *Stentor*) y uno positivo (transformante con inserto del gen Mob1, involucrado en la estructuración del citoesqueleto).

Después se observó el fenotipo conductual de incorporación de alimento en los diferentes grupos inducidos por el vector HT115, probando así once guanilato ciclasas y su efecto en dicho comportamiento.

Se hicieron 10 repeticiones por cada guanilato ciclasa utilizando como control positivo *Stentor* tratados con Acenefenoquinona y como control negativo bacterias HT115 sin ningún gen de *S. coeruleus* inserto.

Análisis de datos.

Los datos de los ensayos de preferencia de presas fueron analizados con un análisis de medias comparada siguiendo los métodos de comparación usados por Rapport (1972).

Los ensayos de efecto farmacológico sobre el comportamiento fueron analizados utilizando comparación de media tipo ANOVA.

La distribución de los datos fue ajustada con una examinación de histograma y ajuste a modelo.

El análisis de los datos de efecto de los Knock-down inducidos con ARN interferente y aquellos de preferencia de presa bajo el mismo esquema fueron realizados bajo un modelo lineal generalizado ajustado bajo los parámetros de la distribución tipo Poisson no simétrica. Se utilizó la fórmula de Bonferroni, ajustando según el número de grupos a comparar, con el fin de reducir la probabilidad de cometer un error tipo 1.

Todos los análisis estadísticos fueron efectuados con el software de libre acceso “R studio®” (<https://www.rstudio.com>).

Los análisis de secuencias fueron llevados a cabo con las aplicaciones HMMER para análisis de biosecuencias y Blast 2.4.0, ambos accesibles en línea de forma gratuita gracias al Instituto de Bioinformática Europeo (EBI) y al Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) respectivamente.

Resultados

Descripción del proceso de ingesta

- Dirección de movimiento ciliar de la banda aboral de membranelos y atracción de presas a vórtex oral

La dirección de batido ciliar es un elemento indispensable en la entrada de las células presa a la cavidad oral del ciliado *S. coeruleus*. El batido ciliar que el ciliado lleva a cabo cuando se alimenta es direccionado en un espiral entrante dextrógiro hacia la bolsa oral. El movimiento de los membranelos crea un vórtex entrante para

atraer a las presas gracias a la hiperpolarización de la membrana celular efectuada gracias a canales iónicos que mantienen la membrana con una carga negativa interna. La despolarización de la membrana genera un ambiente de cargas negativas en el interior de la membrana y cambia la dirección del batido de la banda aboral de membranelos en dirección levógira. La corriente generada en condiciones depolarizantes expulsa a las presas que pudieran entrar en la cavidad oral, por lo que el número de presas ingeridas después de la despolarización momentánea es igual a cero hasta que se recupera la hiperpolaridad membranal por intercambio funcional de canales iónicos. El KCl utilizado en este ensayo provocó el batido reverso de la banda aboral de membranelos, por medio de la despolarización membranal con el ion K^+ . Las células de *Stentor* tratadas con esta carga iónica no consumieron presas y expulsaron aquellas que se acercaban al aparato oral. Las células no tratadas consumieron normalmente las presas proporcionadas (*fig. 4*).

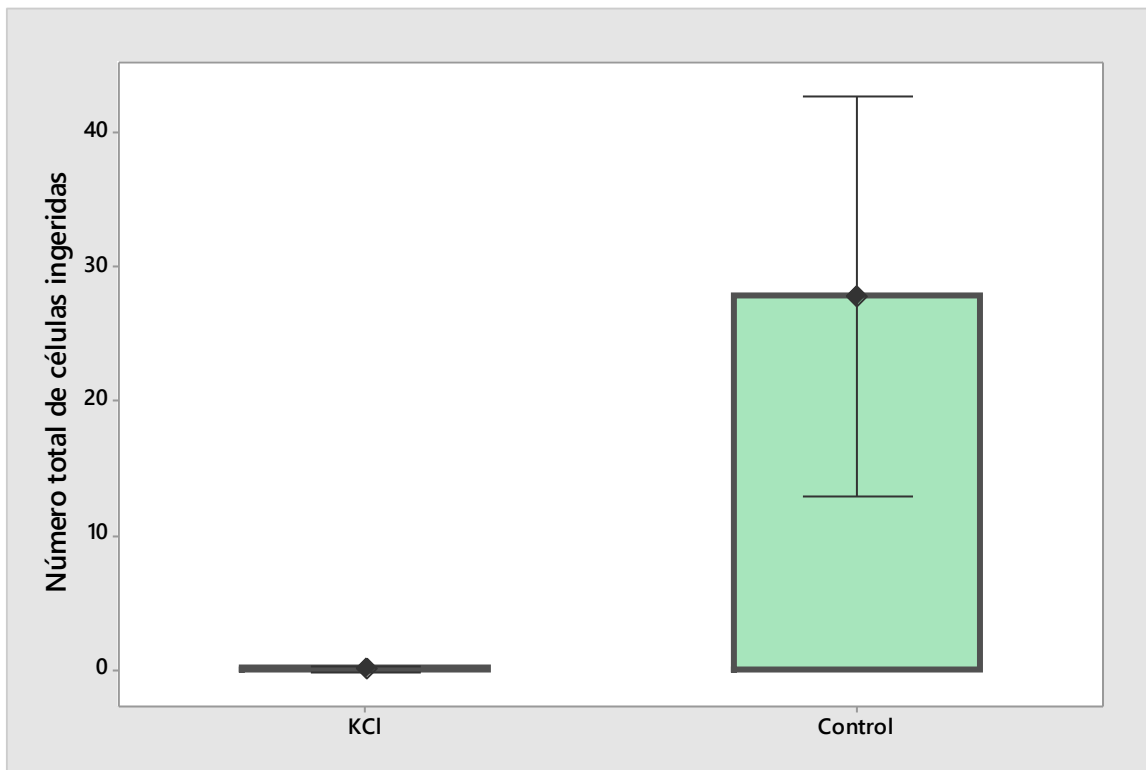


Figura 4.- Efecto del cloruro de potasio 0.3 mM en el número total de células presa ingeridas. N= 20.

- Visualización de incorporación de presas a bolsa oral

Las células presa son atrapadas en la bolsa oral antes de pasar por la citofaringe hacia la vacuola alimenticia. La bolsa oral parece funcionar como “vestíbulo “de entrada, ya que el paso hacia las vacuolas no es inmediato en condiciones de alimentación normal. En condiciones de inanición las presas pasan prácticamente de inmediato a formar parte de la vacuola alimenticia. La función de la bolsa oral no es del todo clara, pero se observa movimiento de las presas provocado por el ciliado dentro de la bolsa, lo que pudiera indicar un proceso sensorial probablemente importante para la selección interna de la presa a ser integrada. El paso de la bolsa oral es bidireccional, siendo así que las células ingeridas pueden pasar en ambas direcciones, desde la bolsa hacia la banda aboral de membranelos y en la dirección opuesta cuando éstas van a ser incorporadas. El proceso anterior parece depender de la dirección de batido ciliar en la zona aboral de membranelos.

- Formación de vacuola a partir del contenido de la bolsa oral

El paso de la bolsa oral a la vacuola alimenticia no es un proceso continuo. Las presas atrapadas pasan de 2 a 10 segundos antes de ser transferidas a una especie de “puerta” celular parecida a un esfínter. El esfínter se mantiene cerrado o parcialmente cerrado hasta un “momentum” de paso en el total de las presas atrapadas en la bolsa oral se incorporan a de la vacuola alimenticia. Este proceso parece estar coordinado con la formación de las nuevas vacuolas alimenticias en la célula.

- Factores que influyen en el tamaño de la vacuola

El tamaño de la presa no es proporcional al tamaño de la vacuola alimenticia ofagosoma, al parecer el tamaño de la misma es determinado por el tiempo de apertura del esfínter que limita la bolsa oral y la vacuola en formación, funcionando como un globo siendo inflado. En este escenario analógico, la vacuola es el globo, el flujo de aire son las presas siendo transportadas y la boquilla del globo es la estructura parecida a esfínter en el conducto citofaríngeo (*figs. 5, 6 y 7*).

- Digestión de los diferentes organismos presa

El tiempo en el que los organismos presa son digeridos y excretados depende de la naturaleza de éstos. El tiempo de digestión de *E. vulgaris* es el más corto, siendo de 4 a 6 horas, seguido por el tiempo en el que se lisa la última célula de *S. cerevisiae*, que suele ocurrir en un período de 1 a 2 días posterior a la alimentación. Las células de *C. vulgaris* pueden durar íntegras dentro de lisosomas en períodos de hasta 7 días, lo que coincide con lo reportado en otras especies de ciliados que se alimentan de *C. vulgaris*, procesos que han sido inclusive catalogados como “endosimbiosis tempranas” (Kodama, *et al.* 2007).

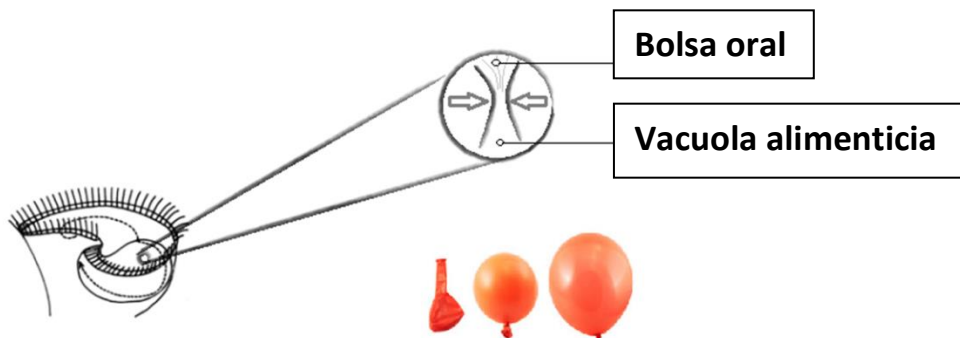


Figura 5: Esquema ilustrativo del proceso de contracción que se lleva a cabo en la unión entre la bolsa oral y la próxima vacuola alimenticia a formarse. Una vez contraída por completo la coyuntura, y cerrado el paso de partículas, se forma la nueva vacuola alimenticia con su contenido, todo orquestado por un “momentum” de ingesta definido por el tiempo de relajación y contracción de la apertura citofaríngea.

