



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales



**Cambios en la supervivencia, reproducción sexual y fenotipo de
Caenorhabditis elegans en respuesta a *Pseudomonas aeruginosa***

Opción de titulación

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

Eunice Peralta Rojas

Dirigido por:

Fausto Arellano Carbajal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Presidente

Firma

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Secretario

Firma

Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez

Vocal

Firma

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Suplente

Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

RESUMEN

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre que presenta poblaciones compuestas principalmente por hermafroditas que se reproducen por autofertilización; sin embargo, son capaces de reproducirse de manera sexual en presencia de machos, que representan entre el 0.1% y 0.2% de la población total. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los cambios en reproducción, supervivencia y fenotipo que experimenta *C. elegans* durante la exposición a patógenos. Mediante la exposición de individuos hermafroditas de *C. elegans* a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*, se evaluaron las variaciones en la tasa de reproducción sexual de *C. elegans*, por medio del conteo directo de machos y hermafroditas durante 10 generaciones. Además se realizaron pruebas de fertilidad basadas en el número de huevos y el porcentaje de eclosión de los mismos en cada generación, para poder evaluar el impacto de *P. aeruginosa* sobre la eficacia biológica de *C. elegans*. Finalmente se tomaron algunas características fenotípicas que incluyen el tamaño corporal y la pigmentación de *C. elegans*, para analizar los posibles efectos del patógeno sobre estas. Se encontró que el número de machos aumenta de manera significativa en presencia *P. aeruginosa* en las primeras dos generaciones con respecto al control. Además, el número de huevos y larvas en el nematodo fue mayor con *P. aeruginosa*, pero esto no se reflejó en el porcentaje de eclosión, lo que indica que no todos los huevos están siendo viables en los gusanos expuestos a *P. aeruginosa*. Por último los gusanos en *P. aeruginosa* son más grandes y se encuentran más pigmentados que los expuestos a *E. coli*, esto puede deberse a la estrecha relación entre estas características y las vías de señalización involucradas en la respuesta inmune. Todos estos cambios en *C. elegans* inducidos por la bacteria patógena, muestran que los hospederos cuentan con diversas estrategias que les permiten hacer frente a los patógenos y que cambian dinámicamente a lo largo del tiempo basándose en una alocaación diferencial de los recursos para cada una de estas características.

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, patógenos, recursos, reproducción, supervivencia, fenotipo.

SUMMARY

Caenorhabditis elegans is a free-living nematode whose populations are composed mainly by hermaphrodites that reproduce by self-fertilization; however, they are able to reproduce in a sexual manner in the presence of males, representing between 0.1% and 0.2% of the total population. My goal was to characterize changes in reproduction, survival and phenotype in *C. elegans* during the exposure to pathogens. By exposing *C. elegans* hermaphrodites to the pathogen bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, changes were assessed in the rate of sexual reproduction of *C. elegans*, by direct counting of males and hermaphrodites for 10 generations. In addition, fertility tests were performed based on the number of eggs and hatching rate of the same in every generation, to assess the impact of *P. aeruginosa* on the fitness of *C. elegans*. Finally, some phenotypic characteristics were measured, including body size and pigmentation of *C. elegans*, in order to determine the possible effects of the pathogen on these traits. It was found that the number of males increases significantly in the presence of *P. aeruginosa* in the first two generations relative to the control. Furthermore, the number of eggs and larvae was highest in *P. aeruginosa*, but this is not reflected in the hatching percentage, indicating that not all the eggs are still viable in worms exposed to *P. aeruginosa*. Finally, worms exposed to *P. aeruginosa* are larger and are more pigmented than those exposed to *E. coli*, this may be due to the close relationship between these features and the signaling pathways involved in the immune response. All these changes induced by pathogenic bacteria in *C. elegans*, have shown that the hosts have various strategies that allow them to cope with pathogens and that these strategies dynamically change over time based on a differential allocation of resources.

Key words: *Caenorhabditis elegans*, pathogens, resources, reproduction, survival, phenotype.

DEDICATORIAS

A toda mi familia, en especial a mi mamá por su apoyo incondicional por respaldarme siempre durante todos estos años, por nunca dudar de mí, eres mi fuerza.

A esa persona que aunque no está físicamente siempre se hace presente en mis pensamientos en cada momento de mi vida, estás conmigo siempre.

A Fausto y Karina contagiarme su pasión por la ciencia, y por enseñarme a nunca dejar de emocionarme con mis resultados.

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto SEP-CONACYT por la beca de licenciatura.

A Fausto y Karina por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por creer en mí siempre.

Al Dr. Roberto Augusto Ferriz Martínez y a la Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú por aceptar revisar y enriquecer mi trabajo con sus comentarios.

A Xóchitl por proporcionarme la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que utilice en mi trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio de Genética Molecular y Ecología Evolutiva, en particular a Christian por su apoyo en las cuestiones prácticas de mi trabajo y a Zyanya por escucharme siempre y por sus comentarios sobre mí trabajo.

A todos mis amigos por acompañarme durante estos años, por compartir momentos conmigo que hicieron este camino mucho más agradable, especialmente a Ale por compartir conmigo su entusiasmo por la ciencia, a Mara por sus efusivas muestras de cariño, a Chuy por ser mi incondicional.

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. ANTECEDENTES	10
II. 1 El nematodo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
II. 2 Interacción patógeno-hospedero y los efectos sobre características de historia de vida del hospedero	11
II. 3 Sistema Inmune de <i>Caenorhabditis elegans</i>	12
II. 4 <i>Caenorhabditis elegans</i> Como Modelo para la Interacción Patógeno-Hospedero.....	14
III. HIPÓTESIS	16
IV. OBJETIVOS.....	17
IV. 1 Objetivo general	17
IV. 2 Objetivos particulares.....	17
V. METODOLOGÍA	18
V. 1 Manejo y mantenimiento de <i>C. elegans</i>	18
V. 2 Desafío inmune	19
V. 3 Prueba de fertilidad y viabilidad.....	19
V. 4 Diferencias en el tamaño	20
V. 5 Diferencias en la pigmentación.....	21
V. 6 Análisis estadístico	21
VI. RESULTADOS.....	22
VI. 1 Optimización de la metodología	22
VI. 2 Reproducción sexual.....	25
VI. 3 Fertilidad y viabilidad.....	26
VI. 3 Características fenotípicas	28
VII. DISCUSIÓN.....	32
VIII. CONCLUSIONES.....	38
IX. REFERENCIAS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	10
Figura 2.	14
Figura 3.	22
Figura 4.	23
Figura 5.	24
Figura 6.	24
Figura 7.	25
Figura 8.	26
Figura 9.	27
Figura 10.	27
Figura 11.	28
Figura 12.	29

I. INTRODUCCIÓN

La estrecha interacción que tienen los hospederos con sus patógenos provoca un ambiente de constantes cambios para el hospedero, estos involucran distintas características de historia de vida de los organismos que le permiten adaptarse a las condiciones impuestas por su antagonista (Morran et al. 2011; Zuk y Stoehr 2002). Dentro de los cambios provocados por la presión selectiva ejercida por los patógenos se pueden encontrar cambios en la resistencia mediada por componentes del sistema inmune, cambios en la forma de reproducción que puede incrementar la variabilidad genética mediante la recombinación que se da en la reproducción sexual y otras características fenotípicas, entre ellas la fecundidad (Hamilton et al. 1990; Morran et al. 2011; Green y Mason 2013). Estos cambios representan un costo energético que limita la expresión de cada una de las características mencionadas, provocando que exista una discriminación entre a que características dirigir los recursos durante cierto período de tiempo, que se puede ver como una optimización de los recursos (Zuk y Stoehr 2002; Schulenburg *et al.* 2004; Lee 2006). Estos argumentos nos conducen a plantear la hipótesis de que los hospederos utilizarán una variedad de estrategias para responder a los patógenos y que estos a su vez pueden tener efectos indirectos en otras características fenotípicas del hospedero.

Para probar como es que los patógenos influyen sobre características del hospedero, como la reproducción, supervivencia y fenotipo, se utilizó al nematodo modelo *Caenorhabditis elegans* y a su bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*. *C. elegans* tiene poblaciones compuestas principalmente por hermafroditas y, en menor proporción de machos, en cuya presencia se pueden reproducir de manera sexual. Durante la autofertilización, que es el proceso más usual de reproducción de *C. elegans*, la proporción de machos en la población puede alcanzar hasta el 0.2% (García et al. 2007). Debido a su ciclo de vida corto y fácil manipulación muchas características fenotípicas pueden ser medidas fácilmente. A pesar de la importancia de *C. elegans* como un modelo de estudio para responder preguntas sobre genética y desarrollo, existen pocos trabajos que

muestren la influencia de los patógenos sobre la activación y dinámica de varias características del nematodo.

II. ANTECEDENTES

II. 1 El nematodo modelo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un nematodo de vida libre, se encuentra principalmente en el suelo en donde se alimenta de bacterias. Su población está compuesta principalmente por hermafroditas que se reproducen por autofertilización, pero en presencia de machos pueden realizar reproducción sexual (Fig. 1) (Marsh y May 2012). En condiciones de laboratorio los machos se encuentran en muy baja frecuencia, representan tan solo entre 0.1%-0.2% de la población total, este porcentaje se genera por medio de la no disyunción del cromosoma X durante la autofertilización (Anderson *et al.* 2010; Prahlad *et al.* 2003). Sin embargo, el porcentaje de machos aumenta cuando ocurre la reproducción sexual, en donde encontramos que el 50% de la descendencia es hermafrodita y el otro 50% son machos (Barrière y Félix 2005; Morran *et al.* 2009).

