



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**COMPORTAMIENTO DE EXCAVACIÓN EN LA CEPA MUTANTE *sad-1* DE
*Caenorhabditis elegans***

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciada en Biología

Presenta:

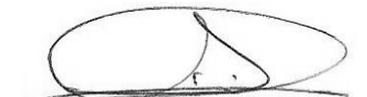
María Araceli López Puebla

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

SINODALES

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Presidente


Firma

Dra. Marco Antonio Sánchez Ramos
Secretario


Firma

Dr. Angelina Rodríguez Torres
Vocal


Firma

Dr. Carlos Saldaña Gutiérrez
Suplente


Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Fecha
México

Resumen

El comportamiento de excavación se presenta en numerosas especies animales. Se trata de una estrategia de escape y protección hacia factores adversos, sean estos bióticos o abióticos. En el nemátodo *Caenorhabditis elegans* este comportamiento no ha sido estudiado aun, pues sólo algunos autores lo mencionan como una característica no deseada en la metodología de varios estudios. En la presente investigación se estableció un método de estudio para entender cómo se lleva a cabo la excavación usando como modelo la cepa mutante del gen *sad-1* mediante el desarrollo de un bionensayo consistente en la transferencia de diez nemátodos en una placa con agar perforada. Tras contar después de dos horas los nemátodos que penetraron en el agar se demostró que la mutante *sad-1* tiende a excavar en mayor medida comparada con la cepa silvestre N2 y otras cepas mutantes como *npr-1*, *daf-7* y *gcy-35*; además con la ayuda de una genotipificación se sugiere que el comportamiento de excavación pueda estar regulado por varios genes, y por lo tanto por diferentes vías de señalización. Se cree que dicho comportamiento pueda estar ligado a la evasión de ambientes hiperóxicos que dañen el sistema nervioso del nemátodo, principalmente aquellas neuronas sensoriales e interneuronas como las AQR, PQR y URX, mediante la acción de las EROs.

(Palabras clave: excavación, *sad-1*, *C. elegans*, EROs)

Burrowing behavior in mutant strain *sad-1* of *Caenorhabditis elegans*

Abstract

The burrowing behavior is present in many animal species. It is an escape and protection strategy against adverse biotic and abiotic factors. In the nematode *Caenorhabditis elegans* this behavior has not been studied, and only has been reported as an unwanted feature on other assays. This investigation established a study method for understanding burrowing behavior, with the use of the mutant strain *sad-1*, through the development of bioassays transferring ten nematodes into perforated agar plate. At two hours later is counted the number of burrowing nematodes and I found that the *sad-1* mutant burrows more than the wild-type strain N2 and other mutant strains like *npr-1*, *daf-7* and *gcy-35*; besides through genotypification the burrowing behavior seems to be regulated by several genes, and therefore by different signaling ways. This behavior could be due to the avoidance of hiperoxic environments that could injure the nervous system of the nematode, mainly sensory and interneurons like as AQR, PQR and URX by the ROS action.

(Key words: burrowing, *sad-1*, *C. elegans*, ROS)

A mis padres

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas involucradas en la realización de este trabajo, ya sea directa o indirectamente:

A mis padres, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A todos los compañeros de laboratorio, especialmente a Denia que desde un principio me dio la bienvenida y me ayudo en la medida de sus posibilidades. A Chuy, Eunice, Ceci, Zyania y Luis, quienes me ayudaron a manejar el equipo de laboratorio.

A mis amigos, por todo el apoyo, consejos y ayuda que me brindaron. A Jimena por estar siempre al pendiente de mí, dándome las fuerzas para seguir. A Fani por ayudarme y tenerme paciencia en estadística. A Erick por acompañarme al laboratorio en vacaciones.

A Karina, por darme la idea de la metodología usada en el estudio.

A mis asesores Talina y Marco, por ser sinceros conmigo y unas magnificas personas.

A Fausto, por tener confianza en mí y alentarme a seguir adelante. Por aceptarme en el laboratorio y trabajar conmigo.

Índice

1. Introducción	9
2. Antecedentes	10
2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
2.2 Cepa mutante CX5156 <i>sad-1</i>	10
2.3 Comportamiento de excavación	11
2.4 Especies reactivas de oxígeno (EROs)	13
2.5 Sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	16
5. Metodología	16
5.1 Cepas	16
5.1.1 Cepa silvestre N2 (Bristol) y cepa AX204 <i>npr-1(ad604)</i>	16
5.1.2 Cepa CB1372 <i>daf-7</i>	17
5.1.3 Cepa AX1295 <i>gcy-35</i>	17
5.1.4 Cepa Cepa CX5156 <i>sad-1</i>	18
5.2 Análisis estadístico	18
5.3 Ensayos de comportamiento	18
5.4 Desarrollo de oligonucleótido y doble mutante. PCR	19
6. Resultados	20
6.1 Establecimiento de bioensayos de comportamiento	20
6.2 Bioensayos de comportamiento	24
7. Discusión	27

7.1 Establecimiento de bioensayos de comportamiento de excavación	27
7.2 Bioensayos de comportamiento	27
7.3 Breve descripción de comportamiento	28
7.4 PCR, electroforesis y bioensayo de comportamiento con la doble mutante <i>gcy-35; sad-1</i>	28
8. Conclusión	29
9. Referencias	29

Índice de figuras

Fig. 1 Ubicación anatómica de la neurona AQR en nemátodos	14
Fig. 2 Ubicación anatómica de la neurona PQR en nemátodos	15
Fig. 3 Ubicación anatómica de las neuronas URX en nemátodos	15
Fig. 4 Placas de Petri para los bioensayos	19
Fig. 5 Diagrama de las cruzas con <i>sad-1</i> y <i>gcy-35</i>	20
Fig. 6 Porcentaje de nemátodos que excavaron el agar	21
Fig. 7 Porcentaje de nemátodos que excavaron el agar	22
Fig. 8 Placas de Petri de 3.5 cm de diámetro con y sin orificios	23
Fig. 9 Resultados de los bioensayos	24
Fig. 10 Genotipificación mediante PCR	25
Fig. 11 Resultados de comportamiento de la doble mutante <i>gcy-35; sad-1</i>	26

1. Introducción

La homeostasis permite a los seres vivos llevar a cabo sus funciones vitales y acoplarse al medio en el que habitan. De esta manera, cuando los niveles de ciertas sustancias o moléculas internas están por debajo o por encima de lo normal los sistemas de regulación se activan para mantener el cuerpo en condiciones óptimas, de lo contrario el organismo puede sufrir daños. Estos sistemas de regulación no sólo ocurren a nivel fisiológico, sino que también puede darse de manera conductual. Un ejemplo de ello es el comportamiento de excavación. Diversas especies animales emplean la excavación para escapar de factores adversos, sean éstos bióticos o abióticos (Hansel, 2005).

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un buen modelo para el estudio en las áreas biológicas y biomédicas. Gracias a su fácil mantenimiento en condiciones de laboratorio, un ciclo de vida bien definido y un amplio conocimiento sobre su biología lo hacen una especie propicia para la investigación (Brenner, 2002). En cuanto al comportamiento de excavación, en *Caenorhabditis elegans* no ha sido descrito a detalle ni estudiado hasta la fecha. En 1986 Randy Cassada lo describe como una consecuencia de la gran acumulación de nemátodos de distintas edades sobre una capa delgada de agar, donde tienden a permanecer bajo la superficie (Cassada, 1986). Por otro lado Rogers *et al.*, en 2006 mencionan este comportamiento como un mecanismo para evitar las altas concentraciones de oxígeno de la superficie y una relación con las variaciones de forrajeo, que está ligado a rutas de señalización reguladas por GMP cíclico (GMPc) en las neuronas sensoriales AQR, PQR y URX (Rogers *et al.*, 2006). En nemátodos el género *Radopholus* presenta ciertas especies parásitas que crean galerías en sus hospederos vegetales, pero no se tiene algún nexo con el género *Caenorhabditis*, ya que éste es de vida libre.