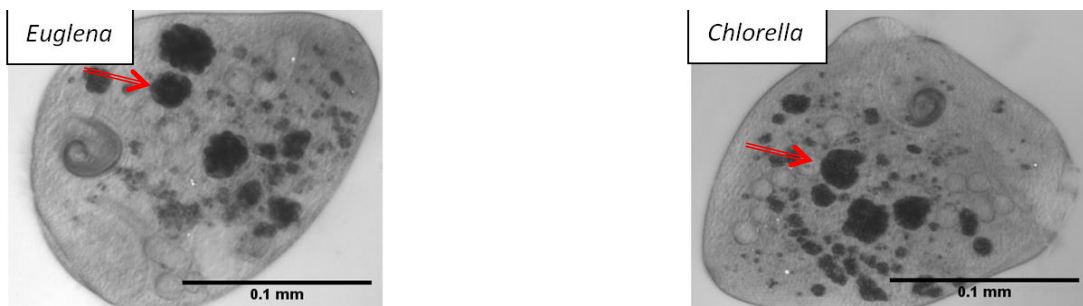


Figura 6: Vacuolas alimenticias llenas en una célula de *S. coeruleus* alimentada con *E. gracilis* (izquierda) y una alimentada con *C. vulgaris* (derecha).

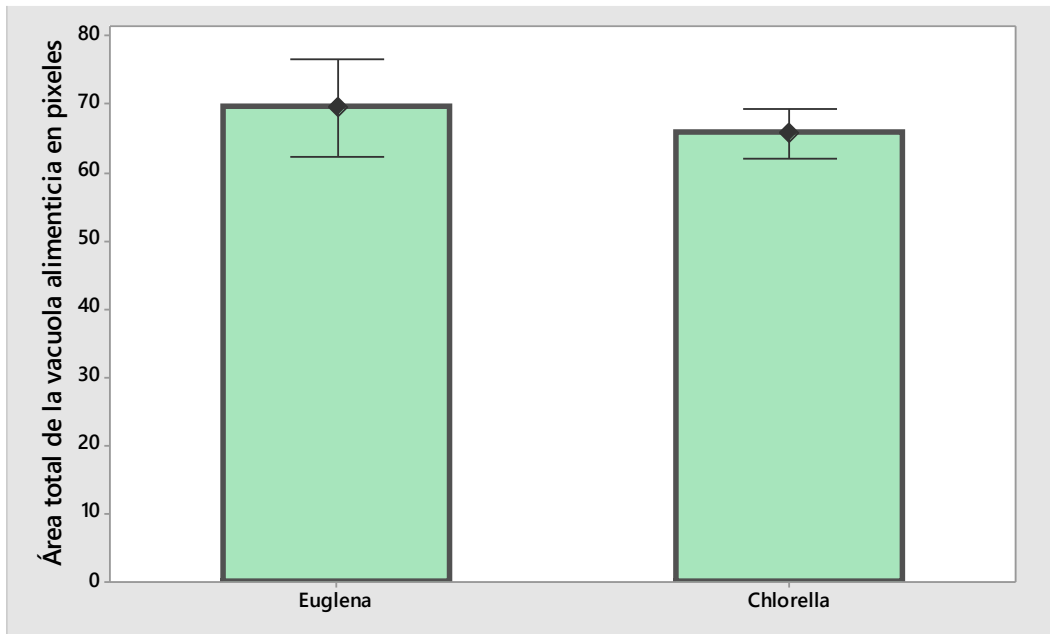


Figura 7: Tamaño de la Vacuola alimenticia según la presa ingerida, *E. gracilis* (izquierda) y *C. vulgaris* (derecha) N=10

Preferencia de presa

Los porcentajes de ingesta en las tres especies se vieron disminuidos desde un 40 hasta un 60 por ciento de la ingesta relativa que lograron en el ensayo de presa única. Las tres presas fueron menos consumidas en combinación, esto en comparación con los datos del ensayo único, (*Cuadro 2*).

Se observó una preferencia general por células de *S. cerevisiae* en prácticamente todos los ensayos a pesar de tener el mismo tamaño y forma que *C. vulgaris*, organismo que fue el menos elegido en este ensayo. Las células de *E. vulgaris* fueron ingeridas con ímpetu por parte del ciliado, a pesar de ser relativamente más difíciles de atrapar que las otras dos presas debido a su mayor movilidad, además de tener un tamaño mayor y una forma que pudiera dificultar la ingesta en ciertas circunstancias.

	Presas única	Presas combinada (S, E, Ch)	Porcentaje de ingesta diferencial
<i>S. cerevisiae</i>	105.7	73.35	69.39 %
<i>E. gracilis</i>	12.15	7.05	54.44 %
<i>C. vulgaris</i>	53.6	26.95	50.27 %

Cuadro 2: Preferencia de presas ingeridas proporcionadas por separado y en combinación de las 3 especies utilizadas como presa (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*). Se muestran las medias por separado y en combinación con un porcentaje de ingesta diferencial entre ambos grupos. N=10

Efecto citotóxico del inhibidor de guanilato ciclasas Acneftenoquinona en células de *S. coeruleus*

Las células de *S. coeruleus* presentaron tolerancia al fármaco Acneftenoquinona en concentraciones de 0.001 a 0.01 M. Manteniendo su estructura aparentemente íntegra y sus funciones celulares en aparente equilibrio. Con concentraciones más altas, las células comenzaban a presentar signos de decadencia como palidez, disolución del macronúcleo, pérdida de estructuras ciliares, falta de movimiento y encapsulación aparentemente pre-cística (fig. 8).

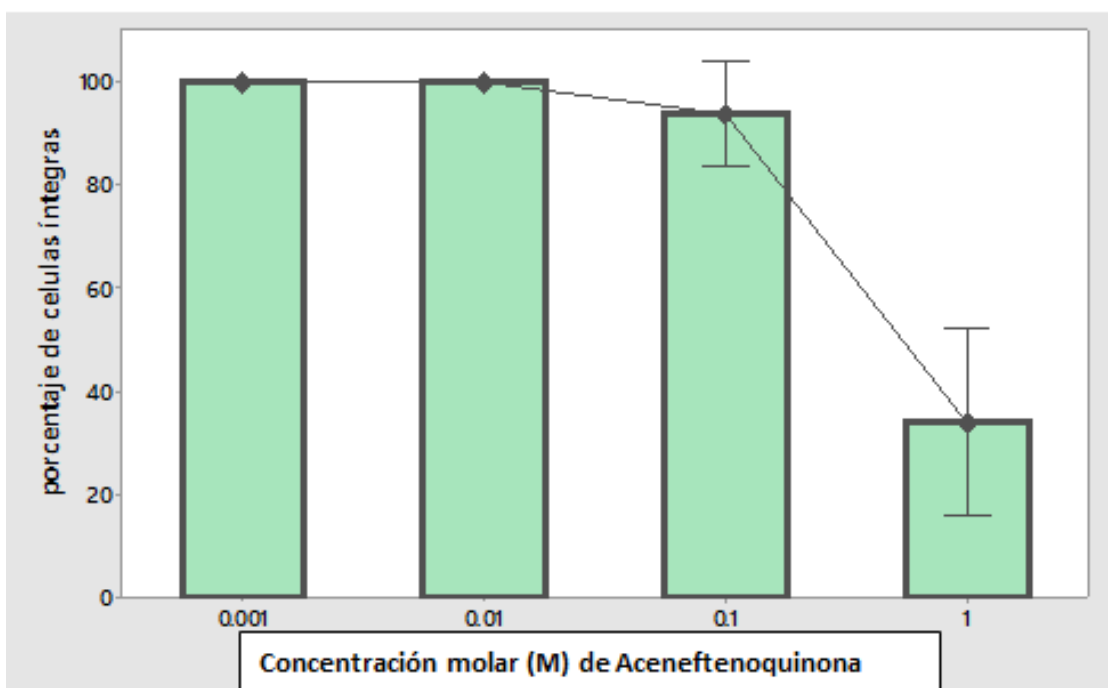


Figura 8: Tasa porcentual de supervivencia de células tratadas con Acneftenoquinona (Acq) en distintas concentraciones molares. N=50

La Acenefteñoquinona no lisa a las células por completo. No se observaron indicios de la formación de apoptosomas aunque la estructura celular cambió completamente con una concentración de 1 M, lográndose recuperar las células si eran inmediatamente lavadas y colocadas en condiciones de cultivo.

Efecto citotóxico del inhibidor de Proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico Estauroesporina en células de *S. coeruleus*

El fármaco Estauroesporina no tuvo efecto negativo en la integridad celular de *S. coeruleus* hasta una concentración de 0.025 M. Las células parecen ser totalmente tolerantes al fármaco hasta esta concentración sin embargo, con un aumento de sólo 0.05 M, las células expuestas al fármaco comenzaron a degradarse y a formar apoptosomas, perdiendo estructura y movimiento. Después de 5 minutos perdían por completo la integridad estructural y morían (*fig. 9*).