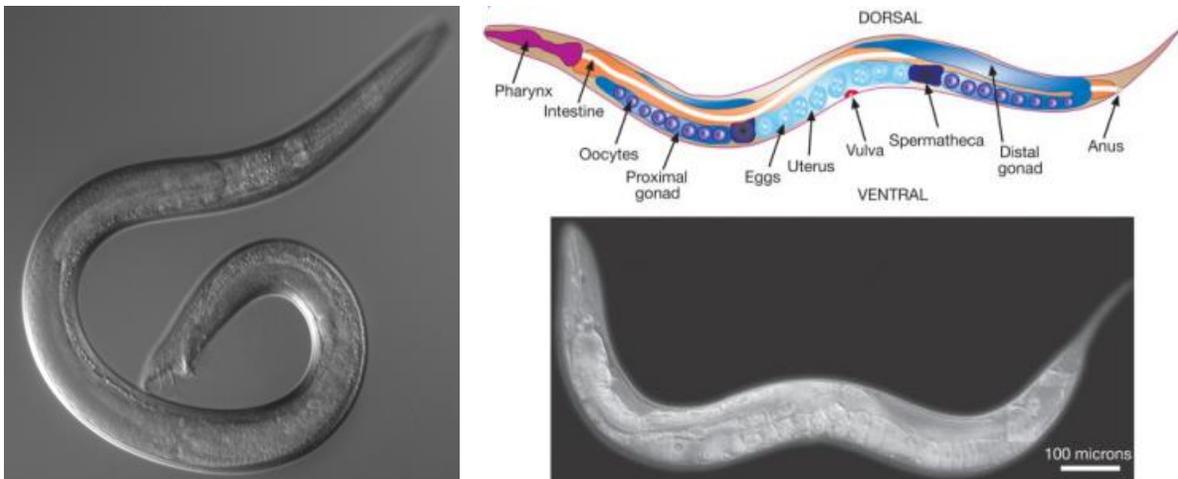


Figura 1. Del lado izquierdo se muestra una foto de un macho adulto de *C. elegans*. Del lado derecho se puede observar la anatomía de un individuo hermafrodita adulto.

Su ciclo de vida es corto y se mantienen fácilmente en el laboratorio en placas de Petri con agar, en 3 días completan su desarrollo de huevo a adulto y llegan a vivir alrededor de 3 semanas (Ewbank, 2002). Un adulto hermafrodita puede llegar a poner alrededor de 300 huevos, por lo que en un corto período de tiempo se

obtiene un gran número de individuos (Marsh y May 2012). Por estas características *C. elegans* ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio para responder preguntas de genética y desarrollo principalmente, por lo cual se han desarrollado múltiples herramientas genéticas y moleculares para su estudio (Kurz y Ewbank 2000).

II. 2 Interacción patógeno-hospedero y los efectos sobre características de historia de vida del hospedero

Las interacciones que se dan entre los patógenos y sus hospederos provocan la generación de una gran cantidad de cambios en ambos interactuantes, los cuales involucran cambios sobre distintas características que les permitan adaptarse a las condiciones generadas por su antagonista (Shulenburg *et al.* 2009; Zuk y Stoehr 2002). Esto es un proceso dinámico en donde las poblaciones de parásitos están constantemente generando mecanismos que le permitan tener una mayor infectividad, mientras el hospedero responde con nuevos mecanismos de resistencia, estas repuestas se alternan y cambian continuamente (Schulte *et al.* 2010; Morran *et al.* 2011).

Los cambios más importantes que se dan en estas interacciones se observan en la virulencia del patógeno, que puede involucrar la liberación de toxinas, y en la resistencia del hospedero generalmente relacionada con la activación del sistema inmune (Schulte *et al.* 2010). Enfocando nuestra atención en este último, podemos ver que el montar una respuesta inmune es energéticamente costoso, y si lo ponemos en el contexto en donde por lo general los recursos con los que cuenta un organismo son limitados, se establece que va a existir un canje con otras características del hospedero que compiten por los recursos con la inmunidad, entre las que se encuentran principalmente la reproducción, el crecimiento y el desarrollo (Zuk y Stoehr 2002; Shulenburg *et al.* 2004; Lee 2006). En cuanto a los cambios que se dan en la fertilidad como consecuencia de la interacción con

patógenos, en *C. elegans* se cree que el tener que montar una respuesta inmune justo antes de que se lleve a cabo la reproducción temprana puede ser costoso, ya que los recursos en esta etapa se enfocan en la producción y desarrollo de los huevos, en este período de tiempo la protección contra patógenos parece tener un lugar secundario para los adultos que se encuentran en su etapa reproductiva, caso contrario para las larvas (Schulenburg *et al.* 2004).

Por otro lado se ha visto que el estrés ejercido por los patógenos sobre su hospedero, puede llevar a que las poblaciones de hospederos, que tienen tanto la reproducción sexual como asexual, se reproduzcan sexualmente, incrementando así la probabilidad de generar nuevos genotipos que le proporcionen una ventaja contra la infección (Green y Mason 2013; Hamilton *et al.* 1990). Trabajos realizados en *C. elegans* muestran que las tasas de entrecruzamiento de la población se incrementan al estar en contacto con bacterias patógenas (Parmenter *et al.* 2009, Morran *et al.* 2011). Esto se puede ver como un mecanismo que exhiben las especies para aumentar la variabilidad genética en presencia de patógenos y se podría considerar como otra forma de defensa contra los patógenos, al aumentar la probabilidad de que una mayor cantidad de individuos puedan sobrevivir. Hacen falta más trabajos que estudien en qué momento se dan estos cambios en las características del hospedero y como es que estas características interaccionan entre ellas.

II. 3 Sistema Inmune de *Caenorhabditis elegans*

El nematodo *Caenorhabditis elegans* carece de sistema inmune adaptativo y en comparación con otros invertebrados no muestra una respuesta inmune mediada por células (Millet y Ewbank 2004). El nematodo cuenta con tres mecanismos de defensa principales, la primera de ellas se basa en respuestas de comportamiento, tal como lo es el comportamiento de evasión a bacterias patógenas; en segundo lugar se encuentran las barreras físicas, que protegen las zonas que pueden

entrar en contacto con los patógenos, una de ellas es la fuerte cutícula que cubre todo su cuerpo; por último se encuentran las defensas fisiológicas dentro de las cuales se encuentran las vías de señalización que regulan la producción de péptidos antimicrobianos (Schulenburg *et al.* 2004).

Como es que se da el reconocimiento inicial de los patógenos que desencadena la respuesta inmune en *C. elegans* no ha quedado totalmente claro. A pesar de esto se han identificado varias vías de señalización que se activan durante la infección y que al final llevan a la producción de moléculas efectoras, que limitan o destruyen al patógeno. Dentro de estas se encuentran la vía de las MAP quinasas, TGF- β , DAF-2, y la vía de la muerte celular programada (Engelmann y Pujol 2010). Para fines de este trabajo solo se va a describir de manera general la vía TGF- β y la vía Toll que todavía no está completamente caracterizada en el nematodo.

Se ha observado que la vía TGF- β además de estar involucrada en la respuesta inmune regula entre otras cosas, el tamaño corporal del nematodo. DBL-1 actúa como ligando uniéndose a los receptores SMA-6 y DAF-4, una vez activados ellos señalizan a través de los factores citoplasmáticos Smads, que llegan al núcleo para regular la transcripción (Fig. 1A) (Nicholas y Hodgkin 2004). La vía Toll está bien caracterizada en vertebrados y en algunas especies de invertebrados como la mosca de la fruta. Sin embargo, en *C. elegans* solo se pueden encontrar homólogos de ciertos componentes de esta vía y se cree que está involucrada en la conducta de evasión mediante la cual discrimina entre una bacteria patógena y una que no lo es (Kurz y Ewbank 2003). El único receptor Toll que se ha encontrado en *C. elegans* TOL-1 se une a su ligando, aún desconocido, esta unión desencadena una señalización que se da a través de TIR-1 y PIK-1 que liberará un factor de transcripción desconocido por IKB-1 (Fig. 1B) (Nicholas y Hodgkin 2004).

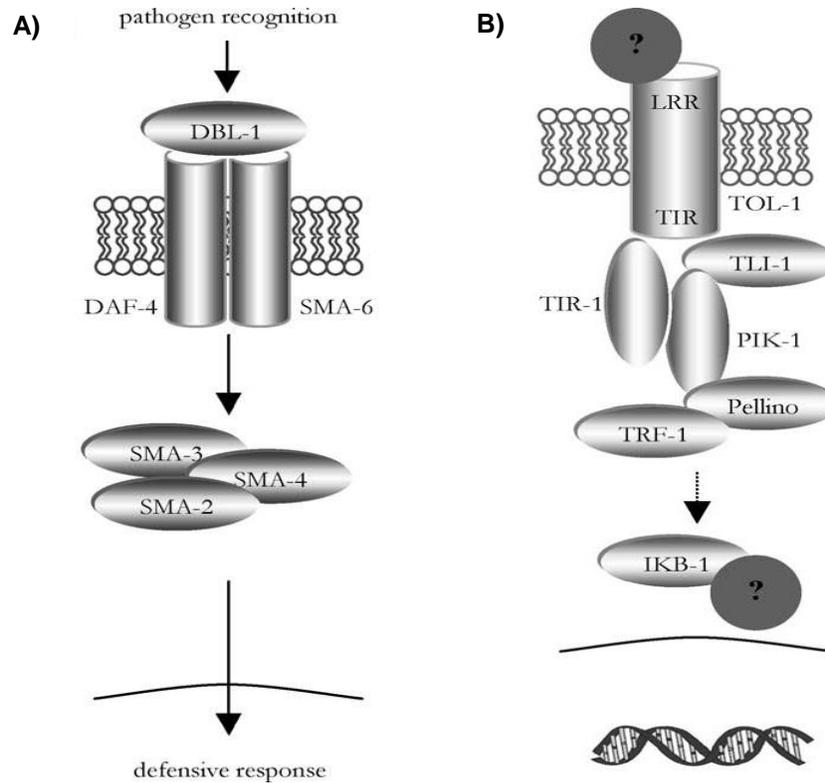


Figura 2. Vías de señalización activadas durante la infección por patógenos. A) Vía del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). B) Vía de señalización Toll. (Tomada de Nicholas y Hodgkin 2004)

II. 4 *Caenorhabditis elegans* Como Modelo para la Interacción Patógeno-Hospedero

Los mecanismo de infección y las estrategias de defensa inmune del hospedero son unas de las características importantes que se dan durante la interacción entre patógenos y hospederos. El estudiar las bases moleculares de esta interacción nos permite conocer los factores de virulencia empleados por los patógenos, así como las vías y moléculas efectoras que se activan en el hospedero, lo que nos da un mayor entendimiento de la dinámica que lleva al desarrollo de la enfermedad. Este proceso, sin embargo, es difícil de observar en hospederos vertebrados (Kurz y Ewbank 2000, Alegado *et al.* 2003, Man-Wah y Ausubel 2000).