En este trabajo se desarrolló un bioensayo que permite medir el comportamiento de excavación en *C. elegans* y mediante análisis genético se logró proponer genes candidatos como posibles reguladores de las vías de acción. De manera particular se reportó dicho comportamiento en la cepa mutante *sad-1* en

contraste con la cepa silvestre N2, con la hipótesis de que *sad-1* tiende a encriptarse dentro del agar en mayor número que N2.

2. Antecedentes

2.1 *Caenorhabditis elegans*

Este pequeño nemátodo no segmentado alcanza hasta 1mm de longitud, es de vida libre y se alimenta principalmente de bacterias. Su cuerpo es translucido, tiene un ciclo de vida corto, un desarrollo estereotipado y por su fácil propagación hacen de él un buen modelo biológico para la investigación, especialmente en los campos de biología celular, genética y neurociencia (Brenner, 1973). En vida silvestre se diferencian dos sexos: hermafroditas (XX) que se autofecundan y machos (XO), los cuales se encuentran en bajas proporciones (0.1%). Su cuerpo está formado por dos tubos, uno interno y otro externo, ambos separados por un espacio pseudocelómico. El tubo externo está conformado por una cutícula, hipodermis, un sistema excretor, neuronas y músculos, mientras que el interno está formado por la faringe, el intestino y las gónadas. Los tejidos están regulados gracias a un sistema osmótico. Cuenta con seis pares de cromosomas, del I al V y un cromosoma sexual (Brenner, 1974).

2.2 Cepa mutante CX5156 *sad-1*

La cepa CX5156 es una mutante con una sustitución del alelo *ky289* del gen *sad-1* en el cromosoma sexual X. La quinasa de la sinapsis del amfid (especializaciones quimiosensoriales ubicadas en la cabeza a lo largo de la cutícula anterior) defectuoso (SAD-1), pertenece a la subfamilia de las quinasas relacionadas a la proteinquinasa activada por AMP (AMPK) (Lizcano *et al.* 2004). Su expresión se lleva a cabo a nivel del sistema nervioso, donde se encarga de la polaridad neuronal (Kim *et al.*, 2010^a), así como de la generación de la sinapsis y su regulación en neuronas maduras (Crump *et al.*, 2001). Además, es necesaria para el desarrollo presináptico que involucra el crecimiento axonal y el *cluster* de vesículas presinápticas en motoneuronas y neuronas quimiosensoriales (Kim *et al.*, 2010^b).

SAD-1 está evolutivamente conservada, y se sabe que en mamíferos es regulada por la quinasa hepática B1 (LBK 1). En *C. elegans*, fue el primer regulador de la polaridad neuronal que se identificó *in vivo* (Crump *et al.*, 2001) y es regulada por PAR-4. El gen *sad-1*, localizado en el cromosoma X, presenta dos isoformas: una corta y una larga, con funciones totalmente diferenciadas. La isoforma larga se encarga de regular la polaridad neuronal y la corta de la organización sináptica, ambas mediante la interacción con una pseudoquinasa STRD-1. Esta última isoforma se encuentra de manera difusa dentro del cuerpo neural, mientras que la larga se ubica en *clusters* a lo largo de los axones (Kim *et al.*, 2010^a). La proteína codificada por el gen *sad-1* es una proteinquinasa serin-treonina que localiza las regiones ricas en sinapsis dentro del axón (Crump *et al.*, 2001).

Está documentado que mutantes *sad-1* de *C. elegans* presentan defectos en el desarrollo presináptico de las neuronas quimiosensoriales ASI y motoneuronas (Kim *et al.*, 2010^a). Las neuronas ASI están asociadas en la formación de larvas dauer, la quimiotaxis y la navegación (Bargmann y Horvitz, 1991).

2.3 Comportamiento de excavación

Para dar una introducción evolutiva del comportamiento de excavación en 2013 Chin y colaboradores publicaron sobre el descubrimiento de galerías fósiles en Dakota del Norte, Estados Unidos, que pertenecen a gusanos terrestres que sobrevivieron a la gran extinción a finales del Cretácico. Este descubrimiento da las bases para entender la supervivencia de las especies terrestres después de la gran catástrofe del Cretácico-Paleógeno (K/Pg). La identificación de la especie que creó dichas galerías se hizo con base en la observación del tamaño y la estructura simple de los corredores, además de la comparación con formaciones hechas por anélidos actuales. De esta manera se llegó a la hipótesis de que en ese tiempo existía una gran población de anélidos detritívoros o saprófagos que vivían en galerías y, además, eran capaces de tolerar condiciones adversas tales como baja concentración de oxígeno, infiltraciones de agua constante, bajo pH y toxinas bióticas y abióticas. Es posible que el sedimento clástico ayudara a mitigar estos factores, permitiendo su colonización en hábitats en constante cambio. Hoy estas zonas son de areniscas y lograron

conservarse gracias a la gran actividad volcánica. De esta manera, los gusanos constituyeron una fuente de nutrientes para los productores primarios, asegurando la supervivencia de mamíferos carnívoros, aves y otros vertebrados en el Cenozoico temprano (Chin *et al.*, 2013). Estos resultados nos revelan que el comportamiento de excavación está presente desde hace aproximadamente 145 millones de años de manera visible.

El comportamiento de excavación ha sido estudiado principalmente en mamíferos, pero también está presente en otros vertebrados, artrópodos y moluscos (Hazelton *et al.*, 2014). Los animales pueden fabricar sus propias madrigueras al utilizar materiales vegetales a su alcance, remover sustratos o utilizar fisuras o grietas en rocas o troncos. La capacidad de diseño es muy variada, las hay desde sencillas hasta bastante complejas como las que se observan en hormigueros y termiteros. Si bien una galería representa un refugio contra factores ambientales y depredadores, albergue o un almacén de alimento, también representa un gasto y algunas desventajas. Dentro del costo energético, excavar no requiere de tanto gasto metabólico en comparación con otras tareas fisiológicas. Por ejemplo, los armadillos cavan sus madrigueras durante la noche (Taber, 1945), para evitar la exposición solar y pérdida de líquidos. A pesar de esto, deben cavar cada noche. Una desventaja está relacionada con la depredación: muchos roedores construyen sus madrigueras como sistemas cerrados, con una única entrada. Esto puede facilitar la caza a los depredadores como las serpientes, ya que al carecer de salidas los roedores se ven acorralados (King, 1955).

Un estudio en la almeja báltica *Macoma balthica* reveló que el comportamiento de excavación de esta especie está ligado a la hipoxia y la cantidad de algas en la costa del Mar Báltico. En dicho estudio, se observó que las áreas costeras tienen problemas de hipoxia debido a la eutroficación, principalmente por algas. De esta manera, cuando la población de algas aumenta, las almejas excavan más sobre la arena para alejarse de la deficiencia de oxígeno. Si la hipoxia se presenta de manera prolongada puede causar muerte faunística, pero si es de manera periódica, las almejas tienen la capacidad de entrar y salir de la arena (Tallqvist, 2001). La

importancia en el cambio de comportamiento de estos bivalvos recae en que son presas clave en el ecosistema, por lo que la relación presa-depredador se ve afectada.

Bargmann en 2006 estimó la excavación en *C. elegans* como un mecanismo para evitar ambientes hiperóxicos que dañen los axones de neuronas sensoriales (Bargmann, 2006). En la naturaleza, los suelos tienen actividad bacteriana, por lo que hay fluctuaciones en las concentraciones de gases como el oxígeno y el dióxido de carbono (Sylvia *et al.*, 1998). *C. elegans* aunque es un organismo aeróbico prefiere ambientes con niveles intermedios de oxígeno molecular, por lo que evita los bajos niveles (<4%) y los altos (>12%) (Gray *et al.*, 2004), siendo estos últimos los que pueden dañar el ADN y otras macromoléculas (Bargmann, 2006).

2.4 Especies reactivas de oxígeno (EROs)

La toxicidad del oxígeno se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) que son más reactivas que el propio oxígeno en estado basal. Las principales EROs son aquellos productos de la ruptura o la excitación del dióxido de oxígeno (O_2) como el oxígeno atómico (O), el ozono (O_3) y el oxígeno en singulete (1O_2); y las especies de oxígeno parcialmente reducidas como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^\cdot) (Torres, 2002). Las EROs que se producen en estado fisiológico constituyen un daño constante al ADN, a las proteínas y a los lípidos (Lledías y Hansberg, 2000). En el ADN ocurre, a una tasa baja pero continua, la pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timidina y la ruptura de una o las dos hebras del ADN (Marnett y Plastaras 2001).