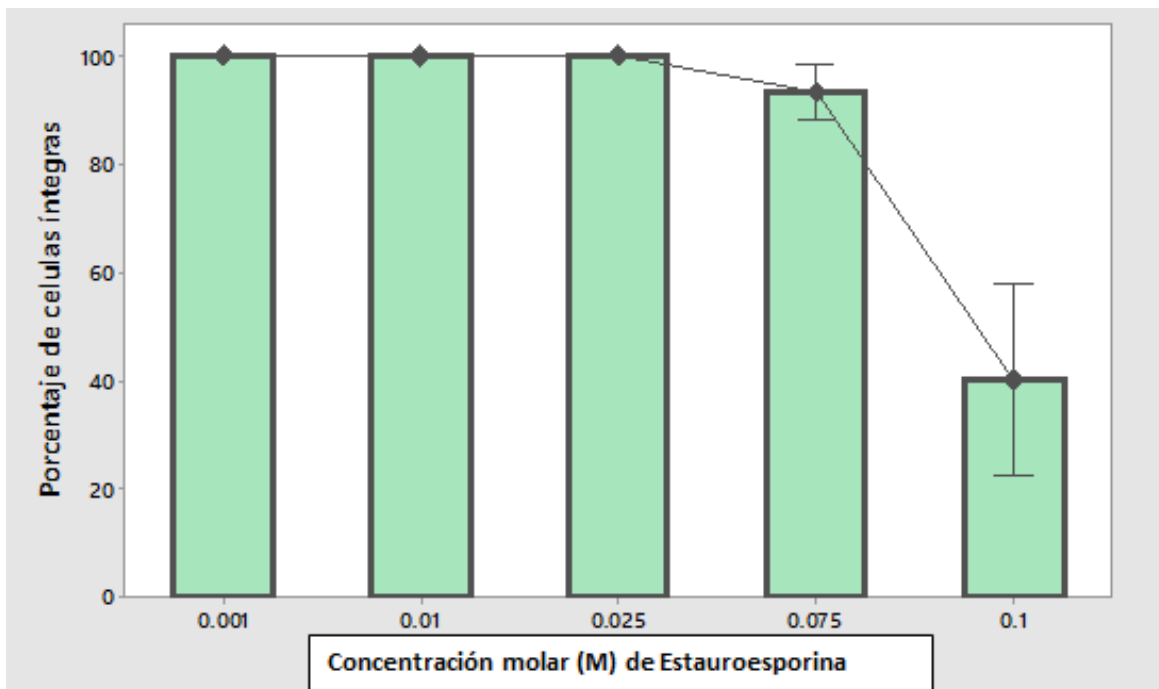


Figura 9: Tasa porcentual de supervivencia de células tratadas con Estauroesporina (Stau) en distintas concentraciones molares. N=50

Las células tratadas con dosis mayores a 0.075 no fueron recuperadas después de lavados y su incorporación a medios de cultivo frescos, sino que continuaban con el proceso de lisis celular.

Efecto del inhibidor de guanilato ciclasas Aceneftenoquinona en la ingestión de presas

El fármaco Aceneftenoquinona mostró un efecto marcado en la ingestión de presas con una concentración mayor a 0.01 M. Concentraciones menores no tuvieron un efecto significativo, mientras que concentraciones mayores mostraron ser tóxicas para la célula, como se muestra en las gráficas previas. La ingestión de presas fue notablemente disminuida, alcanzando una nula ingestión de presas en la mayoría de las células tratadas (*fig. 10*).

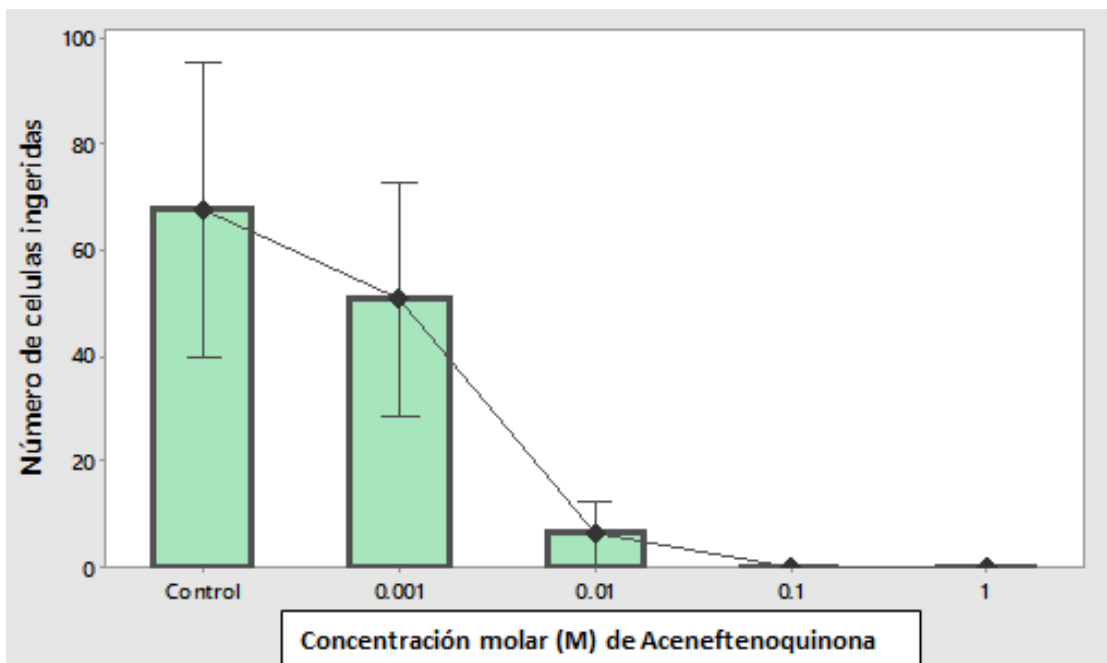


Figura 10: Efecto de la Aceneftenoquinona en diferentes concentraciones molares en la ingestión total de presas combinadas (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*) en vacuola alimenticias. N=10

La ingestión de presas ocasionada por la aceneftenoquinona no parece ser causada por reversa ciliar, ya que los organismos tratados parecían presentar batido dextrógiro constante, sin embargo las presas no pasaron más allá de la bolsa oral,

por lo que ninguna vacuola alimenticia fue formada. Esto es evidente en las imágenes siguientes, en las que se hace notar claramente la presencia de vacuola alimenticias con presas combinadas en el grupo control, mientras que no se distingue ninguna presa en las vacuolas alimenticias en el grupo tratado con Acenefteñoquinona (*fig. 11*).

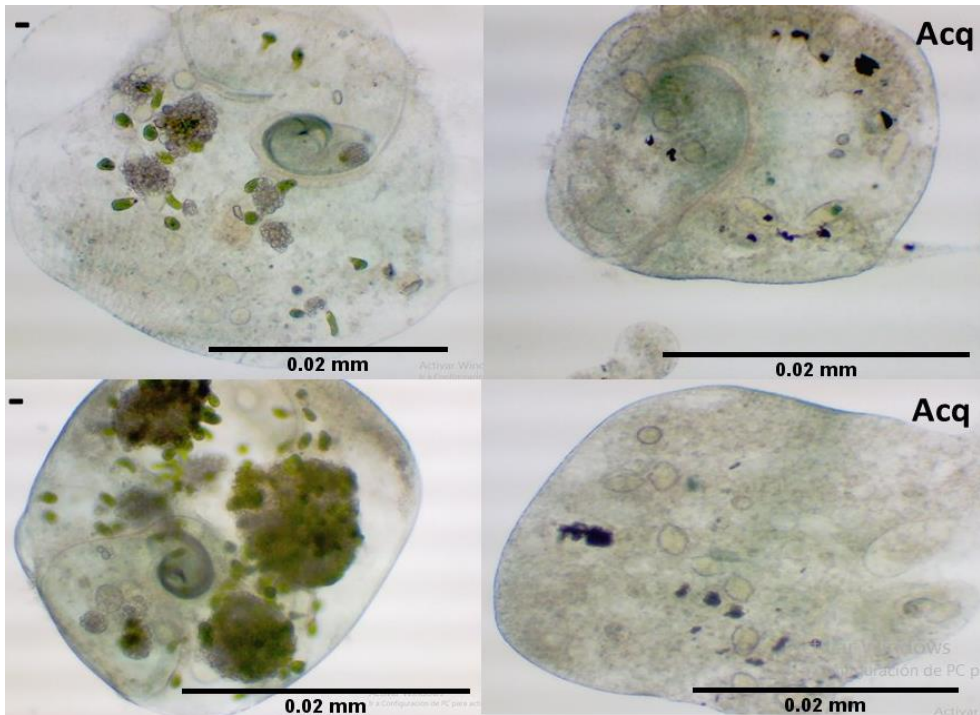


Figura 11: Izquierda (control negativo); Vacuola alimenticias llenos de presas combinadas (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*). Derecha; célula sin vacuola alimenticias visibles (tratamiento con acenephtenoquinina 0.01 M)

Efecto del inhibidor de proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico Estauroesporina en la ingestión de presas

El inhibidor de proteínas cinasas Estauroesporina mostró un efecto importante en la incorporación de presas en vacuolas alimenticias. Los organismos tratados con dosis mayores a 0.1 M mostraron un número significativamente menor ($P = >0.05$) de células presa ingeridas. Se puede distinguir la ausencia de las vacuolas alimenticias en el grupo tratado con dosis no tóxicas del fármaco, a diferencia del grupo control que presenta presas de las tres especies en las vacuolas alimenticias llenas (*fig. 12*). Aunque el movimiento de la banda aboral de membranelos y el batido ciliar se presenta en la misma dirección dextrógira que en el resto de las

células, se debe mencionar que el batido no parece tener la misma velocidad o potencia que el grupo control (fig. 13).

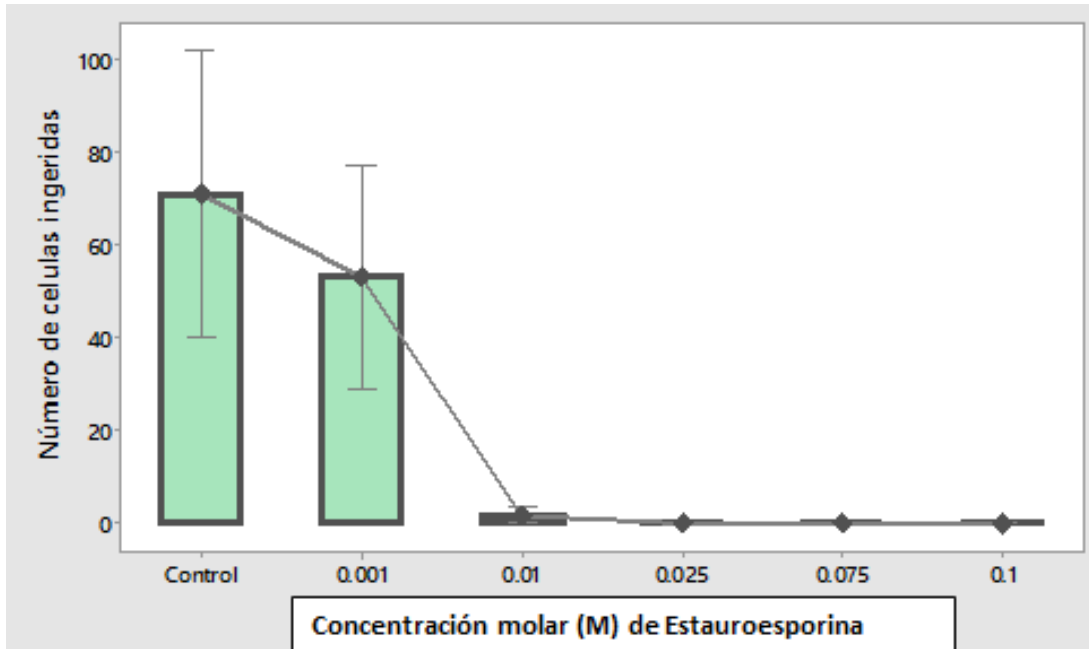


Figura 12: Efecto de la Estauroesporina en diferentes concentraciones molares en la ingestión total de presas combinadas (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*) en vacuola alimenticias. N=10