Una gran variedad de microorganismos que son agentes causales de enfermedades en vertebrados, pueden llegar a infectar hospederos invertebrados mostrando señales claras de daño, lo que indica que existen mecanismos del patógeno y del hospedero que han sido conservados entre las especies. Esto abre una ventana de posibilidades para el estudio de enfermedades que afectan a humanos y otros vertebrados, en organismos modelo más sencillos de manipular y que son susceptibles a los mismos patógenos, centrándose principalmente en la respuesta inmune innata presente en prácticamente todos los organismos (Marsh y May 2012, Sifri *et al.* 2005, Man-Wah y Ausubel 2000).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* se ha perfilado como un fuerte candidato para elucidar a nivel molecular las interacciones patógeno-hospedero, varios estudios demuestran que es susceptible a bacterias y hongos que afectan también a mamíferos (Darby, 2005). Además, por sus características fenotípicas y las herramientas genéticas y moleculares disponibles para su estudio, resulta más sencillo medir tanto a nivel molecular como a nivel fenotípico los cambios que provoca el patógeno durante la infección (Marsh y May 2012).

III. HIPÓTESIS

La tasa de reproducción sexual de *Caenorhabditis elegans* aumentará al ser expuesto a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* y su eficacia biológica al igual que algunos aspectos morfológicos se verán afectados.

IV. OBJETIVOS

IV. 1 Objetivo general

Caracterizar los cambios en la tasa de reproducción sexual de *C. elegans* al ser expuesto a un patógeno, así como los efectos que este tiene sobre su eficacia biológica y su morfología.

IV. 2 Objetivos particulares

- Medir la frecuencia de machos en la población como un indicador de la reproducción sexual.
- Identificar los cambios en la fertilidad de *C. elegans* mediante el conteo de huevos y su porcentaje de eclosión.
- Observar si existen cambios en el tamaño y en la pigmentación de *C. elegans* como uno de los efectos observables que produce el patógeno.

V. METODOLOGÍA

Durante un período de aproximadamente un año se realizaron varios experimentos los cuales sufrieron distintas modificaciones, con el fin de aumentar el poder estadístico. Para la parte de los desafíos inmunes la única variación entre los experimentos fue el número de placas utilizadas. En la Prueba 1 (realizada del 22/10/13 al 28/11/13) se utilizaron 5 cajas de Petri de 9 cm por tratamiento y en cada una se colocaban 10 individuos. En la Pruebas 2 (realizada del 24/03/14 al 07/05/14) se utilizaron 8 réplicas por tratamiento y el tamaño de las cajas fue el mismo. En el caso de las pruebas de fertilidad y viabilidad se utilizaron cajas de Petri de 6 cm, y al igual que en los desafíos inmunes el número de réplicas fue la única diferencia entre las dos pruebas, en la Prueba 1 se realizaron 5 repeticiones y 8 para la Prueba 2.

V. 1 Manejo y mantenimiento de *C. elegans*

Para los experimentos se utilizó la cepa N2 (tipo silvestre) de *C. elegans*. Para el uso y mantenimiento de esta cepa se utilizaron cajas de Petri con medio NGM (3 g NaCl, 2.5 g Peptona, 17 g Agar; 1 ml de colesterol en etanol (5 mg/ml), 1 ml CaCl 1M, 1 ml MgSO₄ 1M, 25 ml KPO₄ 1M pH 6.0), las cuales eran sembradas con la bacteria *E. coli* cepa OP50 utilizada como fuente de alimento (Brenner, 1974 y Stiernagle, 2006). Se colocaban 5 individuos L4 (último estadio larval) en cajas nuevas aproximadamente cada tres o cuatro días, para evitar que se quedaran sin alimento y eliminar de esta manera cualquier factor estresante que pudiera interferir en los resultados. Para la realización de los experimentos se tomaron los gusanos de placas libres de contaminación. Las bacterias utilizadas para nuestro experimento se crecieron en medio líquido 2xTY (16 g de Triptona, 10 g de Extracto de Levadura y 5 g de NaCl), y para su mantenimiento en el laboratorio se resembraba una muestra del stock anterior.

V. 2 Desafío inmune

Para los desafíos inmunes se formaron dos grupos experimentales utilizando dos tipos de bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 53308 (bacteria patógena) y *Escherichia coli* OP50 (bacteria no patógena). Se sembraron 360 µl de las bacterias en cajas de Petri de 9 cm con medio NGM, manteniendo la misma concentración para ambas bacterias, esto se logró al medir la densidad celular óptica de las dos bacterias en un espectrofotómetro, para después diluir con medio 2xTY y de esta manera igualar las concentraciones.

Para esta prueba se utilizaron 10 larvas por placa en estadio L4 de *C. elegans*, con esto nos aseguramos de tomar solamente individuos vírgenes. Durante 10 generaciones se contó el número total de individuos por placa, que oscilaba entre 500 y 800, así como el número total de machos, los conteos se realizaron cada 4 días. Se tomó como primera generación a los descendientes de los 10 individuos colocados al inicio del experimento. En todas las generaciones de cada placa se tomaron al azar nuevamente 10 individuos en estadio L4, que se colocaron en una nueva placa para esperar y contar la siguiente generación. Ambos grupos se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (18°C) y de alimentación controladas. Los conteos de machos se hicieron 2 días seguidos para poder contar los individuos que probablemente el primer día de conteo se encontraban en etapas larvales tempranas lo cual dificulta su identificación.

V. 3 Prueba de fertilidad y viabilidad

En el experimento de fertilidad y viabilidad se separaron un día antes los individuos hermafroditas en estadio L4 para poder tener el día del experimento individuos adultos de 1 día y eliminar esa variable que pudiera meter ruido en los experimentos. Para cada grupo experimental de cada una de las placas utilizadas para los desafíos inmunes se separaban 10 individuos L4, para ser utilizados al

siguiente día en la prueba de fertilidad, con esto se aseguró que todos los gusanos utilizados fueran adultos de 1 día. Los individuos grávidos se colocaron en nuevas placas, en donde se dejaron por dos horas, después de este tiempo se retiraron todos los individuos y se contó el número de huevos. A las 24 horas se contó el número de larvas para determinar el número de huevos viables con base en el porcentaje de eclosión. Para esta prueba se utilizaron cajas de Petri de 6 cm, cada una sembrada con 180 μ l de bacteria cuidando que siempre estuvieran a la misma concentración *E. coli* y *P. aeruginosa*. Este proceso lo realizó una sola persona en cada generación contando solamente una vez.

V. 4 Diferencias en el tamaño

Para poder observar si existían diferencias en el tamaño corporal de los gusanos dependiendo del tratamiento, se midió la longitud, el ancho, el área y el perímetro de varios individuos. Una vez que se concluía con las pruebas de fertilidad se usaban los mismos individuos que habían sido separados anteriormente para ser medidos, por lo tanto para esta prueba se contaba con individuos adultos de 2 días. Para cada grupo experimental se realizaron preparaciones temporales para ser observados al microscopio. Para esto se colocó una gota de una preparación de agarosa al 2% en buffer M9 (3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO_4) sobre un portaobjetos para formar una especie de cama, sobre la agarosa se colocó una gota de Buffer M9 con levamisol a una concentración de 0.8 mM (Stiernagle, 2006). Los gusanos se sumergieron en el levamisol para inmovilizarlos y se colocó un cubreobjetos para poder observarlo al microscopio. Una vez en el microscopio se tomaron fotos de todos los individuos para después analizarlas con ayuda del programa Image J.

Para obtener la longitud, mediante el uso de Image J, se trazó una línea recta a lo largo de todo el cuerpo del gusano, desde la punta de la cabeza hasta el inicio de la cola; se midieron en total 20 individuos en cada generación. El ancho se midió

al trazar una línea recta de un lado al otro del cuerpo tomando como referencia la posición de la vulva, se tomaron en total 15 gusanos para cada tratamiento. En el caso del área y el perímetro se delineó todo el contorno del gusano, para ambas se utilizaron 15 individuos.

V. 5 Diferencias en la pigmentación

En esta prueba las fotos fueron igualmente analizadas y procesadas con el programa de Image J. En el programa la imagen se transformó a escala de grises y se estableció el valor umbral en 95.78 en el cual se medían todas las imágenes, esto nos permitió hacer una selección de los lugares en donde se observan las diferencias en la pigmentación, en este caso en el tracto digestivo. Para esta prueba se midieron 10 individuos por tratamiento.

V. 6 Análisis estadístico

Para poder comprobar si nuestros datos presentaban una distribución normal usamos la prueba de Shapiro-Wilk. Para los datos con distribución normal se realizó la prueba T de Student, la prueba U de Mann-Whitney fue aplicada a los datos no normales.

VI. RESULTADOS

VI. 1 Optimización de la metodología

En esta sección se muestran los resultados de la primera prueba, realizada de octubre a noviembre del 2013, los cuales muestran la necesidad de repetir los experimentos con algunas modificaciones en la metodología. En todas las generaciones se observa la presencia de machos en el tratamiento con *P. aeruginosa* y en las primeras nueve generaciones el porcentaje de machos siempre fue mayor que el control, sin embargo, nuestros datos muestran un error estándar muy grande lo cual no permite observar diferencias significativas en ninguna generación. Además en ninguna generación el porcentaje de machos alcanzó los niveles que se pueden encontrar de manera normal en la población de *C. elegans*, esto es igual en ambos tratamientos (Fig. 3).

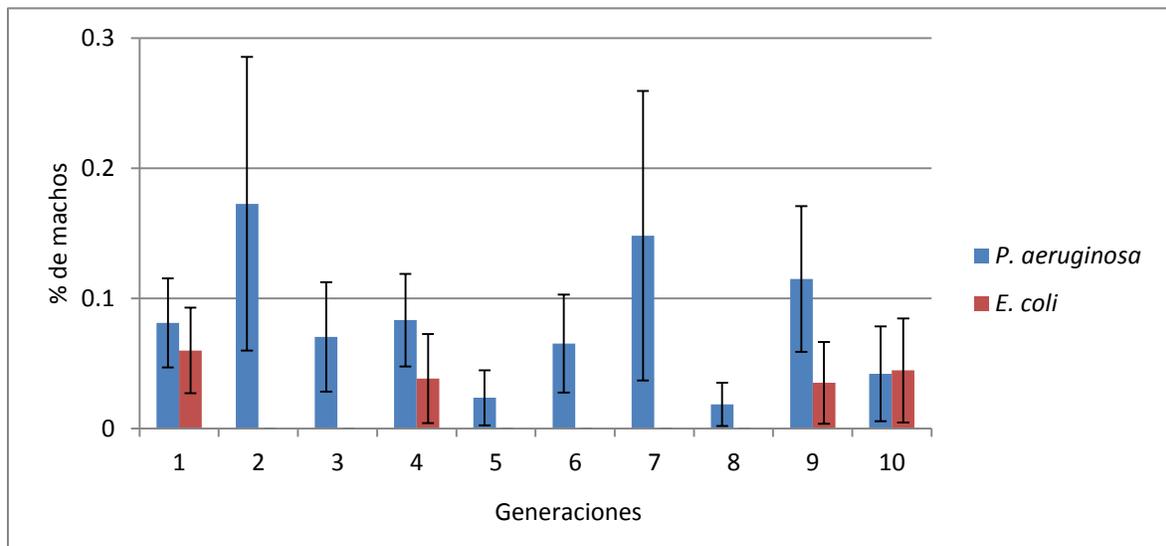


Figura 3. Porcentaje de machos en cada generación para ambos tratamientos, se utilizaron 5 réplicas por tratamiento.