Algunas enzimas pueden inactivarse o activarse con el O_2^- y el H_2O_2 cuando interaccionan con metioninas o cisteínas susceptibles. Estas reacciones son reversibles. A pesar de esto, el daño que causan las EROs es contrarrestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación.

Las EROs también pueden producirse por metabolismo mitocondrial en condiciones de hipoxia (Jensen y Culotta, 2005). El factor inducible a la hipoxia 1 o HIF-1 es un factor de transcripción filogenéticamente conservado que regula genes para

facilitar el incremento del metabolismo anaerobio en células y el aumento de vascularización en tejidos, ambos bajo condiciones de hipoxia (Ratcliffe *et al.*, 2000). En *C. elegans* se ha observado que en hipoxia los axones de neuronas motoras e interneuronas sufren daños al cruzarse en la línea media durante el desarrollo larval y embrionario, lo que afecta la neurogénesis, pero estos efectos son específicos a tipos neuronales. (Pocock y Hobert, 2008).

2.5 Sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso de *C. elegans* está formado por motoneuronas, neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas polimodales, que en conjunto suman 302 células en organismos hermafroditas (Albertson y Thomson, 1976). La mayoría de las neuronas son simples en forma y organización (Hall *et al.*, 2006). Existen diversas clases de neuronas sensoriales, muchas están asociadas a procesos dendríticos que regulan los estímulos a nivel de la cutícula, como la presión, y los estímulos químicos (Bargmann, 1993). Otras actúan como receptores de estímulos ambientales tales como los cambios en los niveles de oxígeno, como las neuronas AQR, PQR y URX (Gray *et al.*, 2004). La neurona AQR está situada en la cabeza del nemátodo, cerca del bulbo faringeal (Fig. 1) y es de tipo glutamatérgica. Junto con su dendrita ciliada está expuesta de manera directa al fluido corporal pseudocelómico. Además de la aerotaxis, también regula la alimentación social y el forrajeo.

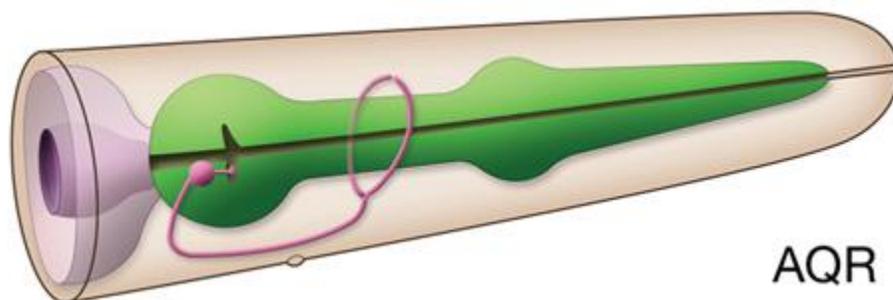


Fig. 1. Ubicación anatómica de la neurona AQR marcada en rosa en nemátodos. Imagen tomada de WORMATLAS 2015.

La neurona PQR se localiza a la izquierda del ganglio lumbar (Fig. 2) y al igual que la neurona anterior, se encuentra expuesta al fluido corporal pseudocelómico y es

glutamatérgica. Parte del circuito neural es importante para la búsqueda de pareja en los machos (Barrios *et al.*, 2012).

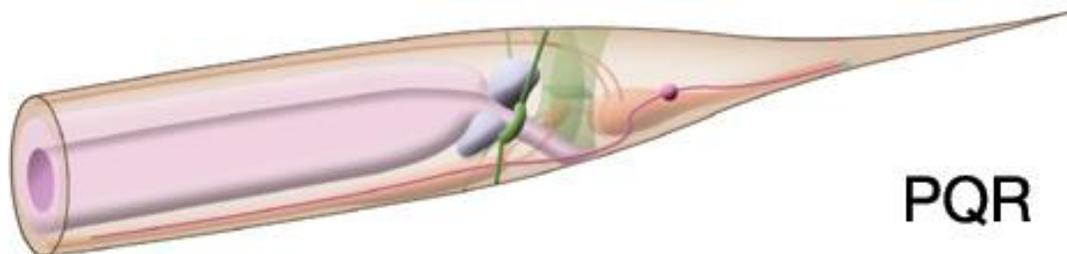


Fig. 2. Ubicación anatómica de la neurona PQR marcada en rosa en nemátodos. Imagen tomada de Wormatlas 2015.

Las neuronas URX además de ser sensoriales también forman parte de las interneuronas. Son no ciliadas y se ubican en la cabeza del nemátodo, hasta el término de la nariz (Fig. 3), una a cada lado (derecha-izquierda). Además de la aerotaxis, regulan el tiempo de vida junto con las neuronas BAG (Liu y Cai, 2013). Su neurotransmisor es el péptido similar a FMRFamida (FLP).

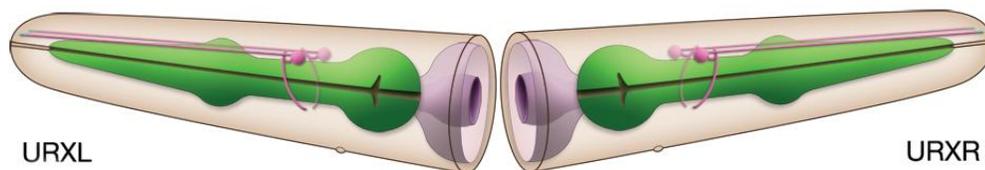


Fig. 3. Ubicación anatómica de las neuronas URX marcadas en rosa en nemátodos. Imagen tomada de Wormatlas 2015

3. Hipótesis

Debido a la mutación que presenta la cepa CX5156 *sad-1* de *C. elegans*, el comportamiento de excavación se presenta con mayor tendencia en comparación con la cepa silvestre N2.

4. Objetivos

Objetivos generales

- Reportar el comportamiento de excavación en la mutante *sad-1* de *Caenorhabditis elegans*.

Objetivos específicos

- Desarrollar un bioensayo que permita medir la capacidad de excavación en *Caenorhabditis elegans*.
- Valorar el gen *sad-1* como gen candidato para regular la conducta de excavación en *Caenorhabditis elegans*.

5. Metodología

Se diseñó un plan de trabajo adecuado para evaluar el comportamiento de excavación en *C. elegans* utilizando diferentes cepas de nemátodos. Se procuró en lo posible mantener estables la mayoría de los factores que pudieran hacer variar los resultados de las pruebas, ya sean propios de los nemátodos como ambientales.

5.1 Cepas

Las cepas utilizadas en este estudio fueron:

5.1.1 Cepa silvestre N2 (Bristol) y cepa AX204 *npr-1(ad604)*

La cepa N2 de *C. elegans* es considerada una cepa silvestre. Fue aislada en 1956 por L.N. Staniland de un jardín urbano ubicado en Bristol, Gran Bretaña (Nicholas *et al.*, 1959), pero no fue hasta la década de los 70s cuando Sydney Brenner la referenció como cepa silvestre de laboratorio (Weber *et al.*, 2010). Esta cepa se caracteriza por sus estudios de comportamiento solitario al momento de alimentarse. Esta cepa se dispersa a lo largo de la placa bacteriana y evita la agregación, además de presentar una actividad locomotora reducida. Por otro lado, la cepa AX204

tiene un comportamiento social, formando aglomeraciones de nemátodos sobre la capa bacteriana, llamadas clumps. Estas diferencias están establecidas como isoformas del neuropéptido NPR-1; la isoforma NPR-1 215F tiene un residuo de fenilalanina en el sitio 215 del gen *npr-1* y hace al nemátodo social. La isoforma NPR-1 215V tiene valina en el mismo sitio pero los nemátodos con este cambio son solitarios. Se sugiere que la agregación en *C. elegans* es una respuesta de defensa a las toxinas generadas por la propia bacteria, las cuales son captadas por las neuronas nociceptivas ASH y ADL. (de Bono y Bargmann, 1998). Para este estudio, la cepa N2 es considerada como el control negativo, debido a su naturaleza silvestre (de Bono y Bargmann, 1998).