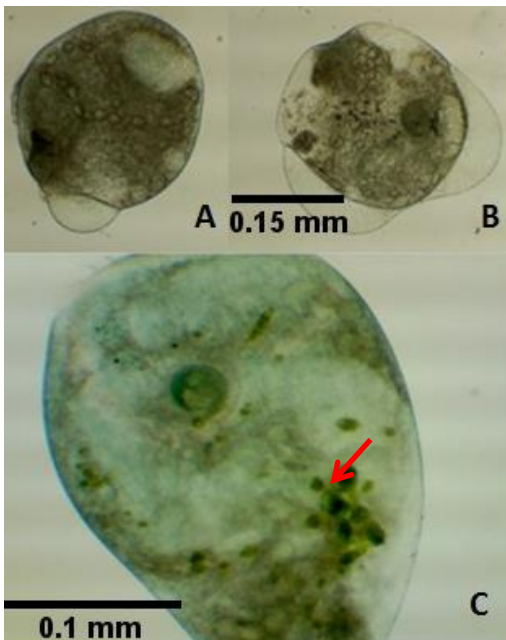


Figura 13: (A): célula tratada con Estauroesporina 0.01 M; se observan vacuolas alimenticias vacías. (B) Células sin tratamiento (control negativo). (C) aspecto normal de vacuolas alimenticias llenas, señaladas con una flecha en la imagen.

Localización de genes candidatos como participantes en el proceso de alimentación del ciliado *S. coeruleus*

Selección de guanilato ciclasas a probar

Se seleccionaron once guanilato ciclasas con distintas características para los experimentos con ARN interferente. El inserto que se incluyó en el vector HT115 y que fue probado en este estudio de cada guanilato ciclasa se presenta a continuación.

1 (azul) tienen únicamente la secuencia parcial del dominio de unión a guanilato. 2 (rojo), comparten afinidad con adenosina y guanilato. Mientras que las otras 8 (negro) presentan el gen completo afín a guanilato (*cuadro 3*).

Nombre de Guanilato ciclasa	Secuencia parcial (primer específico utilizado)	Factor de homología (exponencial de probabilidad de aleatoriedad)
GuanylylCyclase30	TCCAACCAGTCCAAGAAACC	9.80E-53
GuanylylCyclase31	GCAACTGCCTTAGTCCCATC	1.80E-52
GuanylylCyclase38	AATGGGTCCTTGGAGTTGTG	5.90E-55
GuanylylCyclase35	GGGATTTTCAAAGGGGAAAG	3.40E-52
GuanylylCyclase23	GGGAATGGGGATTTTTCAAG	7.30E-53
AG_cyclase11	GTGTTGCTGATTGCATGGAC	5.90E-51
GuanylylCyclase34	TCAGGGATCATCCAAAGCTC	7.60E-51
GuanylylCyclase24	GGAACATCAGCTAGGCATCC	2.50E-51
AG_cyclase3	TTGGGCAGGTTTCTTATTGG	7.10E-52
GuanylylCyclase14	GAAAAGCAGGCAGAAAATGG	8.20E-50
GuanylylCyclase16_partial	TTTTCAACCCTAGCCCAAGTG	1.30E-48

Cuadro 3.- Guanilato ciclasas seleccionadas para el tratamiento con iARN.

Árbol cladístico filogenético de las Guanilato ciclasas presentes en el genoma de *S. coeruleus*

El árbol cladístico filogenético elaborado presenta un esquema de la distribución y parentesco entre las distintas guanilato ciclasas presentes en el genoma de *S. coeruleus*. Se presentaron siete principales clados según la secuencia de las guanilato ciclasas. La mayoría de las guanilato ciclasas utilizadas en los experimentos posteriores pertenecen al “segundo clado” presentado en el árbol, aunque existe representatividad de todo el árbol en las GCs seleccionadas (*fig. 14*). La naturaleza de distintos clados en las guanilato ciclasas presentes en *Stentor* parecen indicar distintos orígenes siendo distintas las estructuras secuenciales. Los genes de *S. coeruleus*, como los de otros ciliados, presentan abundantes duplicaciones a lo largo del desarrollo evolutivo del organismo, a esto se puede deber el gran número de genes codificantes de guanilato ciclasas encontrados (Slabodnick, *et al.* 2017).

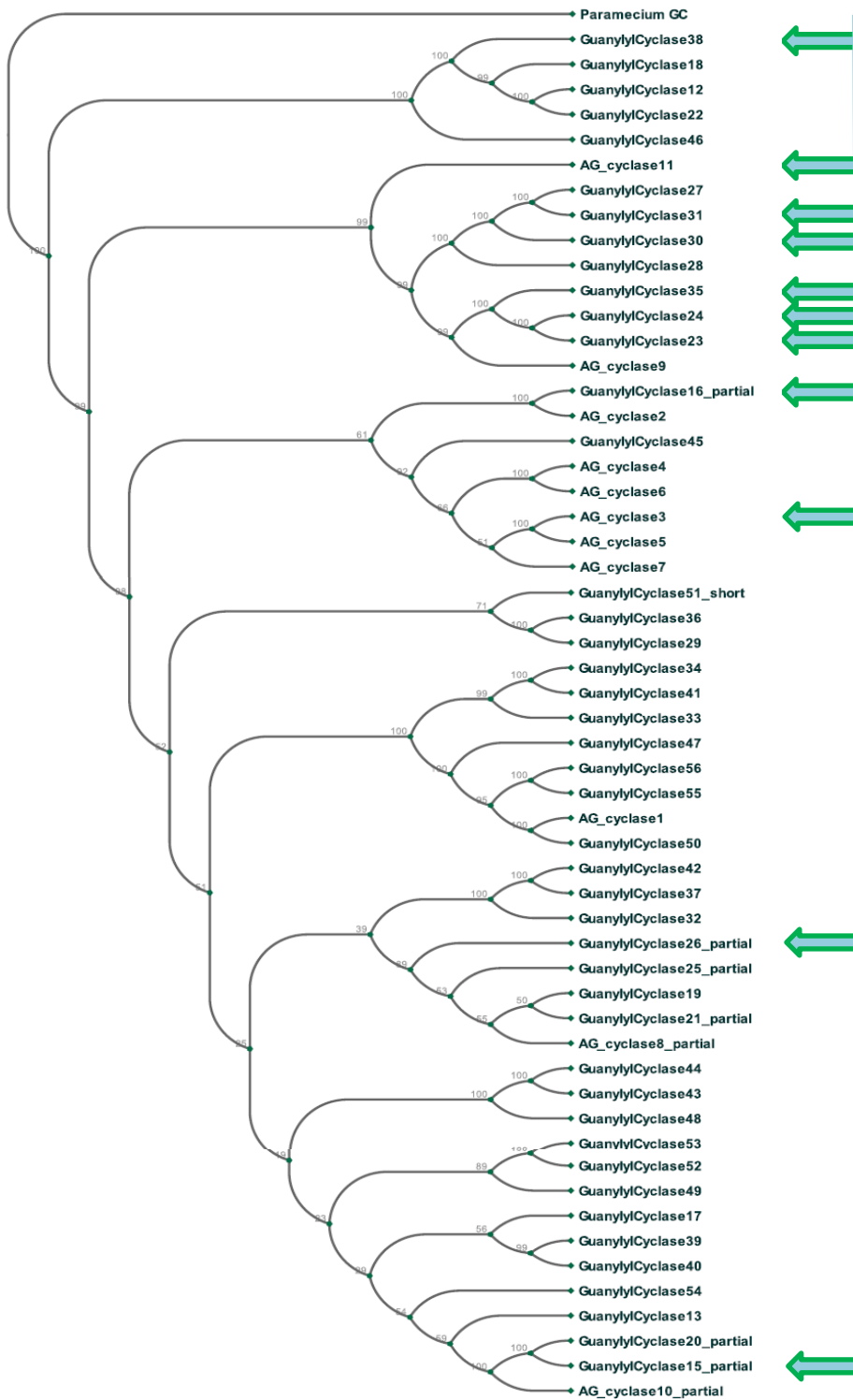


Figura 14: Árbol filogenético por clados (Neighbour joining) de las guanilato ciclasas presentes en el genoma de *S. coeruleus*. Señaladas con flechas verdes, se muestran las utilizadas en este estudio para generar ARN interferente (iARN).

Efecto del ARN interferente dirigido a guanilato ciclasas en la preferencia de alimento

La combinación de los once vectores en la alimentación del ciliado *S.* no tuvo un efecto significativo en la cantidad de células ingeridas post-tratamiento. La combinación de todos los vectores bacterianos parece no haber influido en la capacidad de *Stentor* para incorporar alimento. El grupo tratado con Acq 0.01 M (control positivo) y el grupo sin tratamiento farmacológico (control negativo) parecen tener un comportamiento convencional según las condiciones establecidas con anterioridad (fig. 15).