En cuanto al número total de huevos en ninguna generación tenemos diferencias significativas a excepción de la generación 10. En las generaciones 2, 4, 5, 6, 7 y 10 el número de huevos fue mayor para *P. aeruginosa* (Fig. 4).

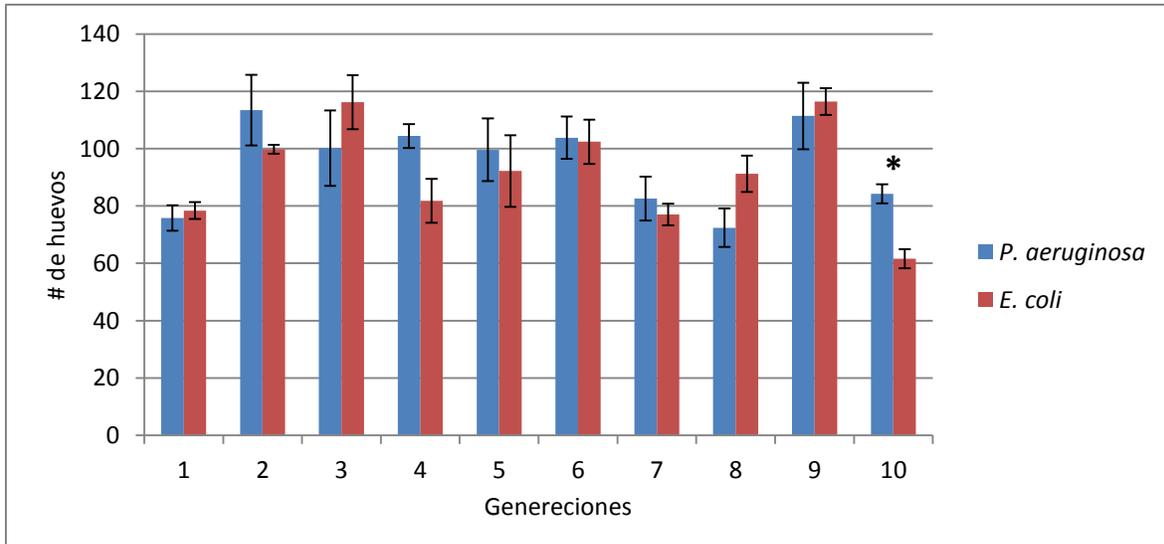


Figura 4. Número total de huevos en cada generación. Se usaron 5 placas por tratamiento.

En la gráfica del número de larvas nuestras barras de error son demasiado grandes, esto mismo pasa para nuestros datos del número de huevos. En la única generación en la que fue posible observar diferencias significativas fue en la número 10, en donde *P. aeruginosa* presenta un mayor número de larvas que *E. coli*. En 6 de las 10 generaciones el número de larvas es mayor en *E. coli* pero ninguna es estadísticamente significativa (Fig.5).

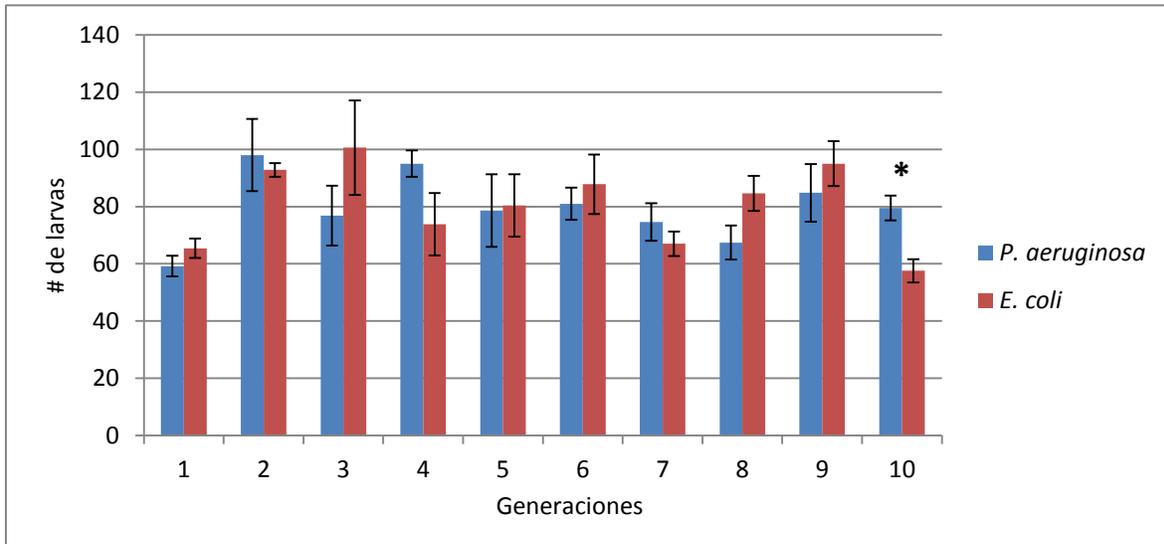


Figura 5. Número total de larvas durante las 10 generaciones. Para cada tratamiento se realizaron 5 réplicas.

En las gráficas de porcentaje de eclosión nuestro error se reduce pero a pasar de esto en ninguna generación se observaron diferencias significativas entre tratamientos. *P. aeruginosa* solo en 4 de las 10 generaciones muestra un ligero incremento en el porcentaje de eclosión con respecto al control, por otro lado el porcentaje de eclosión es mayor en *E. coli* en 6 de las 10 generaciones, y al ver la gráfica esta diferencia es más obvia en *E. coli* (Fig. 6).

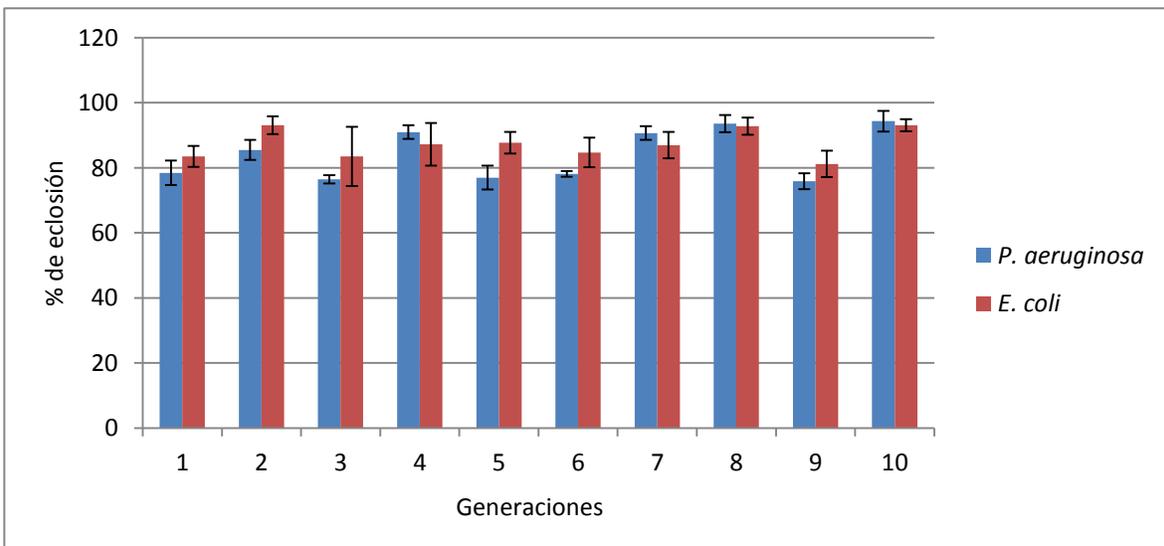


Figura 6. Porcentaje de eclosión en *P. aeruginosa* y *E. coli* durante las 10 generaciones. Se utilizaron 5 placas por tratamiento.

VI. 2 Reproducción sexual

A partir de esta apartado solo se mostrarán los resultados obtenidos durante la Prueba 2 realizada de Marzo a Mayo del 2014. En cuanto al porcentaje de machos, el cual lo tomamos como una medida indirecta de la reproducción sexual en la población, encontramos que la tendencia de observar un mayor número de machos en *P. aeruginosa* se mantiene, y en las primeras dos generaciones podemos decir que esta diferencia entre tratamiento es significativa. En cinco generaciones el porcentaje de eclosión de *C. elegans* en presencia de *P. aeruginosa* sobrepaso el valor más alto que se puede encontrar de manera normal en la población de *C. elegans*. En el caso de *E. coli* solamente en dos ocasiones superó el 0.2%, y en la generación 3 fue en la única en la que se observó un mayor porcentaje de machos de *C. elegans* en *E. coli* (Fig. 7).

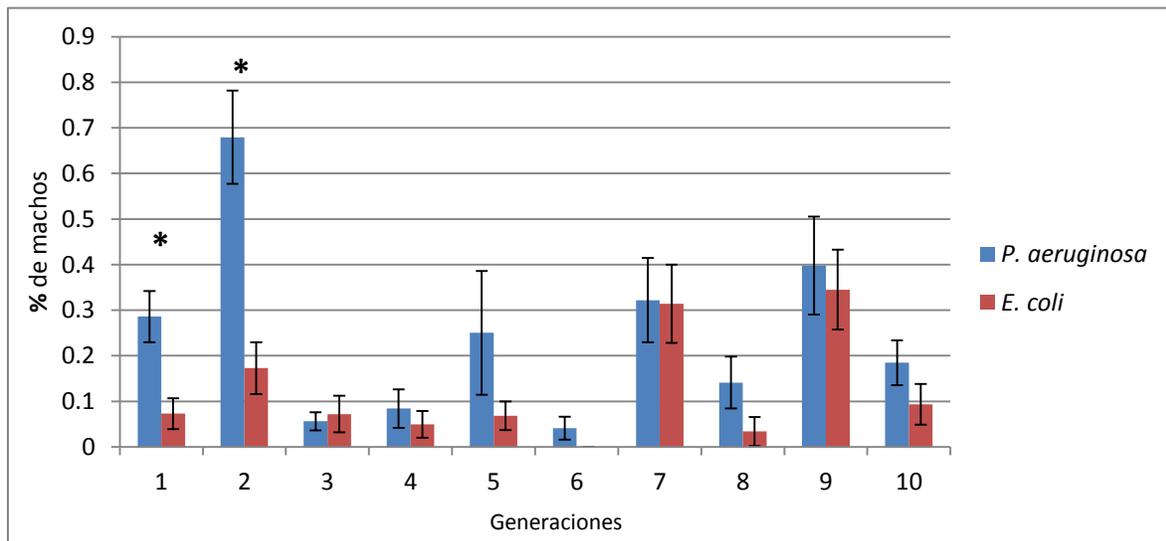


Figura 7. Porcentaje de machos en la población para ambos tratamientos. Se utilizaron 8 réplicas por tratamiento.