5.1.2 Cepa CB1372 *daf-7*

Mutante con una sustitución del alelo *e1372* del gen *daf-7* en el cromosoma III. El gen *daf-7* codifica para un tipo de factor de crecimiento transformante β (TGF- β). El TGF- β es un importante regulador de la proliferación, migración y apoptosis celular durante el estado embrionario y aun en adultos (Sporn, 1999). Específicamente en *C. elegans* la proteína DAF-7 es parte de la señalización para medir las condiciones ambientales que intervienen en la formación de las larvas dauer (Vowels y Thomas, 1992), el metabolismo de las grasas, la puesta de huevos (Trent *et al.*, 1983) y la alimentación social. DAF-7 sólo se expresa en las neuronas sensoriales ASI (Ren *et al.*, 1996; Schachwitz *et al.*, 1996).

5.1.3 Cepa AX1295 *gcy-35*

Esta cepa es una mutante con una delección en el alelo *ok769* del gen *gcy-35*, ubicado en el cromosoma I. Este gen codifica una guanilil ciclasa soluble, y su expresión es necesaria para regular la agregación (Cheung *et al.*, 2004), la inmunidad innata, la plasticidad gustativa (Hukema *et al.*, 2006), la aerotaxis y la aeroquinesis. Tiene un papel importante en

las neuronas sensoriales URX para detectar el incremento de los niveles de oxígeno en el medio y su correspondiente cambio de conducta (Gray *et al.*, 2004).

5.1.4 Cepa CX5156 *sad-1*.

La descripción de la cepa está de manera textual en el apartado de los antecedentes. Cabe recordar que el gen *sad-1* es importante en la polaridad neuronal (Kim *et al.*, 2010a) y la regulación de la sinapsis en neuronas maduras (Crump *et al.*, 2001).

Las cepas fueron mantenidas a 18°C en medio de crecimiento para nemátodos (NGM) y alimentadas con *E. coli* OP50 de acuerdo a lo citado por Brenner en 1974.

5.2 Análisis estadístico

Los ensayos de comportamiento fueron analizados con el programa R 2.12.2 elaborado por R Core Team en Viena, Austria en 2013 para obtener la normalidad, pruebas de poder y prueba de Shapiro-Wilk. Además para cada prueba se obtuvo el porcentaje, desviación estándar y error estándar. Para corroborar los datos se hizo una prueba de T y se obtuvo el valor de p para cada bioensayo.

5.3 Ensayos de comportamiento

Para poder establecer un ensayo propicio para el estudio se utilizaron diferentes variables de acuerdo con la técnica usada. De manera general, los ensayos de comportamiento consistieron en la transferencia de 10 a 20 gusanos adultos a placas de Petri de 3.5cm de diámetro sin alimento. Se manejaron placas con 0, 4 y 8 orificios (Fig. 4), las cuales se realizaron por punción con puntas para micropipeta de 0.5 a 10µl equidistantes entre sí. Cada gusano fue colocado en el centro de la placa y se prosiguió a realizar el conteo de los gusanos que permanecieron en la superficie

después de una a dos horas. Posteriormente el agar es desechado y las placas son lavadas y reutilizadas para nuevos ensayos.

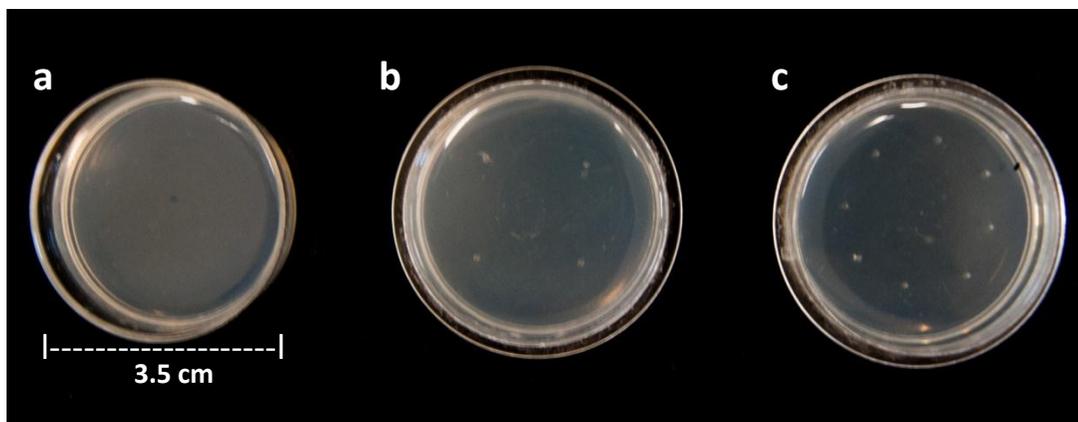


Fig. 4 Placas de Petri para los bioensayos con a) 0, b) 4 y c) 8 orificios

5.4 Desarrollo de oligonucleótido y doble mutante. PCR

Se generó un oligonucleótido para la cepa AX1295 *gcy-35 ok769* (antisentido). Para las dobles mutantes se cruzaron machos *gcy-35* con hermafroditas vírgenes *sad-1*. Los machos de la generación F1 se cruzaron nuevamente con hermafroditas vírgenes *sad-1* y se separaron individualmente gusanos vírgenes a placas nuevas hasta la generación F4 en aproximadamente 16 días (Fig. 5). A partir de esta generación se extrajo el ADN mediante el uso de SWELB (Fay, 2013) y se realizó un PCR de 35 ciclos a 62°C para la alineación y una electroforesis en gel de agarosa al 1% con un marcador molecular de 1 KB Plus ADN Ladder de Life Technologies para verificar la presencia de nemátodos con ambas mutaciones (*sad-1* y *gcy-35*) (Fig. 5). Los oligonucleótidos utilizados son:

- *gcy-35 ok769*

agtactccttaaaggcgcac

gaaggctaaccacgcatg (R)

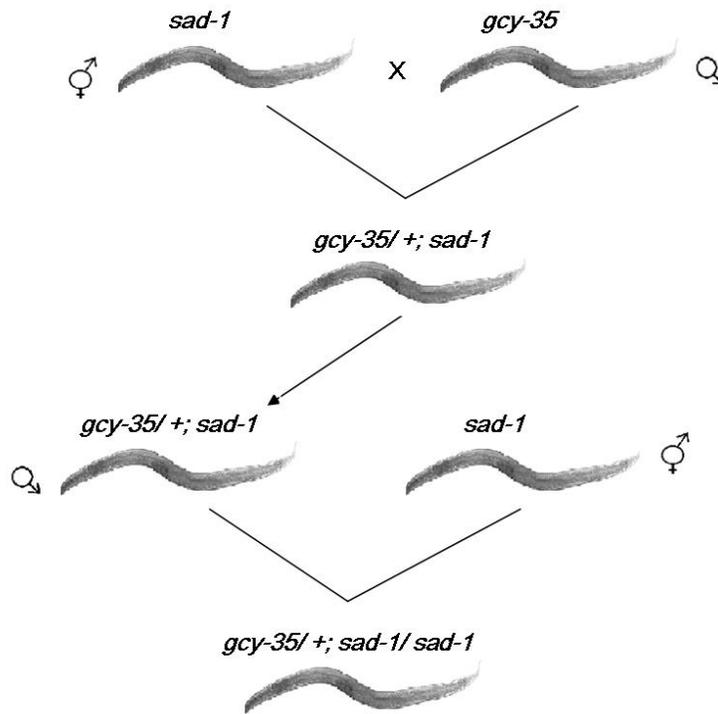


Fig. 5. Diagrama de las cruces con *sad-1* y *gcy-35*. Para obtener la doble mutante se cruzaron hermafroditas vírgenes *sad-1* con machos *gcy-35*; posteriormente se utilizaron machos *gcy-35/+; sad-1* y se cruzaron con hermafroditas vírgenes *sad-1*. Los gusanos obtenidos de esta cruce se mantuvieron hasta la generación F4 para la extracción de ADN.