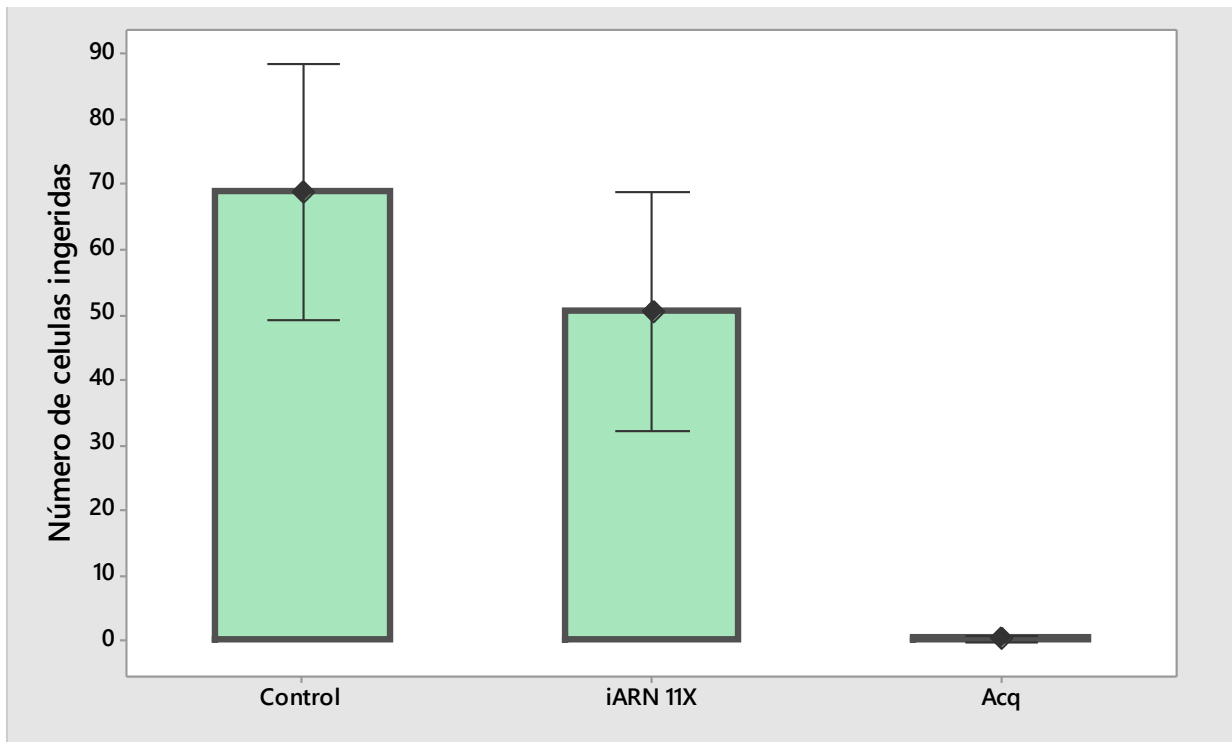


Figura 15: Efecto de la aplicación en combinación de los once iARNs dirigidos a guanilato ciclasas en el número total de células presa ingeridas en combinación (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*) ($P > 0.1$). N=10

El tratamiento con vectores con ARN interferente dirigido de manera independiente a cada una de las once guanilato ciclasas mostró resultados más concretos que la combinación de todas en una misma fase experimental. Se mostraron resaltantes dos grupos en especial; el grupo tratado con la guanilato ciclasa “30” mostró un

decremento significativo del número de presas ingeridas en el periodo permisivo de 5 minutos y por su parte el grupo tratado con la guanilato ciclasa “11”, misma que cabe recalcar, comparte afinidad con adenilato, mostró un decremento muy importante en comparación con los demás grupos y el control ($P < 0.05$). Ninguna de las dos guanilato ciclasas resaltantes parecen tener un efecto tóxico en las células en las que se probaron, siendo la anatomía aparente de estos grupos experimentales igual a la de los grupos control. Cuando observadas en el microscopio, las células tratadas no parecen tampoco presentar ninguna deficiencia funcional, sin embargo no parecen tener la capacidad de formar vacuolas alimenticias *de novo*. Una minoría de las células tratadas tanto con el iARN dirigido a GCs “11” y “30”, presentan un comportamiento alimenticio “normal”, en el que ingieren células de las tres especies de presas sin distinción ni afección aparente (fig. 16).

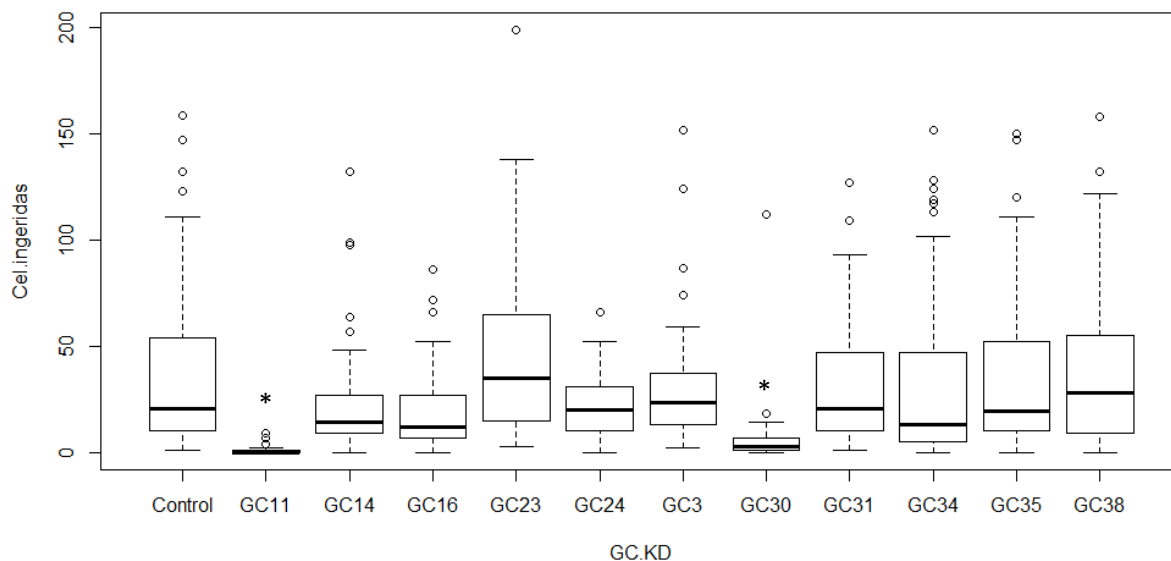


Figura 16: Efecto de ARN interferente (iARN) dirigido a las once guanilato ciclasas seleccionadas en la ingesta total de células de las tres presas en combinación (*Euglena gracilis*, *Chlorella vulgaris* y *S. cerevisiae*) ($P < 0.05$) $N=10$.

Los grupos tratados con ARN interferente dirigido a las guanilato ciclasas resaltantes, mostraron una constancia importante en el patrón previo después de dos repeticiones. Cuando probadas individualmente contra un control, se mantiene el mismo patrón en el que la mayoría de las células tratadas en ambos casos aparentemente pierden la capacidad de formar vacuolas alimenticias, con resultados significativos para las guanilato ciclasas once y tres ($P < 0.03$) (fig. 17).

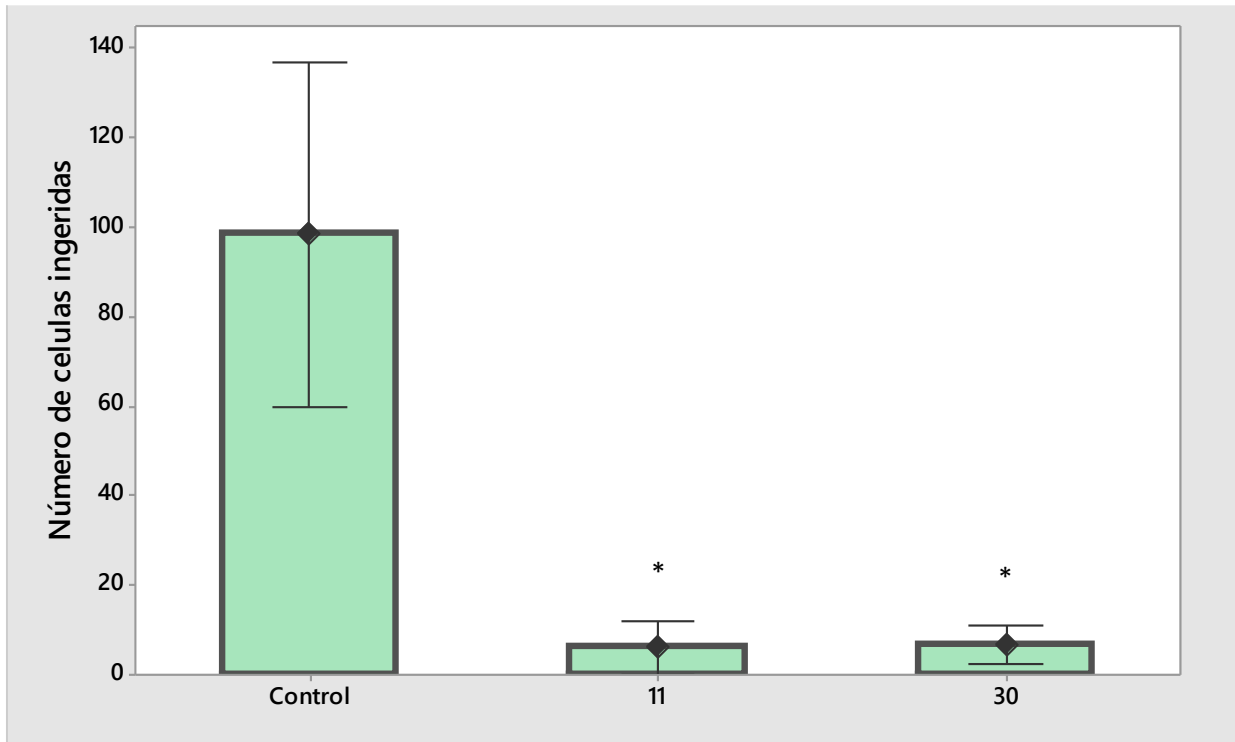


Figura 17: Efecto de la aplicación de los dos iARN que mostraron resultados significativos en el número total de presas ingeridas en combinación (*E. gracilis*, *C. vulgaris*, *S. cerevisiae*). $N=10$, ($P < 0.3$).

La preferencia de presa parece ser relativamente constante en la mayoría de los grupos después del tratamiento con ARNi (mayor preferencia por *S. cerevisiae* que por *C. vulgaris*) (Fig. 19), siendo resalantes en este aspecto la guanilato ciclasa 23, la 34 y la 38. Aunque los grupos 23, 34 y 38 no mostraron resultados significativos comparados con el control, muestran un ligero desequilibrio en el patrón de preferencia de las presas, eligiendo a *C. vulgaris* sobre *S. cerevisiae*. El patrón desequilibrado suele ocurrir estocásticamente de vez en cuando por lo que pudiera no tener relevancia en este ensayo. *E. gracilis* parece ser seleccionado de manera similar y constante en todos los ensayos (fig. 18).