VI. 3 Fertilidad y viabilidad

La figura 8 nos muestra que el número de huevos fue mayor en *P. aeruginosa* en 8 generaciones, solamente en la generación 3 y 5 *E. coli* superó a *P. aeruginosa* encontrándose solamente en la generación 5 diferencias significativas. En 6 de las 10 generaciones se encontraron diferencias significativas siendo en 5 de ellas el número total de huevos mayor en *P. aeruginosa*, en la generación 2 se observa el primer aumento en el número de huevos y a partir de la generación 6 el otro aumento el cual se mantiene hasta el final del experimento.

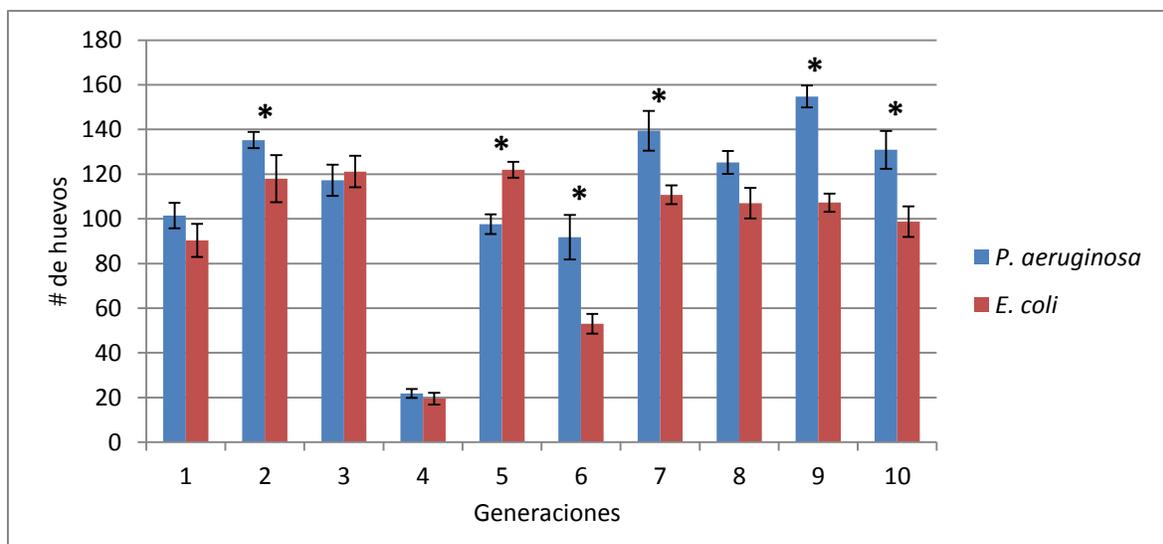


Figura 8. Número total de huevos en cada generación. Se realizaron 8 réplicas para cada tratamiento. * $p < 0.05$.

El número de larvas mantiene el mismo patrón observado en el número de huevos, en el cual los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* presenta un mayor número de larvas en las dos primeras generaciones, después de esto el patrón se invierte, y se retoma nuevamente esta ventaja a partir de la generación 6. Solo en las generaciones 3, 4 y 5 el número de larvas fue mayor en *E. coli* que *P. aeruginosa* siendo significativa esta diferencia en las generaciones 4 y 5 (Fig. 9).

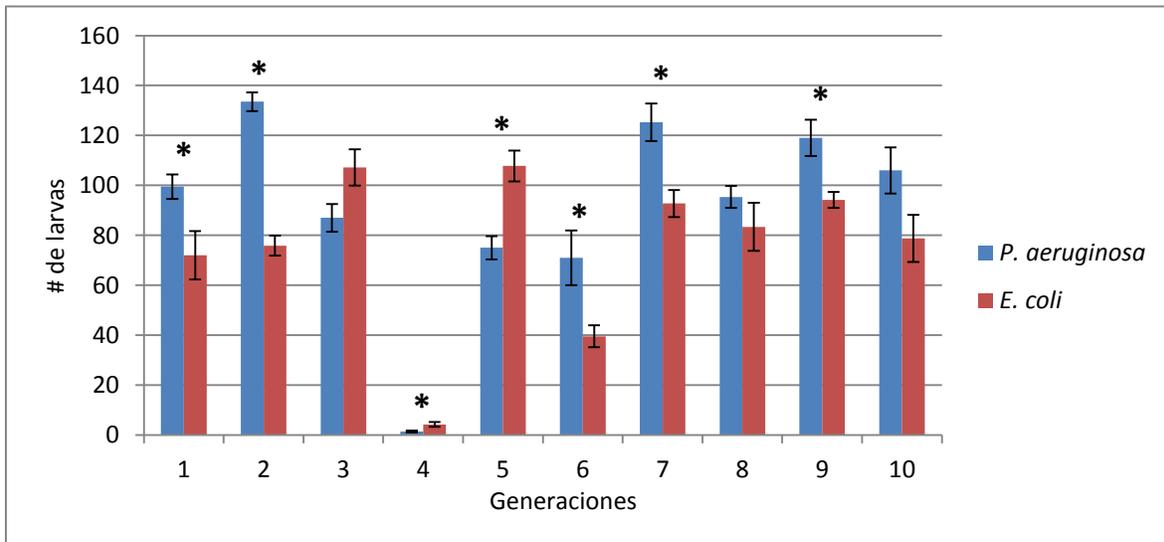


Figura 9. Número de larvas totales en cada generación. Se utilizaron 8 placas por tratamiento. * $p < 0.05$.

En el porcentaje de eclosión la ventaja de *P. aeruginosa* sobre el control en cuanto a un mayor número de huevos y número de larvas no se ve reflejada. Solo en las dos primeras generaciones y en la generación 7 el porcentaje de eclosión fue significativamente mayor en los gusanos del tratamiento con *P. aeruginosa*. La generación 4 fue la única en donde el porcentaje de eclosión de *C. elegans* en el tratamiento con *E. coli* fue significativamente mayor que en *P. aeruginosa*. De manera general el porcentaje de eclosión osciló entre el 70 y el 100% (Fig. 10).

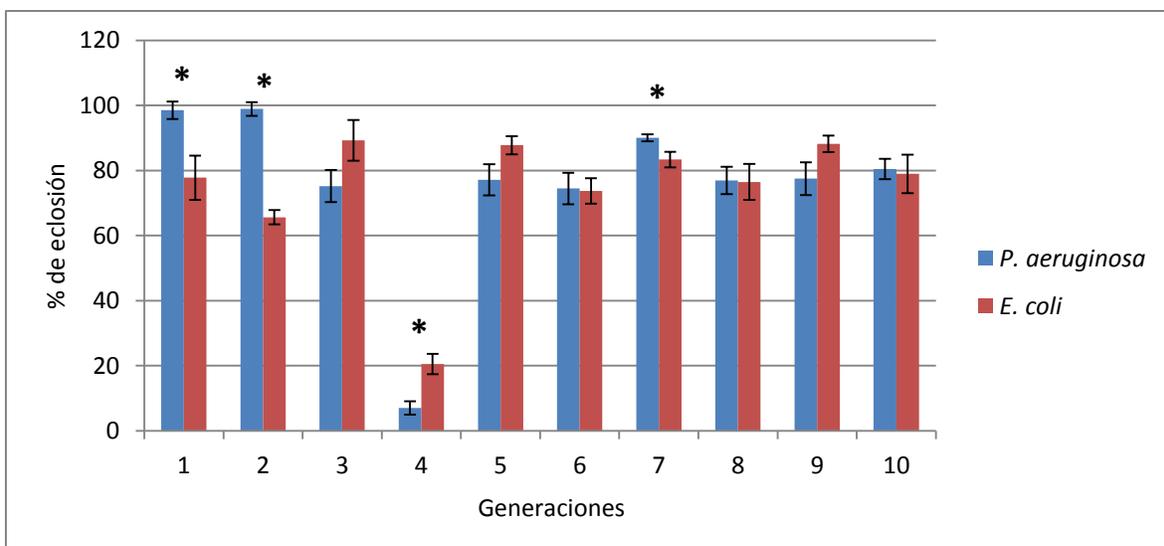


Figura 10. Porcentaje de eclosión en *P. aeruginosa* y *E. coli* durante las 10 generaciones. Se utilizaron 8 réplicas por tratamiento. * $p < 0.05$

VI. 3 Características fenotípicas

Se realizaron medidas de algunas características fenotípicas de *C. elegans* como la longitud, ancho, área, perímetro y pigmentación, para determinar si la exposición al patógeno tiene alguna influencia sobre estas. La longitud no muestra diferencias significativas en las primeras 3 generaciones, en las generaciones 4 y 5 la longitud de los gusanos es mayor en *E. coli*, aunque esto cambia a partir de la generación 6 en donde los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* son significativamente más largos que los expuestos a *E. coli*, lo cual se mantiene hasta la generación 10, a excepción de la generación 9. La longitud de los gusanos en presencia de *E. coli* osciló entre 0.92-1.20 mm, y en *P. aeruginosa* los valores se encontraron entre 0.94-1.22 mm (Fig. 11).