6. Resultados

6.1 Establecimiento del bioensayo de comportamiento.

Para el desarrollo del bioensayo adecuado para medir el comportamiento de excavación en *C. elegans* se realizaron diversas pruebas cambiando las variables una a la vez, como el tiempo, la cantidad de gusanos, la cantidad de orificios y el tamaño de la placa. Estas pruebas se realizaron únicamente con las cepas N2 y *sad-1*. Los resultados fueron graficados mediante el uso del porcentaje de los animales que excavan el agar. La primera prueba consistió en ensayos hechos en placas de Petri de 6cm de diámetro con 10 gusanos en cada una. Se usaron placas sin perforar y con 4 orificios; contando cada hora durante dos horas (Fig. 6).

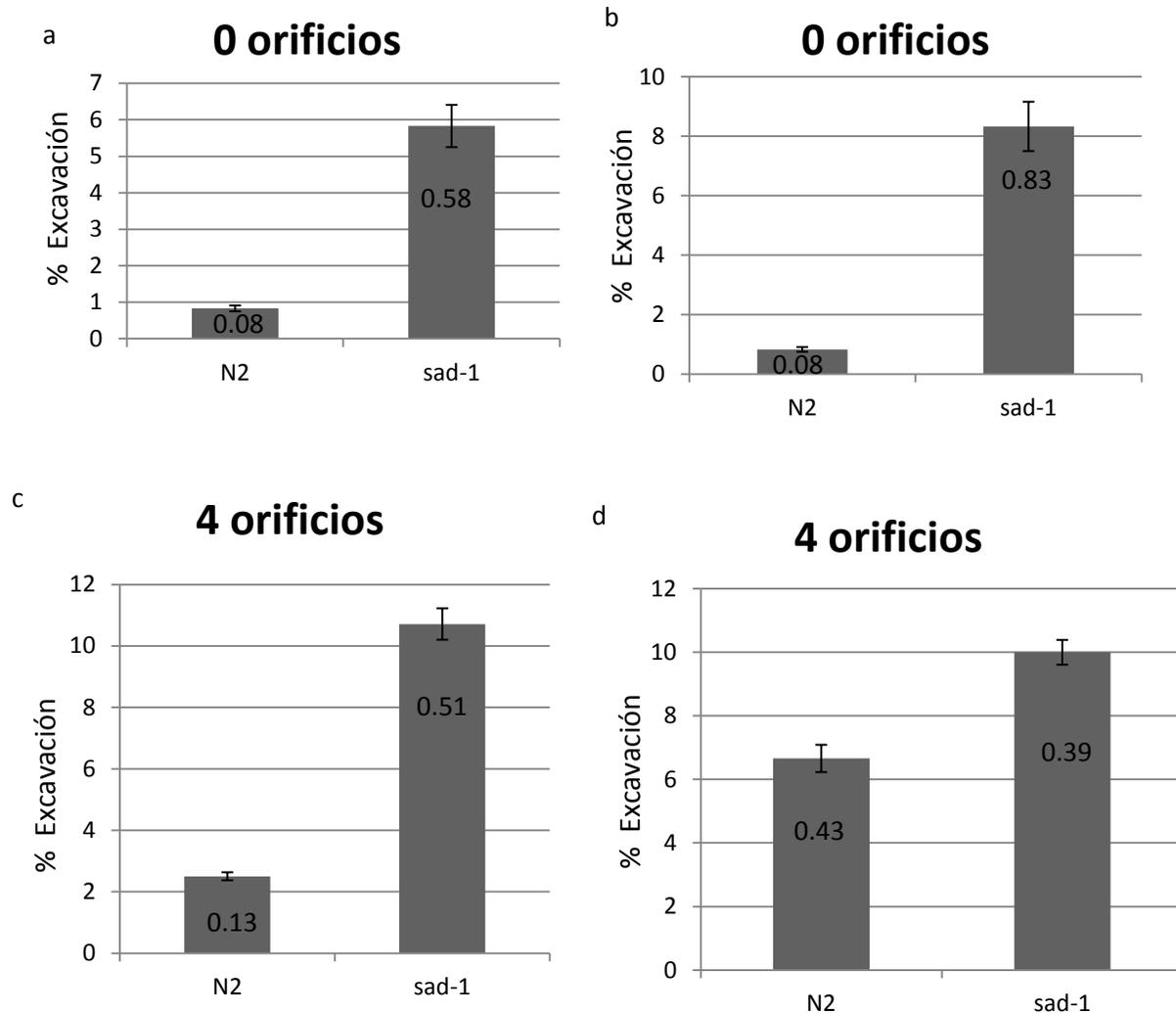


Fig. 6 Porcentaje de nemátodos que excavaron el agar. Se muestran las barras de error para cada cepa y su valor dentro de la gráfica. a) Sin orificios después de una hora. $n=12$, $SD= \pm 0.28$ y ± 2.02 respectivamente. b) Sin orificios después de dos horas. $n=12$, $SD= \pm 0.28$ y ± 2.88 respectivamente. c) Con cuatro orificios después de una hora. $n=14$, $SD= \pm 0.45$ y ± 1.94 respectivamente. d) Con cuatro orificios después de dos horas. $n=14$, $SD= \pm 1.49$ y ± 1.46 respectivamente. Los valores de p para estas pruebas fueron mayores a 0.05.

Para la segunda prueba se cambió el tamaño de las placas de Petri a 3.5cm diámetro y se aumento el número de orificios a ocho (Fig. 7).