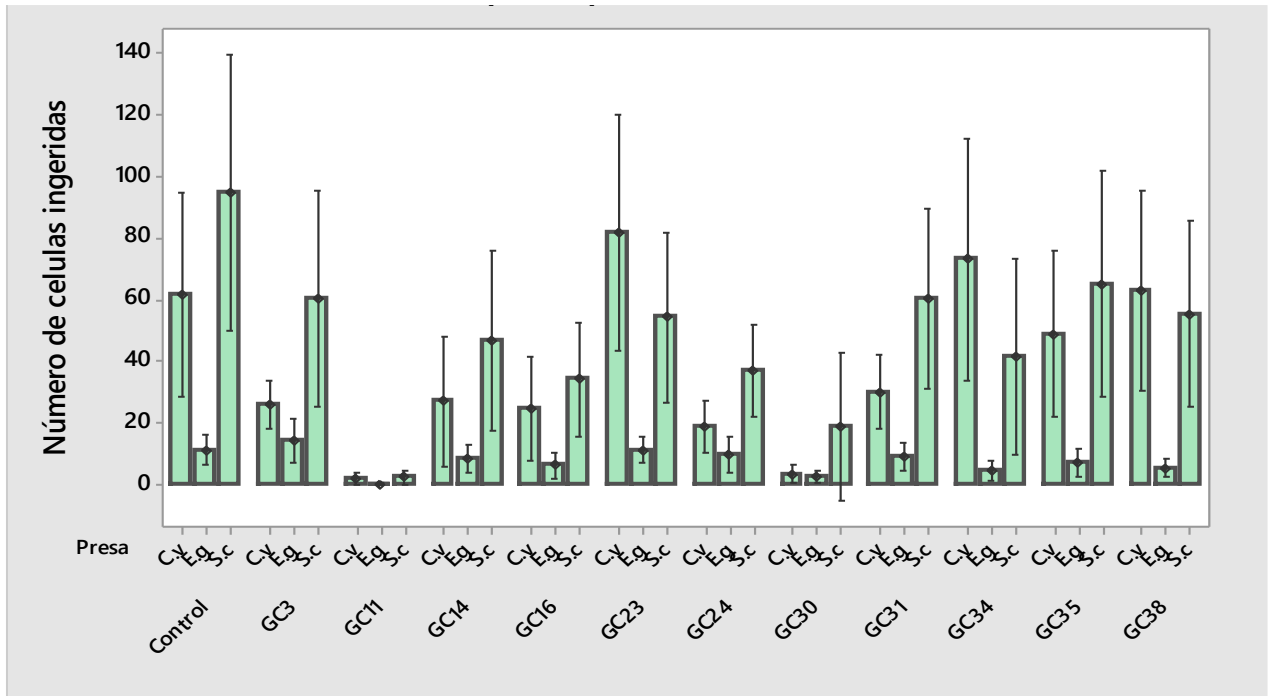


Figura 18: Preferencia de presa ingerida en vacuola alimenticias con efecto de ARN interferente (iARN) dirigido a las once guanilato ciclasas seleccionadas. *Euglena gracilis* (*E.g*), *Chlorella vulgaris*(*C.v*) y *Saccharomyces cerevisiae*(*S.c*). N=10

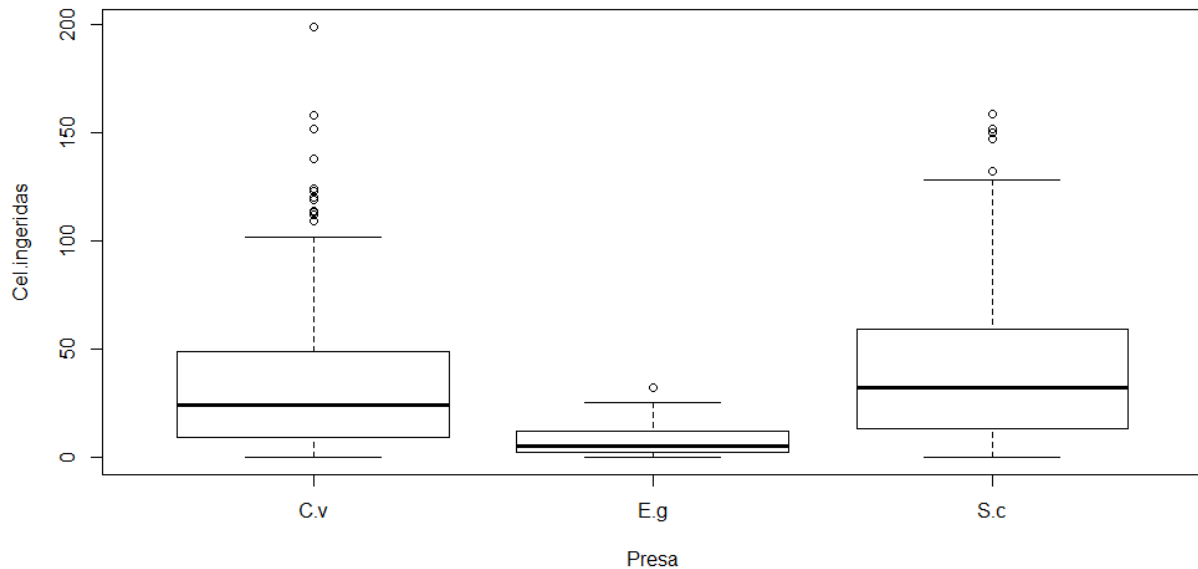


Figura 19: Preferencia general de presa ingerida en vacuola alimenticias con efecto de ARN interferente (iARN) y control dirigido a las 11 guanilato ciclasas seleccionadas. *Euglena gracilis* (E.g), *Chlorella vulgaris*(C.v) y *S. cerevisiae*(S.c). N=10

Sistema molecular regulador de la ingesta en *S. coeruleus*

Tanto los estudios farmacológicos como los moleculares efectuados en este estudio, apuntan a un sistema metabólico que subyace el proceso de ingesta en el ciliado *S. coeruleus*. El sistema es aparentemente regulado por una cascada de señalización en la que participan tanto proteínas cinasas como guanilato ciclasas, posiblemente involucrando elementos del citoesqueleto para efectuar el cierre y apertura de la citofaringe como consecuencia de las reacciones moleculares a las que el proceso precede y permite (*fig. 21*).

El proceso es también afectado por el tiempo de inanición previo a la ingesta experimental, variable no abordada pero si observada en este trabajo (*fig.20*).

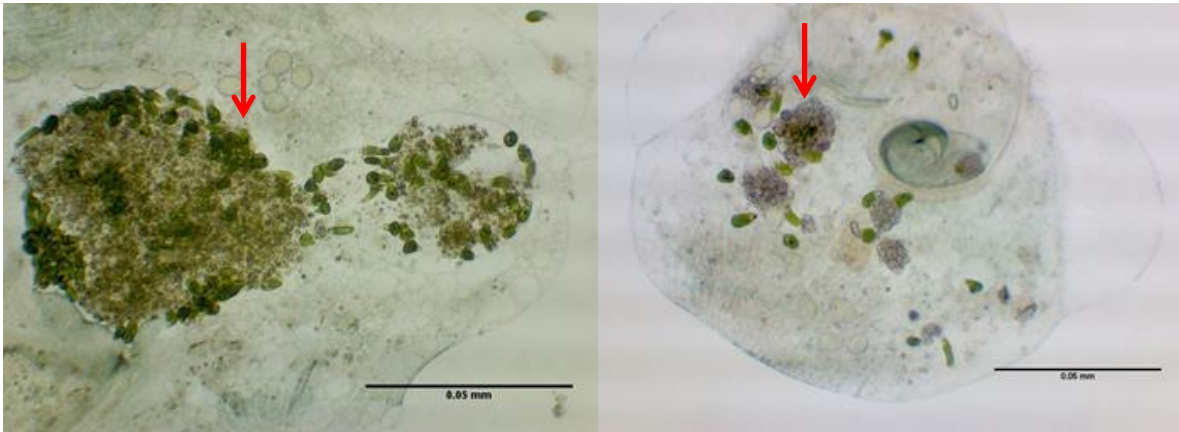


Figura 20: Vacuola alimenticia sobrecargada post-inanición de 3 días (izquierda) comparada con vacuola alimenticia convencional, después de periodo permisivo de alimentación de 5 minutos con presa combinada.

Estos resultados apuntan a un proceso complejo con varios pasos de desarrollo para la ingesta en el organismo unicelular *S. coeruleus*. El primero de éstos siendo el potencial de membrana, mismo que dirige la viabilidad del ciliado para atraer presas con su banda aboral de membranelos. El segundo siendo la apertura de la citofaringe, lo que determina qué cantidad de presas o partículas serán ingeridas en un momento determinado. El tercero presenta la fase de ingestión en la bolsa oral bajo la citofaringe y la carga neta de la misma previa a la formación de la vacuola alimenticia a partir de la misma. La última es precisamente la formación de la vacuola alimenticia y la posterior digestión de las presas ingeridas.

Dichos procesos parecen depender del sistema molecular aquí descrito, teniéndose como referencia los experimentos expuestos en esta sección.