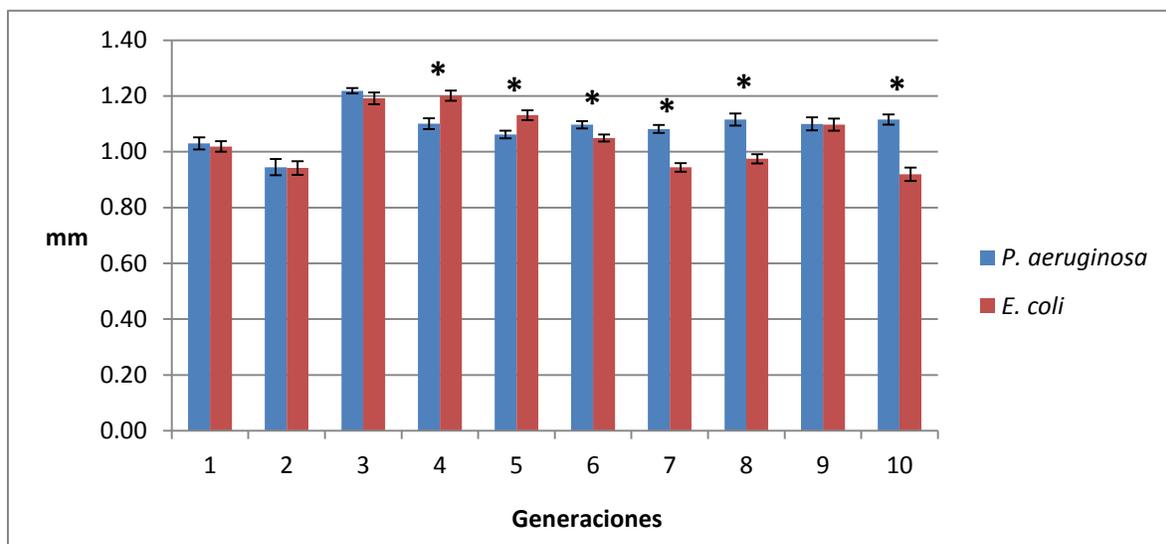


Figura 11. Longitud total de *C. elegans* en ambos tratamientos durante las 10 generaciones. Se midieron en total 20 individuos por generación. * $p < 0.05$.

Las medidas del ancho de los gusanos muestran un patrón más homogéneo, el ancho de los gusanos en *P. aeruginosa* es significativamente mayor al control en 8 de las 10 generaciones, solo en la generación 5 el ancho en los gusanos con el tratamiento de *E. coli* fue mayor pero no hubo diferencias significativas, en la generación 4 *P. aeruginosa* está ligeramente arriba pero no podemos decir que es

significativamente diferente. Los valores de del ancho de los gusanos en *P. aeruginosa* se mantuvieron entre los 0.080 mm en todo el experimento, mientras que para los que se encontraban en contacto con *E. coli* osciló entre los 0.070 mm (Fig. 12).

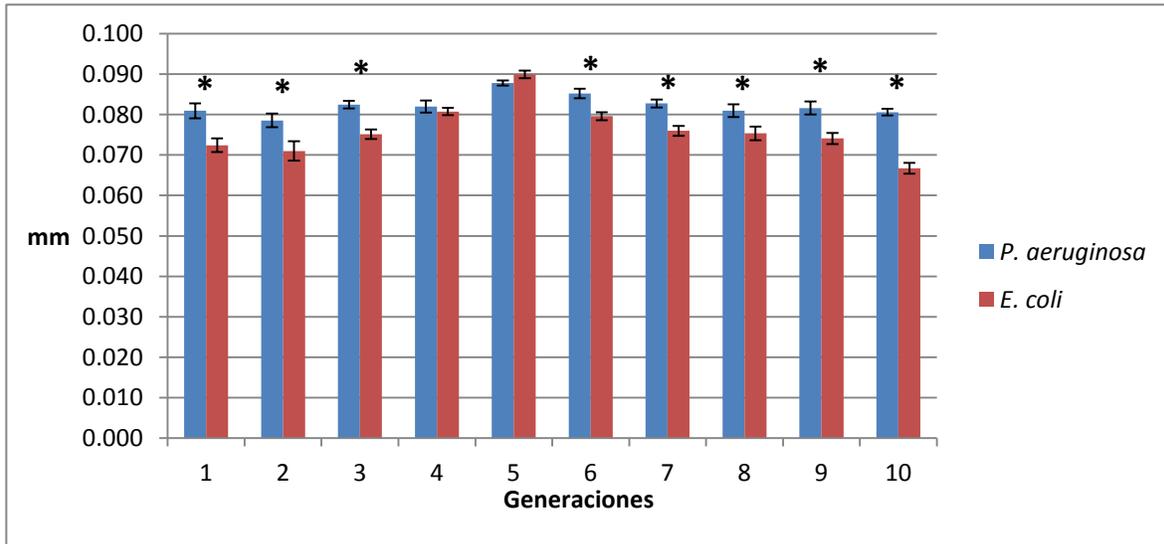


Figura 12. Ancho en milímetros de *C. elegans* durante las 10 generaciones. Las medidas fueron tomadas de 15 individuos diferentes en cada generación. * $p < 0.05$.

Las medidas del área de los gusanos nos muestran que en *P. aeruginosa* de la generación 1-3 y de la 6-10 el área de los gusanos es significativamente mayor que en *E. coli*. En las generaciones 4 y 5 el área en *E. coli* es mayor que en *P. aeruginosa*, sin embargo esta diferencia no es significativa. En las primeras dos generaciones el área de los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* está por debajo de los 80 mm², pero a partir de la generación 3 sobrepasa este valor y esto se mantiene hasta la generación 10. En *E. coli* el área se mantuvo entre los 60 y 80 mm² y solo en la generación 4 y 5 alcanzó sus valores más altos por encima de los 80 mm² (Fig.13).

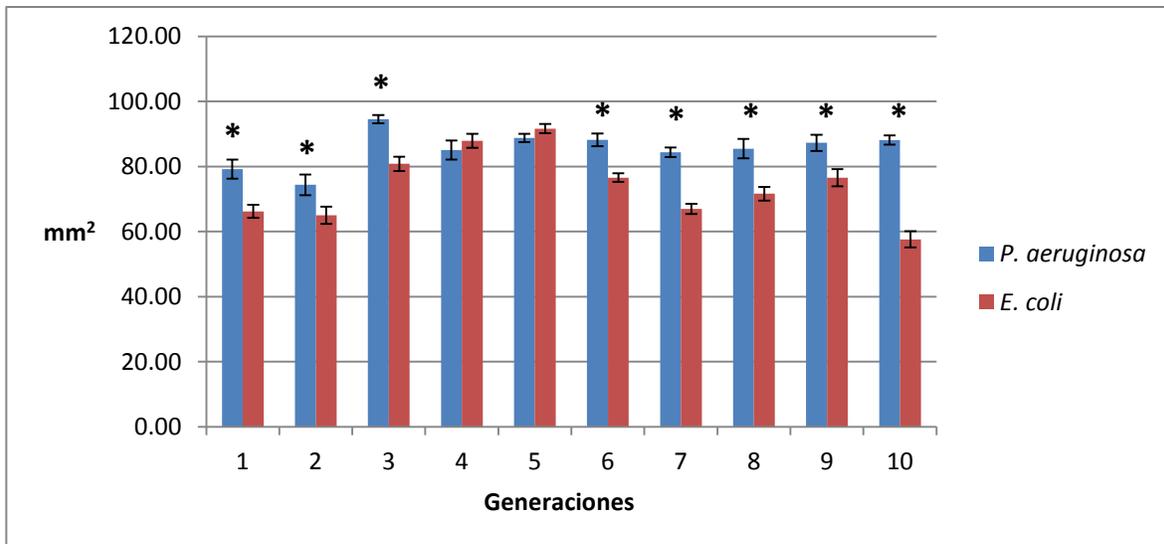


Figura 13. Se muestra el área promedio de los gusanos para cada generación. Se midieron en total 15 individuos por generación. * $p < 0.05$.

En la figura 14 podemos ver que el perímetro de *C. elegans* es mayor en los gusanos expuestos a *P. aeruginosa*, esta diferencia es significativa en la generación 3, 6, 7, 8, 9 y 10, y a partir de la generación 3 el perímetro aumenta en comparación con las primeras generaciones y esto se mantiene hasta la generación 10. Los gusanos expuestos a *E. coli* muestran un perímetro mayor que en la bacteria patógena solo en la generación 4 y 5, en estas generaciones alcanza las medidas más altas en todo el experimento.

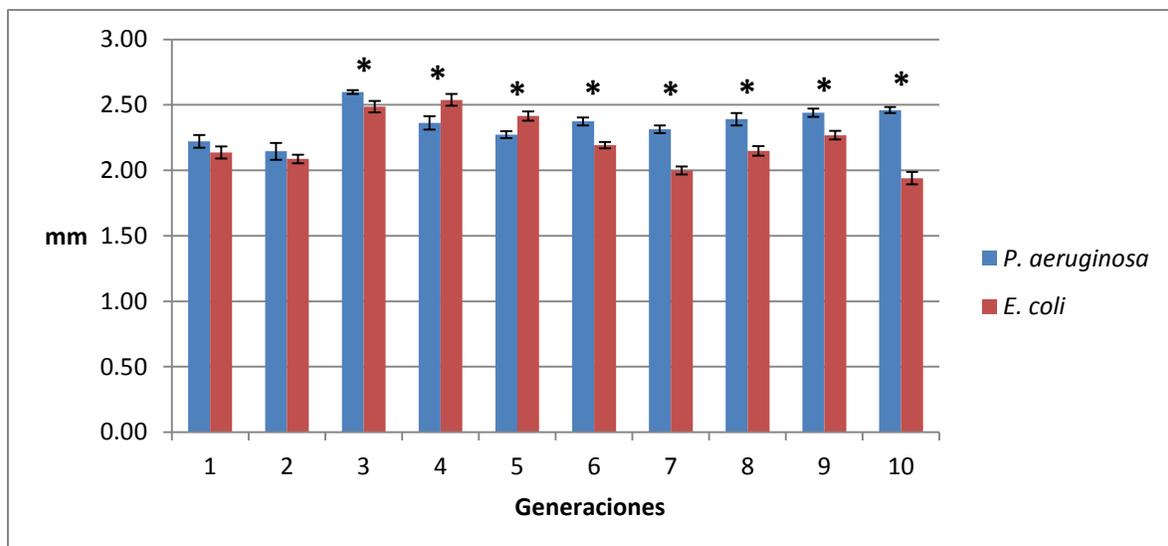


Figura 14. Perímetro de *C. elegans* para cada tratamiento durante las 10 generaciones. Se midieron 15 individuos por generación. * $p < 0.05$.

En cuanto a la pigmentación en las generaciones 2, 3 y 4 *P. aeruginosa* es significativamente mayor que el control, en las generaciones 2 y 3 los niveles de pigmentación van en aumento, pero para la generación 4 disminuyen. En la generación 5 y 6 los gusanos expuestos a *E. coli* muestra mayor pigmentación que se encuentran en contacto con *P. aeruginosa*. Es en la generación 7 y 9 en donde nuevamente la pigmentación *C. elegans* en el tratamiento con *P. aeruginosa* es significativamente mayor y los niveles de pigmentación son aún mayores que los mostrados en las primeras generaciones. De las 5 generaciones en donde los gusanos en contacto con *E. coli* mostraron mayores niveles de pigmentación solamente en la generación 5 esta diferencia es significativa (Fig. 15).