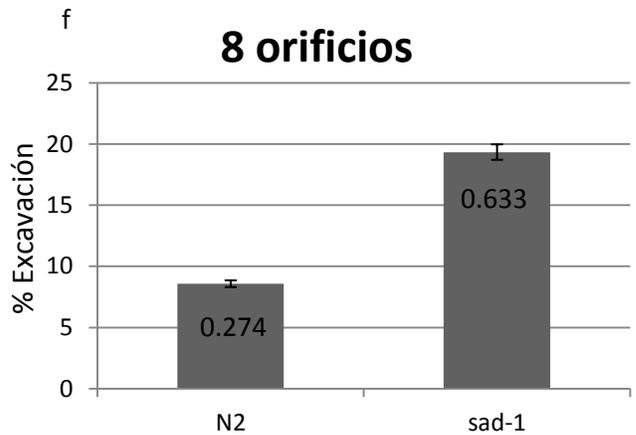
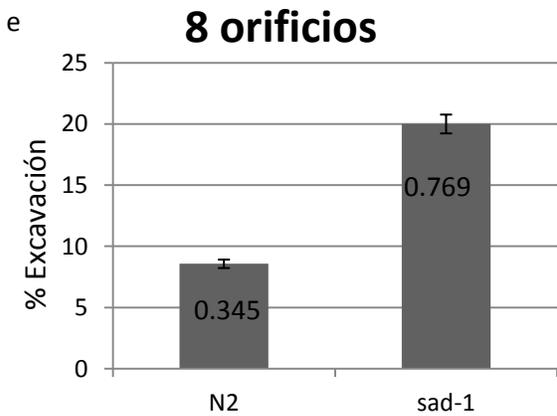
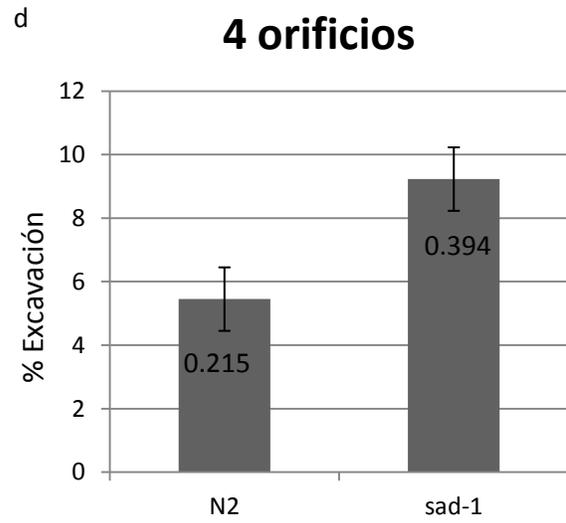
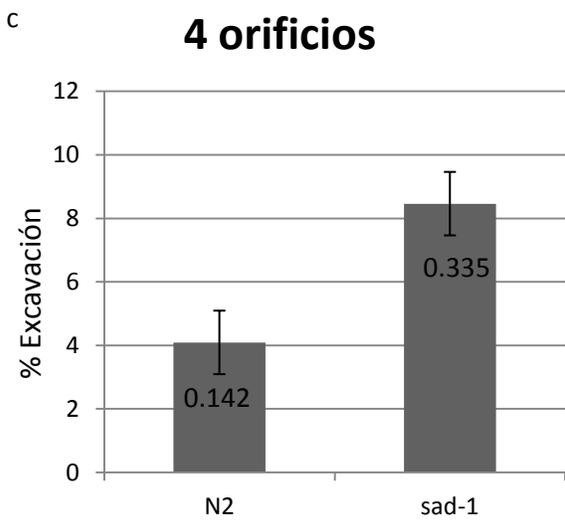
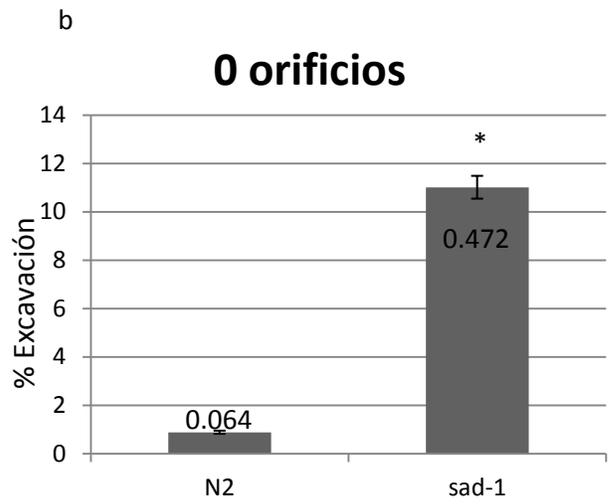
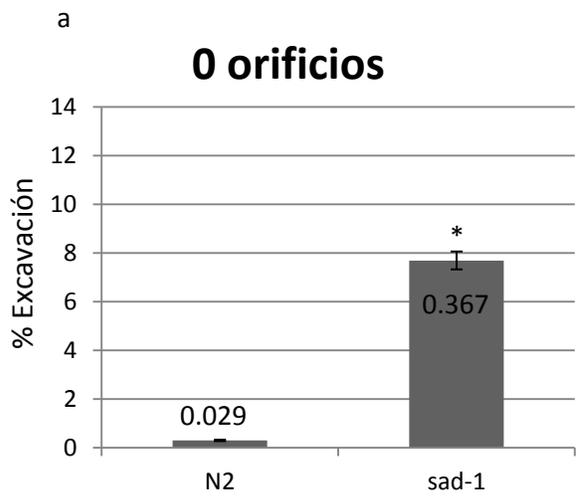


Fig. 7 Porcentaje de nemátodos que excavaron el agar. Se muestran las barras de error para cada cepa y su valor dentro de la gráfica. a) Sin orificios después de una hora. $n=34$, $SD= \pm 0.17$ y ± 2.14 respectivamente. b) Sin orificios después de dos horas. $n=34$, $SD= \pm 0.37$ y ± 2.75 respectivamente. c) Con cuatro orificios después de una hora. $n=34$, $SD= \pm 0.66$ y ± 1.57 . d) Con cuatro orificios después de dos horas. $n=34$, $SD= \pm 1.01$ y ± 1.84 . e) Con ocho orificios después de una hora. $n=34$, $SD= \pm 1.29$ y ± 2.87 . f) Con ocho orificios después de dos horas. $n=34$, $SD= \pm 1.02$ y ± 2.36 . Valor de $p \leq 0.05$.

También se realizaron pruebas en placas de 3.5cm con cero, cuatro y ocho orificios contando cada una, dos y tres horas colocando 20 gusanos por placa. Los resultados obtenidos no fueron significativos; se observó que el número de nemátodos dentro del agar es proporcional al incrementar el número de nemátodos por placa. Por otra parte, al contar después de dos horas no se encontraron diferencias en el comportamiento.

A partir de estas pruebas se determinó que los bioensayos se harían colocando diez nemátodos en placas de Petri de 3.5cm con cero y ocho orificios (Fig. 8). Esto debido a que el número de excavaciones es proporcional al incremento de población y al fácil manejo de una menor cantidad de nematodos por placa. Se observó que en placas más grandes los nemátodos se dispersan y los valores en el porcentaje de excavación no son significativos. En cuanto a la cantidad de orificios sobre la superficie del agar se decidió omitir cuatro, sustituyendo por ocho para incrementar la posibilidad de encontrar una fractura en el agar y que los nemátodos pudieran penetrarlo.

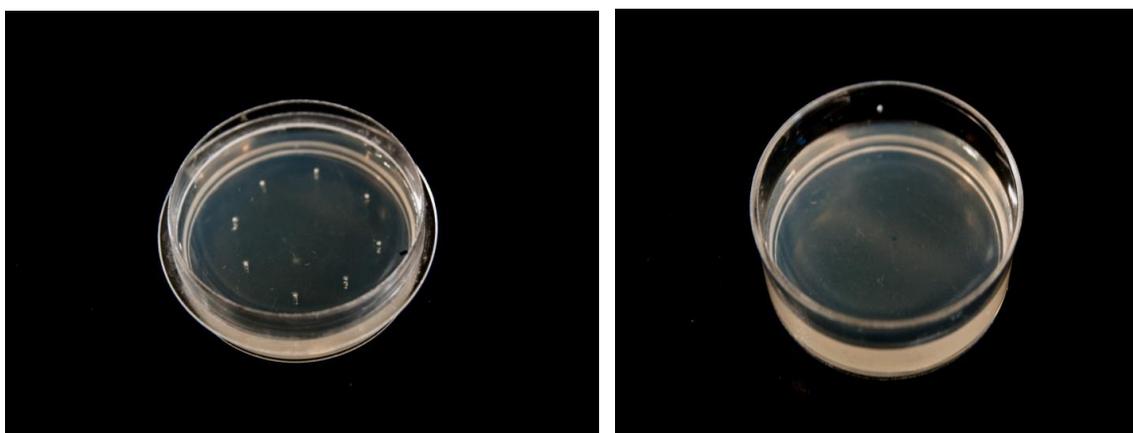


Fig. 8 Placas de Petri de 3.5 cm de diámetro con y sin orificios para realizar los bioensayos de comportamiento de *C. elegans*

6.2 Bioensayos de comportamiento

Una vez establecida la metodología se prosiguió a realizar los bioensayos de comportamiento para *C. elegans*. Lo primero fue observar el comportamiento de excavación para las cepas N2, *npr-1*, *daf-7* y *sad-1*. De esta manera se compararon los resultados entre sí, tomando como base N2. La figura 9 muestra los resultados obtenidos para los bioensayos.