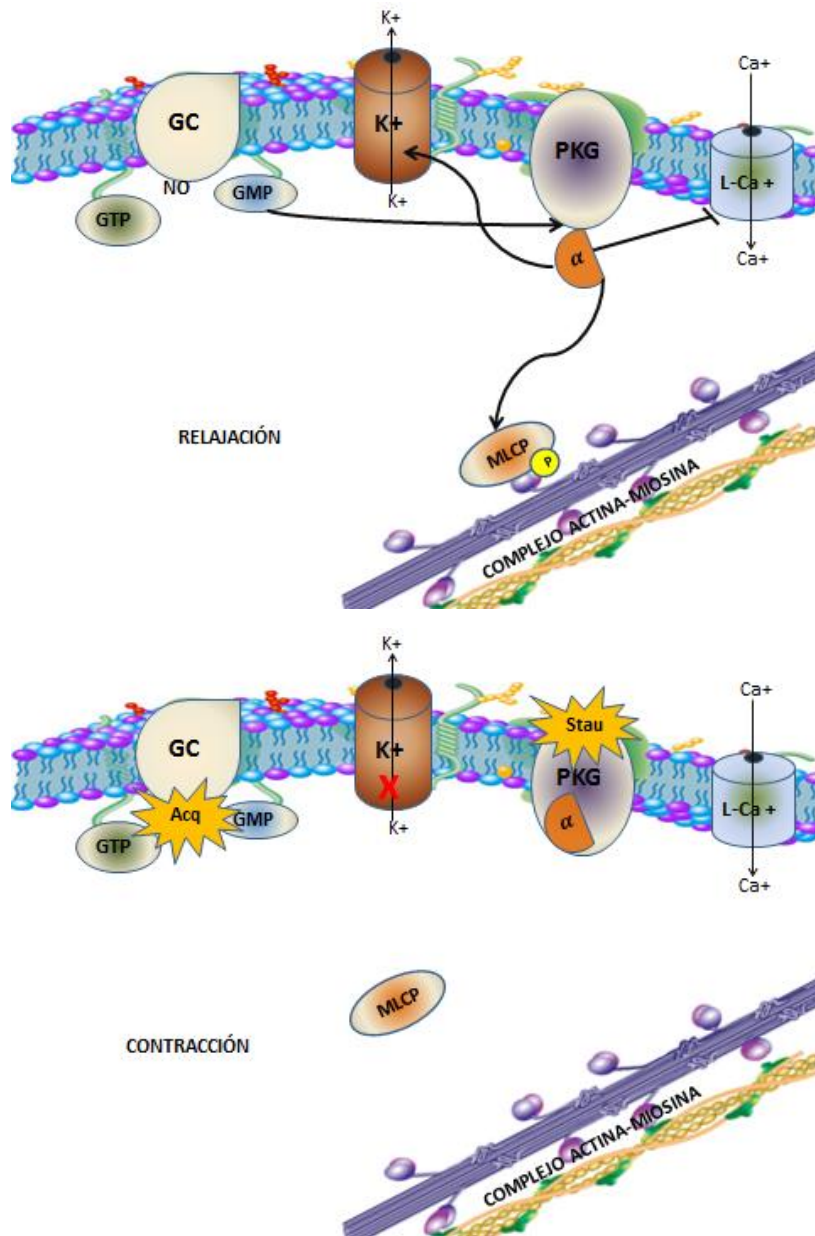


Figura 21: Esquema ilustrativo del proceso molecular hipotético que se propone como mecanismo de acción de la contracción del canal citofaríngeo, dando pie a la formación de una nueva vacuola alimenticia. Se muestra una guanilato ciclasa (GC) dependiente de óxido nítrico (NO), que en presencia del mismo produce GMP cíclico (cGMP). El cGMP funciona como señal activadora de una proteína cinasa dependiente de cGMP (cGMP-PKG), la cual al recibir la señal libera su subunidad alfa (α), activando la fosfatasa de miosina de cadena ligera (MLCP), canales de Potasio dependientes de sustrato (K^+) e inhibiendo canales de calcio dependientes de voltaje tipo L ($L-Ca^+$). El efecto anterior evita que el calcio se una al complejo actina- miosina, lo que junto con el efecto represor del MLCP activo, lo mantiene relajado. El efecto inhibitor de los fármacos Acenefteñoquinona (Acq) y Estaurosporina (Stau) sobre las GCs y las cGMP-PKGs, no permite que estos efectos se lleven a cabo, promoviendo la contracción permanente o semipermanente del canal citofaríngeo.

Discusión

La ingesta en el ciliado en sus distintos niveles presenta una complejidad peculiar, tratándose de una sola célula parece emular o formar analogías metabólicas de la toma de decisiones en organismos más complejos, ligando el sistema con aquellos de circuitos neuronales dirigidos a regulación homeostática presentes en insectos y nematodos (Osbourne, 1997). En este organismo como en los antes mencionados es remarcable la influencia de un sistema metabólico dirigido a homeostasis energética basado en proteínas cinasas y guanilato ciclasas que expande la noción de las bases de regulación en organismos eucariontes, presentando también una incógnita sobre las bases biológicas de la toma de decisiones no ligadas a sistema nervioso.

El mecanismo de ingesta de *S. coeruleus* parece tener distintos niveles con varios factores que influyen en cada uno de ellos. El primer nivel siendo la dirección de batido ciliar dependiente de la banda aboral de membranelos y su interacción con las cargas de membrana. El segundo sería la integración a la bolsa oral y el tercero y definitivo para la incorporación, la formación coordinada de la vacuola alimenticia con el movimiento de contenido de la bolsa oral y apertura o cerrado de la puerta citofaríngea. Este proceso en particular no había sido descrito puntualmente con anterioridad, limitándose en previos estudios a la descripción superficial de la ingesta (Rapport, 1972).

El sistema mecánico de ingesta parece variar entre organismos ciliados. En el caso de otras especies de *Stentor* no existe una peculiaridad estructural como es la bolsa oral, por lo que el paso de partículas debería ser diferente al menos en el segundo paso de la ingestión (Tartar, 1961). Otros géneros, como *Paramecium* o *Tetrahymena* parecen no tener procesos tan complejos de preferencia e incorporación diferencial de partículas reportados, posiblemente por la limitación observacional.

La captura de la presa en cuestión parece depender del potencial de membrana presente en el momento, debido a que el batido ciliar cambiará su dirección

dependiendo del potencial de membrana al tiempo de la ingesta. En caso de estar hiperpolarizada la ingesta se lleva a cabo de la misma manera que en un potencial de reposo, mientras que con la aplicación de iones cargados positivamente como potasio, la dirección de batido ciliar cambiará al igual que en el resto de los cilios, concordando con estudios de nado reverso (Satir, *et al.* 1993).

La preferencia de alimento en *Stentor* no había hasta ahora sido probada con levaduras u otro representante del reino fungi. En este estudio se observó que *Stentor* parece tener una inclinación por este tipo de alimento, presentándose como ejemplo puntual el organismo presa *S. cerevisiae*. El organismo *E. gracilis* demostró ser también un tipo de alimento preferente para el ciliado, mismo que demostró afinidad por ingerirlo a pesar de la mayor cantidad de energía requerida para ingerir a cada célula de *Euglena* debido a su tamaño y movilidad. Este estudio corrobora lo encontrado por Rapport (1972) y Shaeffer (1910), en cuanto a la peculiaridad del aparente rechazo del ciliado a las algas como alimento.

La formación de vacuolas como evento celular parece depender no del tamaño de la presa ingerida, sino de la cantidad de partículas que entren a la misma mientras la citofaringe permanece abierta al medio. Lo anterior concuerda con los estudios de Shaeffer (1910) en los que se menciona que el tamaño de la presa no es un factor de selección para la incorporación, tanto como lo es la naturaleza de la misma.

La menor preferencia por las algas y en particular por *C. vulgaris*, puede ser interpretado como una estrategia evolutiva que busca equilibrar el gasto de energía requerido para digerir a la célula de *C. vulgaris* y el aporte nutricio que el alga provee. Ya que como se ha hecho notar en este estudio, la digestión del alga puede tomar demasiado tiempo y en el caso de otros ciliados no ocurrir nunca, como se observa en *P. bursaria* (Kodama, *et al.* 2007). Aunque estadísticamente se observa una menor preferencia por *E. gracilis*, no se tomó en cuenta en este estudio la energía invertida en atraparlo e incluirlo en la bolsa oral. El ciliado *S. coeruleus* parece tener problemas al momento de ingerir a la célula de *Euglena* debido a su alta motilidad y gran tamaño, sin embargo se puede observar que cuando se presentan tanto *Chlorella* como *Euglena* en el aparato oral, *Euglena* es incluida mientras el

ciliado parece intentar mantener a las células de *Chlorella* fuera de su bolsa oral. Un estudio observacional más meticuloso es requerido para este punto a debatir. Las bases moleculares del proceso de ingesta en *Stentor*, aunque no del todo descifradas, parecen estar relacionadas con las moléculas propuestas en éste trabajo y con un sistema de regulación homeostática que se muestra como atavismo evolutivo y se conserva a lo largo de la evolución eucarionte (Kaun, *et al.* 2009). Tanto los estudios farmacológicos como los moleculares llevados a cabo en este estudio, aportan evidencia de esta interacción.

Los fármacos dirigidos a inhibir las guanilato ciclasas (Acenefteñoquinona) y las proteínas cinasas (Estauroesporina) tuvieron resultados resaltantes. El mecanismo de acción de ambos fármacos tuvo repercusiones notables en la formación de vacuolas alimenticias, sin embargo y a pesar de que ambos procesos son evidencias positivas para la validación de la hipótesis, faltan evidencias de ganancia de función en los mismos niveles de la cascada de señalización.

Las repercusiones de las guanilato ciclasas en los mecanismos descritos en este trabajo apuntan a una importante participación de las mismas. A pesar de lo anterior, una de las guanilato ciclasas que presentaron resultados significativos en los ensayos de iARN, la denominada “11”, presenta también afinidad por adenilato, lo que puede referir a un proceso coordinado o dependiente de la forma cíclica del adenil monofosfato (AMP) sobre el cGMP.

Las guanilato ciclasas aquí descritas y probadas por medio del ARN, parecen tener una naturaleza estructural similar, presentando, además de los grupos de unión a guanilato, dominios tipo ATPasa, estructura típica de las guanilato ciclasas en ciliados a la que no se le ha atañado hasta la fecha una función en específico (Sharma, 2002). A su vez, es de destacar que el número de guanilato ciclasas presentes en *S. coeruleus* puede ser producto de varios eventos de duplicación genética o procesos similares que permitan la distribución que se hace notar en el árbol filogenético cladístico aquí descrito. El árbol estructurado en este trabajo presenta por lo menos seis clados de guanilato ciclasas, posible efecto de la parcialidad de sus secuencias, sin descartar la posibilidad de que sea evidencia de duplicaciones genéticas de este tipo de genes a lo largo de la evolución de *S.*

coeruleus. Lo anterior puede ser respaldado por la secuenciación del genoma de la especie, misma que arroja datos que corroboran la alta frecuencia con la que se llevan a cabo duplicaciones en ciliados (Slabodnick, *et al.* 2017).