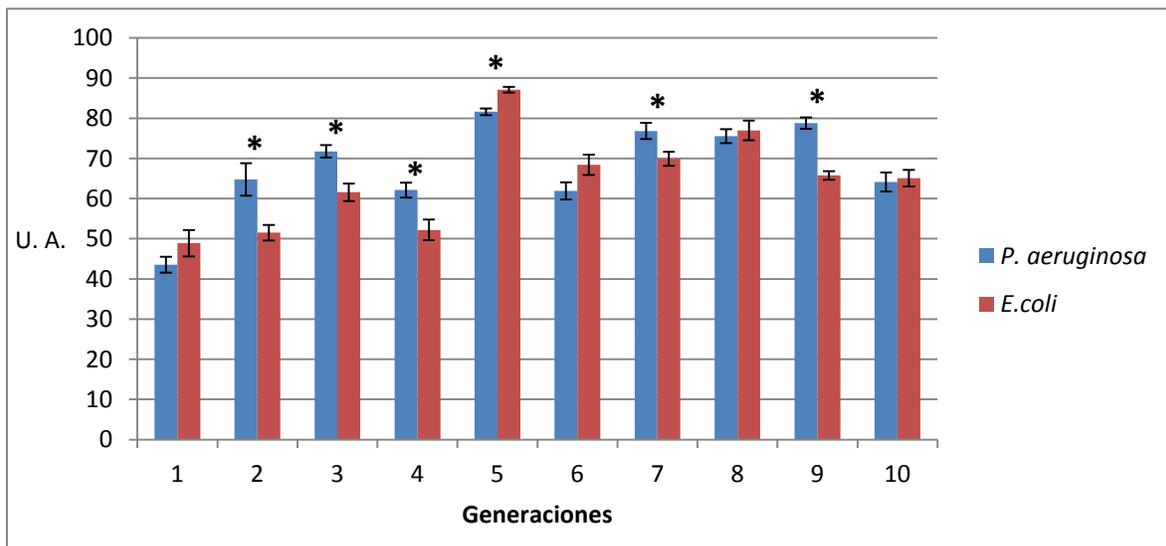


Figura 15. Intensidad de la pigmentación del intestino de *C. elegans*, para cada tratamiento durante las 10 generaciones. En cada generación se tomaron medidas de 10 individuos. * $p < 0.05$.

VII. DISCUSIÓN

Al comparar la prueba 1 y 2 los resultados reflejan que los cambios metodológicos que se implementaron en la prueba 2, los cuales fueron enfocados en aumentar nuestro número de repeticiones por tratamiento, sirvieron para aumentar el poder estadístico y reducir el error más de la mitad. En la prueba 1 fue difícil encontrar en todos los experimentos realizados diferencias significativas entre tratamientos, las únicas que se encontraron fueron en el número de huevos y larvas en la última generación. Esto cambió en la prueba 2, en donde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en todos los experimentos realizados. En las gráficas de porcentaje de machos se observa que fue posible superar en la prueba 2 el 0.2% que es el porcentaje máximo que se puede encontrar de manera natural en la población de *C. elegans*, esto no fue posible en la prueba 1.

Es importante señalar que durante la realización del experimento se notaron cambios fenotípicos en la bacteria *P. aeruginosa* que tienen que ver con su forma de crecimiento en las cajas de Petri, esto se observó en las generaciones 4 y 5, y aunque se siguió utilizando esta misma cepa para continuar el experimento, este crecimiento desapareció en la generación 6. El no volver a encontrar este crecimiento en otras generaciones da pie a pensar que no fue una contaminación de la bacteria lo que se observó, sino solamente un cambio en su fenotipo. Sin embargo, no se tomaron muestras de la bacteria mientras permaneció este comportamiento para poder identificar a nivel molecular, que cambios sucedieron en la bacteria durante este período de tiempo.

Para medir la tasa de reproducción sexual usamos el conteo directo de machos, con lo cual obtuvimos el porcentaje de machos en la población para tomarlo como una medida indirecta de cambios en la tasa de reproducción sexual de *C. elegans*. Se encontró que el porcentaje de machos es mayor en las poblaciones de *C. elegans* que se encuentran en contacto con la bacteria patógena. Sin embargo, solo se observaron diferencias significativas en las 2 primeras generaciones, en donde se llegó a observar un porcentaje de hasta el 0.6%. En 5 ocasiones se

superó el porcentaje normal de machos en la población expuesta a *P. aeruginosa*, lo cual indica que la presión por patógenos puede provocar este incremento en los niveles de machos. Este podría ser un mecanismo alternativo que el hospedero usa para defenderse de los patógenos, al aumentar la recombinación en la población por medio de la reproducción sexual con los machos, lo cual le permiten producir genotipos que puedan ser capaces de escapar de la infección (Schulte *et al.* 2010; Morran *et al.* 2011). El aumento de machos en la población puede complementar la respuesta inmune que el hospedero produce como consecuencia de la infección o alternarse en el tiempo (generaciones) con esta y otras respuestas del hospedero.

Las gráficas que muestran los cambios en la fertilidad y viabilidad de *C. elegans*, muestran que los gusanos que se encontraban en *P. aeruginosa* ponen en general un mayor número de huevos que los gusanos del tratamiento control, esto se mantiene para el número de larvas. Una disminución drástica del número de huevos y larvas se observa en la generación 4 para ambos tratamientos, lo que nos indica que en este caso en específico pudieron estar actuando factores externos que se salieron de nuestro control, uno de ellos pudo ser la temperatura del laboratorio en donde se realizaron los experimentos, ya que a temperaturas elevadas los gusanos pueden ver comprometida su fertilidad (Marsh y May 2012). Otro factor podría ser las variaciones en la temperatura de la cava, esto en consecuencia de cambios en la energía eléctrica. Fue únicamente en la generación 5 en donde el tratamiento control de *E. coli* es significativamente mayor que *P. aeruginosa*, en este caso una posible explicación puede venir del hecho que es justo en esta generación en donde se observó el cambio en la forma de crecimiento en *P. aeruginosa* lo cual pudo alterar el patrón que se observaba en donde normalmente los gusanos expuestos a la bacteria patógena mostraban niveles más altos de larvas y huevos. En este punto podríamos proponer que probablemente ocurrió un cambio en la virulencia, un aumento en esta característica de la bacteria puede tener un mayor efecto patogénico en el gusano, que puede invertir sus recursos a una mayor activación de los mecanismos de defensa. De manera general en *C. elegans* se ha visto que una vez que inicia la

etapa de reproducción enfoca sus recursos en la producción de huevos y la defensa hacia patógenos es secundaria (Shulenburg *et al.* 2009). Esto podría invertirse si el patógeno representa un mayor riesgo para su supervivencia, exhibido por un incremento en la virulencia del patógeno. Una vez que pasan estas generaciones en las cuales se observó el cambio, el patrón en donde los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* muestran niveles mayores de huevos y larvas, se mantiene, lo que sugiere que el cambio en la bacteria tal vez no se mantuvo en las demás generaciones.

El porcentaje de eclosión, no refleja lo mismo que los datos de total de larvas y huevos, ya que a pesar de que los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* mostraron en general un mayor número de huevos y larvas en la mayoría de las generaciones, e los datos de porcentaje de eclosión solo en las generaciones 1, 2 y 7, los nematodos expuestos a *P. aeruginosa* presenta valores significativamente más altos que el control. Lo que sugiere que no todos los huevos están siendo viables en *P. aeruginosa*, caso contrario para *E. coli*, y que probablemente el patógeno afecta el desarrollo de los huevos (Sicard *et al.* 2007). Estudios en *C. elegans* demuestran que en mutantes estériles existe una sobrerregulación del factor de transcripción DAF-16, involucrado en la vía de señalización DAF-2 la cual se enciende en respuesta a patógenos, mejora la respuesta a patógenos por parte del gusano; esto sugiere que existen señales que se generan en el desarrollo embrionario y que pueden regular de manera negativa la función inmune (Miyata *et al.* 2008). Se podría inferir que tal vez un incremento en la señalización de la vía DAF-2 por lo presencia de *P. aeruginosa* está afectando el desarrollo embrionario, lo que se ve reflejado en la disminución del porcentaje de eclosión.

En cuanto a las características fenotípicas, las medidas de longitud, ancho, área y perímetro se refieren de manera general al tamaño del gusano. El ancho de los gusanos en presencia de *P. aeruginosa* muestra medidas significativamente más altas que el control, que se mantiene constante en 8 de las 10 generaciones. El perímetro y la longitud muestran un comportamiento similar, en las primeras generaciones no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, esto

cambio a partir de la generación 6, en donde los gusanos tratados con la bacteria patógena muestran medidas significativamente mayores que su control. Para el área, los gusanos en contacto con *P. aeruginosa* son significativamente más grandes en 8 de las 10 generaciones totales, pero es a partir de la generación 6 en donde se encontraron los valores más altos. Para todas estas medidas el control revirtió este patrón en la generación 4 y 5 en donde fue significativamente más alto. Esto último se puede explicar por lo que ocurrió con la cepa de *P. aeruginosa* durante estas generaciones y se mencionó anteriormente.

Por los patrones observados en estas medidas podemos decir de manera general que los gusanos expuestos a la bacteria patógena son más grandes que los que se alimentan de *E. coli*, y que este aumento en el tamaño se da principalmente en la segunda parte del experimento, en donde además se incrementa los valores con respecto a los que se observan en la primera parte. *P. aeruginosa* desencadena en los gusanos el encendido de varias vías de señalización involucradas con la defensa inmune, una de ellas es la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Se ha observado que esta vía no solo se encuentra involucrada en la respuesta inmune, sino también en la regulación del tamaño corporal del nematodo, los animales muestran una sobrerregulación de esta vía durante una infección y a su vez esta mayor activación produce animales más largos. Por lo tanto, los nematodos al encontrarse en contacto con la bacteria patógena podrían sobre activar esta vía como mecanismo de defensa y explicar porque los gusanos expuestos a *P. aeruginosa* son más grandes que los que se encuentran en presencia de *E. coli* (Roberts *et al.* 2010).