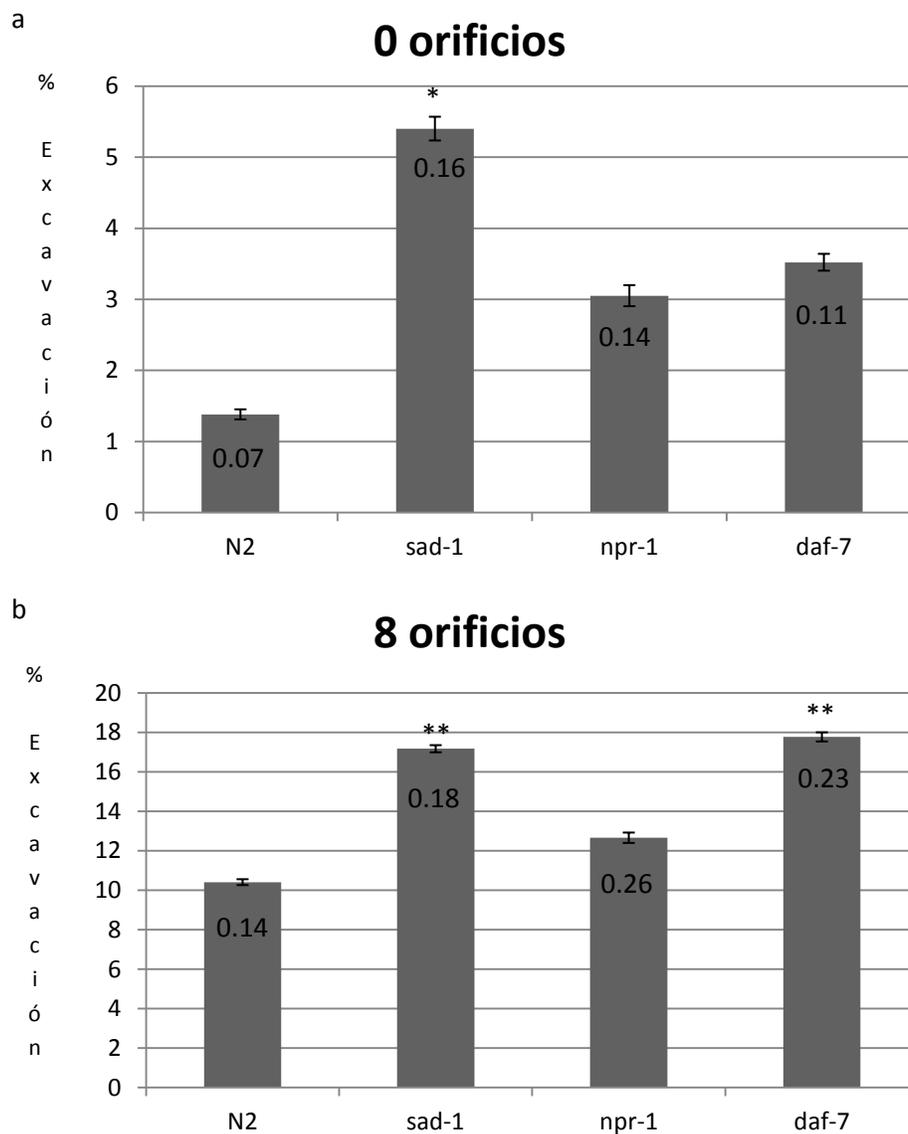


Fig. 9 Resultados de los bioensayos. a) Placas sin orificios. $n= 37$, $SD= 0.42, 1.01, 0.88$ y 0.68 respectivamente. b) Placas con ocho orificios. $n=45$, $SD= \pm 1.03, \pm 1.22, \pm 1.76$ y ± 1.55 respectivamente. Valor de $p * \leq 0.05, ** \leq 0.01$.

Para corroborar el posible papel que juega el nivel de oxígeno en el medio en el comportamiento de excavación se generó la doble mutante *gcy-35; sad-1* y se verificó su genotipo mediante PCR y electroforesis (Fig. 10). La escalera es de 1kb de peso molecular de Life Technologies.

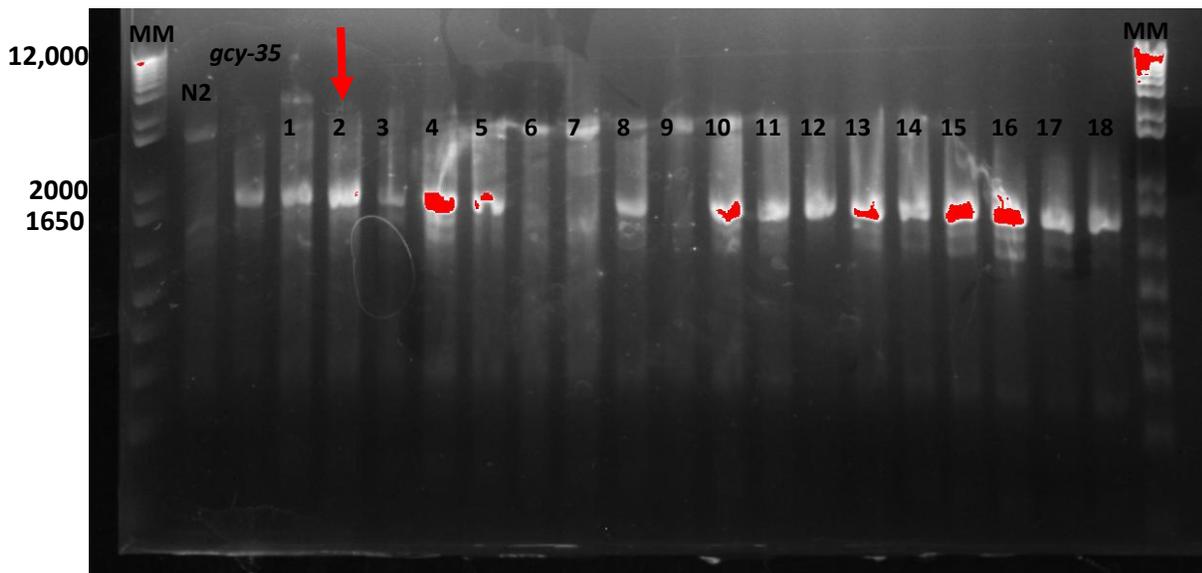


Fig. 10 Genotificación mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar el genotipo de la mutante del gen *gcy-35*. La primera y última columna corresponde al marcador molecular de 1Kb (MM). En la segunda columna se cargo ADN de la cepa N2 como control negativo, en la tercera ADN de *gcy-35* como control positivo y el resto son pruebas para las dobles mutantes F2s ($n=18$).

Se eligió la muestra #2 para realizar bioensayos de comportamiento (Fig. 11) bajo las mismas condiciones que los ensayos anteriores por la similitud en peso molecular con el control positivo. Para demostrar el comportamiento del control positivo y poder comparar contra el control negativo y la mutante para *sad-1* se incluyó en el ensayo la mutante de *gcy-35*.