El número de duplicaciones en las guanilato ciclasas puede tener un efecto de enmascaramiento de función en esta serie de experimentos, aunque se encontraron dos guanilato ciclasas definitivamente participantes en el proceso, puede ser que alguna de las que no presentaron efectos visibles al perder su función estén siendo sustituidas funcionalmente por alguna otra, teniendo en cuenta que hay por lo menos 50 genes parecidos estructuralmente a guanilato ciclasas en el genoma de *S.*(figura 14).

La combinación de las once guanilato ciclasas en un solo ensayo no tuvo efectos significativos. Es posible que la combinación de todas las guanilato ciclasas provocara que ninguna de ellas se ingiriera en cantidad suficiente para que el iARN tuviera efecto sobre los mecanismos de incorporación de alimento. El ensayo combinado debería llevarse a cabo como un estudio más extensivo o en mayor cantidad para determinar la eficiencia de la combinación de vectores en un mismo ensayo para denotar fenotipos conductuales.

Es de destacar que la participación de agentes moleculares involucrados en la homeostasis energética como lo son las guanilato ciclasas, parecen tener una función conservada, creando analogías funcionales entre grupos eucariontes con millones de años de evolución (Kaun, *et al.* 2009)

Los ensayos de preferencia de alimento y iARN parecen indicar que no existe una relación directa entre la función de las guanilato ciclasas y el comportamiento de selección y preferencia de presas, patrón que se mantiene en los diferentes ensayos, con la tendencia a la menor preferencia por *C. vulgaris* como alimento. El número de ortólogos y duplicaciones que presentan el genoma es alto. Ambos factores pueden complicar el estudio del ciliado y de los ciliados en general por que habiendo duplicaciones, puede existir sustitución, reemplazo o coordinación funcional entre varios de estos (Hetherington, 1932; Slabodnick, *et al.* 2017).

Shaeffer (1910) denotó que la preferencia por ingerir uno u otro tipo de partícula del medio depende de varios factores, entre lo que destaca el estado nutricional del

organismo. La capacidad de discernir entre un tipo de alimento y otro puede ser afectada por el tiempo de inanición que precede a cada proceso permisivo de alimentación. En este estudio la inanición no se hizo exhaustiva, siendo de máximo un día de aislamiento previo a cada experimento, por lo que ninguna célula presentaba deficiencias nutricias. De manera externa a los ensayos realizados, se corroboró el supuesto de Shaeffer, donde se observó que el tamaño de la vacuola alimenticia y la cantidad de su contenido se ven afectadas por el tiempo de inanición de manera importante. En células con tres días de inanición es remarcable que al presentarse un período permisivo, la vacuola alimenticia se sobrecarga, inclusive haciendo difícil su digestión por el volumen que puede alcanzar y ocupar (*fig. 20*). Se necesita un estudio con respecto de la inanición y la capacidad de ingesta y preferencia, ya que como en otros organismos más complejos, *Stentor* podría utilizar sistemas de nucleótidos fosforilados cíclicos como moléculas señal para control de homeostasis energética y así cambiar su mecanismo de ingesta (Wolfertstetter, *et al.* 2013; Osborne, *et al.* 1997).

El tiempo de inanición que se implementó previo a cada experimento en este estudio parece no tener un efecto directo en la selección de alimento; sin embargo es necesaria una manera de medir el “estado nutricio” de la población de *S.a* ser utilizada para descartar cualquier conmoción o sesgo presentes a causa de micro procesos de inanición.

El aporte nutricio que cada una de las presas pueda estar aportando a las células de *Stentor* podría ser relacionado con la preferencia que el ciliado tiene por cada tipo celular, notándose si existe una relación directa de preferencia-aporte nutricio. La capacidad de *S.* para digerir distintas partículas presa no ha sido estudiada. La presencia de celulasas o quitinasas funcionales en la clase Heterotrichidea no ha sido abordada experimentalmente. Dichas capacidades pueden ser esenciales para entender el porqué de la preferencia hacia una u otra presa, y el porqué de la digestión tardía de *C. vulgaris*.

Conclusiones

El KCl en concentraciones mayores a 0.3 mM evita la ingestión de presas por medio de la despolarización de la membrana, lo que provoca el batido ciliar en sentido revertido y evita la captura de las presas por la banda aboral de membranelos.

El tamaño de las vacuolas en *S. coeruleus* es determinado por el tiempo en el que los factores que contraen a la citofaringe se mantienen inactivos, y no por el tamaño de la presa en cuestión.

El sistema de guanilato ciclasas y proteínas cinasas dependiente de GMP cíclico tiene influencia y es posiblemente el sistema coordinador mecánico de la ingesta e incorporación de presas en el ciliado *S. coeruleus*. Según las evidencias obtenidas en este estudio, se puede formular una cascada de señalización hipotética que respalda el proceso de ingesta de alimento, siendo las guanilato ciclasas y las proteínas cinasas dependientes de GMP cíclico los principales componentes coordinados según las evidencias obtenidas.

Las guanilato ciclasas que resultaron significativamente implicadas en el proceso de ingesta de presas son las aquí denominadas "11" y "30".

Según las evidencias obtenidas se propone la participación de las guanilato ciclasas y las proteínas cinasas en el proceso de contracción citofaríngea y en la formación de vacuolas alimenticias nuevas.

Las proteínas cinasas y guanilato ciclasas están implicadas en los procesos de homeostasis energética en el ciliado *S. coeruleus*, Como son la preferencia de presa.

S. coeruleus puede ser un organismo modelo muy útil en estudios de comportamiento y toma de decisiones.

Referencias.

1. - Allen, R. Wolf, R. (1974) The cytoproduct of *Paramecium caudatum* structure and function and fate of food vacuoles. J. Cell Sci. (Kodama, et al. 2007). Vol. 14.
2. - Allen, R. (1974) Food vacuole membrane growth with microtubule associated membrane transport in paramecium. J. Cell. Biol. Vol. 63.
3. - Bicudo, C. and Menezes, M. (2016). Phylogeny and Classification of Euglenophyceae: A Brief Review. Front. Ecol. Evol. Vol. 00017.
- 4.- Chantranupong, L. Wolfson,R. Sabatini,D. (2015) Nutrient- Sensing Mechanisms across evolution. Cell. 161.
- 5.- Chen, W. (2009) A high throughput Nile red method for cuantitative measurement of neutral lipids in microalgae. Journal or microbiological methods, Vol. 77.
- 6.- Fenchel, T. Blackburn N. (1999) Motile Chemosensory Behaviour of Phagotrophic Protists: Mechanisms for and Efficiency in Congregating at Food Patches. *Protist* Vol. 150.
- 7.- Fujiwara, M. Sengupta P. McIntire SL. (2002) regulation of body size and behavioural state of *C. elegans* by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase. Neuron, Vol. 36.
- 8.- Gaerting, J. Wloga, D. Suryavanshi, M. (2010) Biological system and assay for identifying modulators of tubulin. Euk. Cell. Vol. 7.
- 9.- Hetherington, A., (1932). The constant culture of *Stentor coeruleus*. ArC. Protistenk. Vol. 76,
- 10.- Kaun, K. Sokolowski, M. (2009) cGMP-dependent protein kinase: linking foraging to energy homeostasis. Genome, Vol. 52.
- 11.- Kodama, Y. Nakahara, M. Fujishima, M. (2007) Symbiotic alga *Chlorella vulgaris* of the ciliate *Paramecium bursaria* shows temporary resistance to host lysosomal enzymes during the early infection process, Vol. 230.
- 12.- Marler, P. (1990) Song leiARNng: the interface between behavior and neuroethology. *Philos. Trans. Soc. Lond. Ser. B*, Vol. 329.
- 13.- Slabodnick, M. Ruby, M. Dunn, J. Feldman, J. DeRisi, J. Marshall, W. (2014) The Kinase Regulator Mob1 Acts as a Patterning Protein for S.Morphogenesis. *journal.pbio*.Vol. 1008.
- 14.- Osborne, K.A. Robichon, A. Burgess, E. Butland, S. Shaw. R. Coulthard, A. Pereira, H. Greenspan, R. Sokolowski, M. (1997) Natural behavior polymorphism due to a cGMP-dependent protein Kinase of *Drosophila*. *Science*, Vol. 277.
- 15.- Rapport, J.D. (1972) Deterination of food preference of *Stentor coeruleus*. *Biol. Bull.* Vol. 142.
16. – Satir, P. Barkalow, K. Hamasaki, T. (1993) The control of ciliary beat frequency. Trends in cell biol. Vol. 3

17. – Sattler, C. Staehelin, L. (1978) A Freeze-Fracture and High-Voltage Electron Microscopy Study of the Oral Ribs, Cytostome, and Forming Food Vacuole. *Journal Ultrast. ResearC.* Vol. 66.
- 18.- Shaeffer, R, A. A., (1910). Selection of food in *Stentor coeruleus*. *J. Exp. Zool.* Vol. 8.
19. – Sharma, R. (2002) Guanylate cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* Vol 230.
20. - Slabodnick, M. Ruby, J. Reiff, S. Roy, S. Marshall, W. Rood, P. (2017) The macronuclear genome of *Stentor coeruleus* Reveals Tiny Introns in a Giant Cell. *Curr. Biol.* Vol. 27.
- 21.- Sokolowski, M.B. Kaun, R. (2005) Candidate genes for behavioural ecology. *Trends Ecol. Evol.* Vol. 96.
- 22.- Tamaoki, T. Nomoto, H. Takahashi, I. Kato, Y. Morimoto, M. Tomita, F. (1986) Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid Ca⁺⁺ dependent protein kinase. Elsevier, Vol. 135.
- 22.- Tartar, V. 1961. *The Biology of Stentor*. Pergamon press, Oxford. International series of monographs on pure and applied biology, Vol. 5.
- 23.- Wolfertstetter, S. Huettner, P. Schlossmann, J. (2013) cGMP-Dependent protein Kinase inhibitors in Health and Disease. *Pharma.* Vol. 6.
- 24- Young, L. Nielsen, R. Wimire, K. Mcgregor, G. Insel, T. (1999) Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from monogamous vole. *Nature.* Vol. 400.