Por último las diferencias en la pigmentación que al principio solo se inferían por la observación directa, se confirmaron al medir esta característica. En las generaciones 2, 3, 4, 7 y 9 se puede observar que los gusanos en *P. aeruginosa* muestran significativamente más intensidad en la pigmentación, siendo en las generaciones 7 y 9, en donde los niveles de pigmentación alcanzan sus valores más altos. Los gusanos expuestos a *E. coli* muestran valores significativamente

más altos de pigmentación solo en la generación 5. Estos resultados son importantes, ya que llevan a proponer que se puede estar dando un proceso de melanización en los nematodos en respuesta a la bacteria patógena, como lo que se observa en insectos (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar 2012; Kurz y Ewbank 2003). La melanización es un mecanismo de defensa que está bien caracterizada en insectos principalmente, en donde hay una deposición de melanina alrededor del agente patógeno, lo que retarda su crecimiento (Cerenius y Söderhäll 2004). Esto se lleva a cabo por medio de la activación de una cascada proteolítica en donde la principal responsable es la enzima fenol oxidasa, y que involucra enzimas, moléculas señal y tipos celulares que pueden inhibir o activar la vía de la melanización (Kurz y Ewbank 2003; Siva-Jothy *et al.* 2001). Aunque para *C. elegans* no se ha reportado a la melanización como una vía involucrada en la respuesta inmune, se pueden encontrar genes que codifican para proteínas homólogas que actúan en esta vía en otros organismos. Las serpinas son uno de estos candidatos, ellas regulan de manera negativa la melanización en insectos y a su vez los niveles de serpinas se ven regulados por la vía Toll, que está involucrada en la respuesta inmune; se han encontrado en *C. elegans* 9 genes que codifican para serpinas, pero su función aún permanece incierta (González-Santoyo y Córdoba-Aguilar 2012; Kurz y Ewbank 2003). Además, se han encontrado varias proteínas homologas que actúan en la vía Toll en *C. elegans*, pero esta vía todavía no se encuentra completamente descrita (Irazoqui *et al.* 2010). Quizás podríamos pensar que los huecos que muestra esta vía en *C. elegans*, pueden involucrar proteínas que también tengan una función en el proceso de melanización, pero que la falta de estudios sobre la activación de la melanización como una respuesta inmune puede explicar este desconocimiento. Puede ser que las serpinas en *C. elegans* desempeñen una función en la melanización como respuesta a patógenos, pero que su papel en este proceso no se ha estudiado.

Al observar todas las características del nematodo que se tomaron en cuenta en este trabajo, podemos observar que estas características se alternan a lo largo del tiempo. De manera general el porcentaje de machos y la fertilidad es mayor en las

primeras generaciones, en especial en las generaciones 1 y 2, y las características que tiene que ver con el tamaño y la pigmentación aumentan principalmente al final del experimento, a partir de la generación 6. Este patrón se puede explicar por la alocaación diferencial de recursos que se da en los organismos, que tiene como premisa que cada una de estas características lleva consigo un costo energético, lo cual no permite la activación al mismo tiempo de todas las características o mecanismos fisiológicos de los organismos (Shulenburg *et al.* 2009; Lochmiller y Deerenberg 2000). Al principio, durante el primer contacto con la bacteria, los recursos se enfocaron principalmente en la reproducción, ya sea aumentando la fertilidad y viabilidad o incrementando el número de machos. Sin embargo, la continua exposición a la bacteria patógena pudo llevar al nematodo a encender otras vías que le podrían conferir una mayor protección contra la infección. Esto se vio reflejado de manera más importante a partir de la generación 6, con el incremento de las otras características de tamaño y pigmentación, y una disminución en la fertilidad y número de machos en los individuos tratados con *P. aeruginosa*. Como ya mencionamos anteriormente estas características fenotípicas de tamaño y pigmentación se relacionan fuertemente con la activación de vías de respuesta inmune que permite la liberación de moléculas efectoras que tiene como finalidad destruir al patógeno o disminuir sus efectos y que son energéticamente costosas (Miyata *et al.* 2008, Roberts *et al.* 2010; Sicard *et al.* 2007; Schulte *et al.* 2010).

VIII. CONCLUSIONES

El número de machos presentes en la población es mayor en los nematos expuestos a la bacteria patógena. El aumento del porcentaje de machos en la población nos indica de manera indirecta un posible incremento en la reproducción sexual en la población, lo que se puede establecer como un mecanismo de defensa más que el nematodo activa contra los patógenos, principalmente por la recombinación que se da durante este proceso.

La viabilidad de los huevos se ve afectada por la bacteria patógena, y se observa claramente en la disminución del porcentaje de eclosión de los mismos, el cual fue mayor en *P. aeruginosa* solamente en las dos primeras generaciones. A partir de la generación 3 no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos y la disminución del porcentaje de eclosión en los nematodos expuestos a *P. aeruginosa* posiblemente fue un efecto de la activación de las vías de respuesta inmune, en específico DAF-2.

Las características fenotípicas aumentan principalmente a partir de la generación 6 y parecen estar relacionadas a vías de señalización involucradas en la activación de la respuesta inmune, como por ejemplo TGF- β y la melanización, el papel de esta última en la defensa inmune no ha sido dilucidado en el nematodo.

Este trabajo muestra cómo cambian cada una de las características medidas a lo largo del tiempo, se encontró que alternan su activación debido principalmente a la alocaación de los recursos disponibles en el organismo. Este fue uno de los primeros acercamientos que trata de identificar cuáles son los cambios que los patógenos producen en sus hospederos y cuál es su dinámica en el mismo a lo largo de las generaciones.

IX. REFERENCIAS

- Alegado R. A., M. C. Campbell, W. C. Chen, S. S. Slutz y T. Man-Wah. 2003. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Celular microbiology* 5 (7): 435-444.
- Anderson, J. L., L. T. Morran y P. C. Phillips. 2010. Outcrossing and the maintenance of males within *C. elegans* populations. *Journal of Heredity* 101: S62-S74.
- Barrière, A. y M. Félix. 2005. High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Current biology* 15: 1176-1184.
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-94.
- Cerenius, L. y K. Söderhäll. 2004. The prophenoloxidasas-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* (198): 116-126.
- Darby, C. 2005. Interaction with microbial pathogens. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community
- Engelmann, I. y N. Pujol. 2010. Innate immunity in *C. elegans*. Pp. 105-121. *En: Invertebrate immunity*. (Kennetj Söderhäll). Landes Bioscience and Sprinder Science+Business Media. United States. 316 pp.
- Ewbank, J. J. 2002. Tackling both sides of the host-pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes and Infection* 4: 247-256.
- García, L. R., B. LeBoeuf y P. Koo. 2007. Diversity in mating behavior of hermaphroditic and male-female *Caenorhabditis* nematodes. *Genetics* 175: 1761-1771.
- Gonzáles-Santoyo I. y A. Córdoba-Aguilar. 2012. Phenoloxidasas: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 142: 1-16.

- Green, D. y C. Mason. 2013. The maintenance of sex: Ronald Fisher meets the Red Queen. *BMC Evolutionary Biology* 13:174.
- Hamilton, W. D., R. Axelrod y R. Tanese. 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (A Review). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3566-3573.
- Irazoqui, J. E., J. M. Urbach y F. M. Ausubel. 2010. Evolution of host innate defence: insights from *C. elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol.* 10(1): 47-58.
- Kurz, C. L. y J. J. Ewbank. 2000. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology* 3 (8): 142-144.
- Kurz, C. L. y J. J. Ewbank. 2003. *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nature* (4): 380-390.
- Lee, K. A. 2006. Linking immune defenses and life history at the levels of the individual and the species. *Integrative and Comparative Biology* 6(46): 1000-1015.
- Lochmiller, R. L. y C. Deerenberg. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity?. *Oikos* 88:87-98.
- Man-Wah, T. y F. M. Ausubel. 2000. *Caenorhabditis elegans*: as a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* 3:29-34.
- Marsh, E. K. y R. C. May. 2012. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Applied and Environmental Microbiology* 7 (78): 2075-2081.
- Millet, A. C. M. y J. J. Ewbank. 2004. Immunity en *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Immunology* 16: 4-9.
- Miyata, S., J. Begun, E. R. Troemel y F. M. Ausubel. 2008. DAF-16-Dependent suppression of immunity during reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 178: 903-918.
- Morran, L. T, B. J. Cappy, J. L. Anderson y P. C. Phillips. 2009. Sexual partners for the stressed: facultative outcrossing in the self-fertilizing nematode *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* 63: 1-9.

- Morran, L. T., O. G. Schmidt, I. A. Gelarden, R. C. Parrish II y C. M. Lively. 2011. Running with the Red Queen: Host-Parasite Coevolution Selects for Biparental Sex. *Science* 333: 216-218.
- Nicholas, H. R. y J. Hodgkin. 2004. Responses to infection and possible recognition strategies en the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular immunology* 41: 479-493.
- Parmenter, M. D., L. T. Morran y P. C. Phillips. 2009. Mutation load and rapid adaptation favour outcrossing over self-fertilization. *Nature* (462): 350-352.
- Prahlad, V., D. Pilgrim y E. B. Goodwin. 2003. Roles for mating and environment in *C. elegans* sex determination. *Science* 302: 1046-1049.
- Roberts, A. F., T. L. Gumienny, R. J. Gleason, H. Wang, R. W. Padgett. 2010. Regulation of genes affecting body size and innate immunity by the DBL-1/BMP-like pathway in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Developmental Biology* 10:61.
- Schulenburg, H., C. L. Kurz y J. J. Ewbank. 2004. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunological Reviews* 198: 36-58.
- Schulenburg, H., J. Kurtz, Y. Moret, M. T. Siva-Jothy. 2009. Introduction. *Ecological immunology*. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364: 3-14.
- Schulte, R. D., C. Makus, B. Hasert, N. K. Michiels y H. Schulenburg. 2010. Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasites. *PNAS* 16(107): 7359-7364.
- Sicard, M., S. Hering, R. Schulte, S. Gaudriault y H. Schulenburg. 2007. The effect of *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae) on the survival, development, reproduction and behavior of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: Rhabditidae). *Environmental Microbiology* 9(1): 12-25.
- Sifri, C. D., J. Begun y F. M. Ausubel. 2005. The worm has turned-microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Microbiology* 3 (13): 119-127.

- Siva-Jothy, M. T, Y. Tsubaki, R. E. Hooper y S. J. Plaistow. 2001. Investment in immune function under chronic and acute immune challenge in an insect. *Physiological Entomology* 26: 1-5.
- Stiernagle, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community
- Zuk, M. y A. M. Stoehr. 2002. Immune defense and host life history. *Am. Nat.* 160: S9-S22.