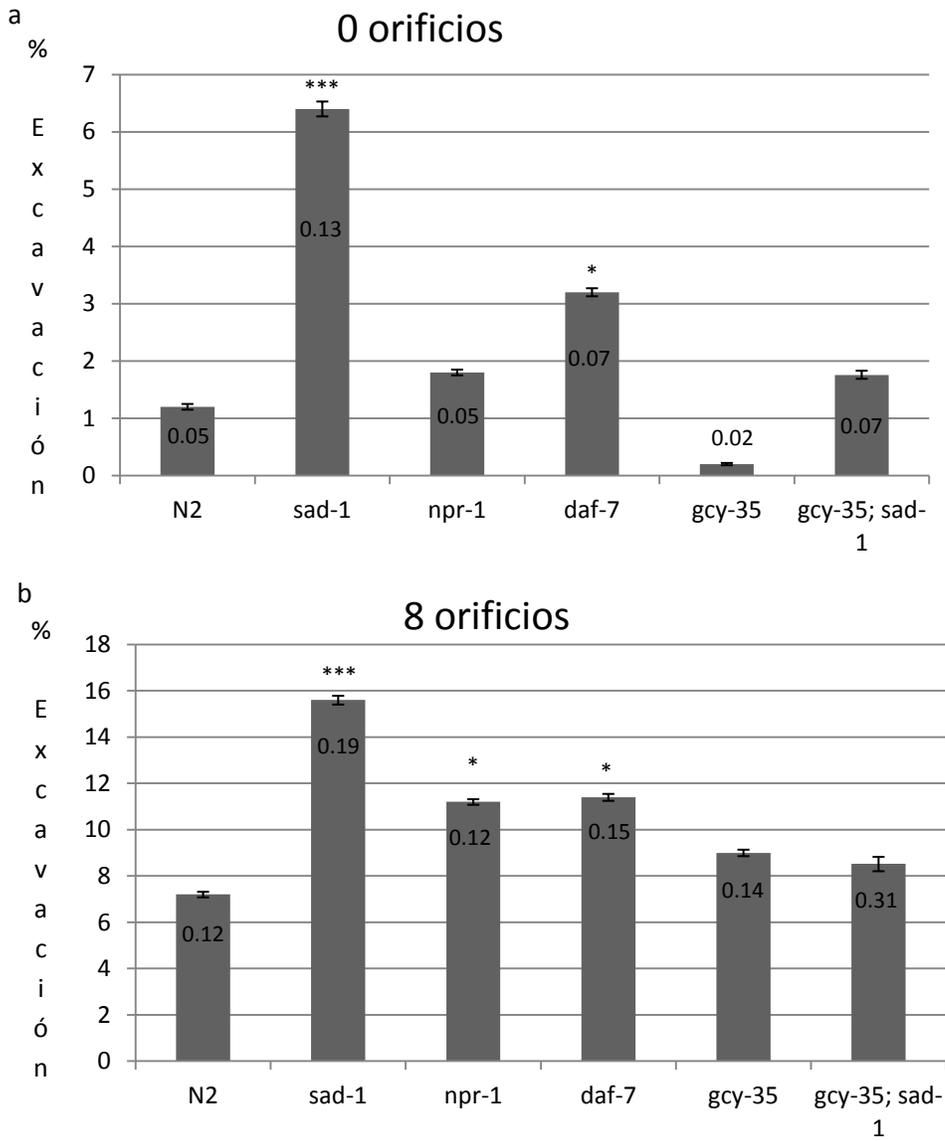


Fig. 11. Resultados de comportamiento de la doble mutante *gcy-35; sad-1*. a) Sin orificios n= 50, SD= ± 0.3 , ± 0.9 , ± 0.3 , ± 0.5 , ± 0.1 y ± 0.4 , respectivamente. b) Con ocho orificios n=50, SD= ± 0.9 , ± 1.3 , ± 0.8 , ± 1.0 , ± 0.9 y ± 1.8 , respectivamente. Valor de p $^* \leq 0.05$, $^{**} \leq 0.01$ y $^{***} \leq 0.001$.

7. Discusión

7.1 Establecimiento de bioensayos de comportamiento de excavación

Se eligió realizar los ensayos para evaluar el comportamiento en placas pequeñas de 3.5 cm de diámetro y con ocho orificios para incrementar la posibilidad de que los gusanos encuentren un medio para entrar en el agar. Esto se justifica en el hecho de que la superficie del agar es de 9.62 cm² y cada orificio ocupa 0.78 mm². En cuanto al número de gusanos por placa, además de no observar diferencias significativas al aumentar a 20, se estableció en 10 gusanos para facilitar el conteo ya que algunas cepas como N2 y *daf-7* se mueven rápido y constantemente por el agar (de Bono y Bargmann, 1988) y se observó que estadísticamente es significativo. El tiempo determinado para contar el número de nemátodos se fijó tomando en cuenta que la inanición puede ser una causa que altere el comportamiento a observar en *C. elegans* (Cheung *et al.*, 2004). Otro factor a tomar en cuenta al momento de realizar los ensayos es el estado del agar. Si las placas para los ensayos se mantienen a bajas temperaturas para evitar su contaminación se deben atemperar antes de transferir los nemátodos, ya que se observó que a temperaturas demasiado bajas los nemátodos sufren una parálisis temporal. De igual manera, es preferible utilizar placas con agar hecho con dos días de anticipación para obtener mayor estabilidad y restar humedad, con el fin de evitar superficies demasiado suaves (Brenner, 1974).

7.2 Bioensayos de comportamiento

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que el comportamiento de excavación en *sad-1* y *daf-7* sucede con mayor tendencia sobre el control N2. No existen diferencias significativas entre *sad-1* y *daf-7* ($p= 0.3$ sin orificios y $p= 0.8$ con ocho orificios), por lo que se puede deducir que el gen *daf-7* puede estar jugando un papel en el desarrollo del comportamiento de excavación en *C. elegans*. Esto, al igual que en muchos otros comportamientos, da pie para estimar que dicha conducta no es regulada por un único gen, sino que por el contrario, pueda estar regulada por una gran red de genes involucrados (Barron y Robinson, 2008).

Se observó que en la cepa mutante para *npr-1* los nemátodos tienden a subir por las paredes de la placa, lo que dificulta su locomoción y cerca del 40% mueren adheridos a ella. Por otro lado, la cepa *daf-7* prefiere penetrar el agar por las orillas de la placa, mientras que *sad-1* utiliza con mayor frecuencia los orificios. Esto puede ser debido a que la mutación en *sad-1* conlleva defectos en motoneuronas (Kim *et al.*, 2010a), por lo que le resulta más realizable entrar al agar por fracturas de mayor tamaño.

7.3 Breve descripción del comportamiento

Las cepas utilizadas en el presente estudio difieren en el comportamiento de excavación. De manera general, este comportamiento puede ser descrito como el desplazamiento del nemátodo hacia el interior del agar mediante el uso de fracturas en el medio o generándolas con movimientos de locomoción. En machos se observó que usan el abanico de la cola para perforar el agar, pero este hecho necesita de más estudios para corroborarlo. También se observó que no sólo los adultos permanecen dentro del agar, sino que incluso las larvas L1 pueden ser halladas dentro del agar. Se desconoce si las larvas pueden excavar o los huevos son depositados y eclosionan por debajo de la superficie. Estos datos se observaron en placas con alimento.

7.4 PCR y electroforesis. Bioensayo con la doble mutante *gcy-35, sad-1*

Se realizó un PCR tras la obtención de la doble mutante *gcy-35; sad-1* con una T_m para la alineación de 60°C. Después de la electroforesis se decidió repetir el PCR y subir la T_m a 62°C para obtener mayor especificidad en los resultados. De esta manera podemos observar que *gcy-35* no tiende a enterrarse, al menos que existan espacios donde pueda entrar. Al igual que *daf-7*, *gcy-35* utiliza los bordes para entrar al agar.

En cuanto al comportamiento de la doble mutante se observó la expresión de los genes *sad-1* y *gcy-35*. En la figura 10 se observa que la muestra 2 presenta una banda del mismo peso molecular que el control positivo (mutante *gcy-35*), lo que confirma su presencia en el genotipo. Las bandas con mayor peso molecular representan un genotipo igual a la cepa silvestre N2, es decir, con genes sin mutaciones. Esto se debe a que la mutante *gcy-35* tiene una delación, lo que la hace

de menor peso molecular. Después de realizar el bioensayo de comportamiento con la doble mutante se observó que en placas sin orificios la tendencia a excavar el agar es mayor en la doble mutante que en *gcy-35*, incluso que en la cepa silvestre N2. El comportamiento de excavación no es tan evidente como se observa en *sad-1*, lo que podría ser el resultado de dos vías de señalización distintas a cada gen (*gcy-35* y *sad-1*).

Aunque los niveles de oxígeno no fueron medidos para esta investigación existen evidencias sobre la variación de los niveles sobre la superficie de la placa y dentro de ella (Rogers *et al.*, 2006).

8. Conclusión

El comportamiento de excavación en el nemátodo *C. elegans* parece estar regulado por un conjunto de genes, algunos de ellos ligados al desarrollo y expresión en neuronas sensoriales como *sad-1* y *daf-7*, y a la aerotaxis como *gcy-35*. En respuesta a mutaciones de ciertos genes tales como *sad-1* y como método para evitar ambientes nocivos, la cepa mutante CX5156 *sad-1* presenta un marcado comportamiento de excavación comparada con la cepa silvestre N2. A partir de lo obtenido en esta investigación queda el gen *sad-1* como candidato para futuros proyectos, pues aun queda por descubrir las vías por las cuales actúan los genes reguladores de este comportamiento. Si bien los resultados muestran apenas los primeros pasos para estudiar la excavación en *C. elegans*, son importantes para crear las bases de una posible nueva línea de investigación y profundizar en el tema del comportamiento de excavación.

9. Referencias

Albertson, D. G y Thompson, J. N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*275: 299-325.

Bargmann, C.I. (1993). Genetic and cellular analysis of behavior of *C. elegans*. *Ann. Rev. Neurosci.* 16, 47-71.

Bargmann, C.I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. WormBook, Ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook

Bargmann, C.I., y Horvitz, H.R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron*. 7, 729–742.

Barrios, A., Ghosh, R., Fang, C., Emmons, S. E. y Barr, M. (2012). PDF-1 neuropeptide signaling modulates a neural circuit for mate-searching behavior in *C. elegans*. *Neurosci*. 15, 1675-7682.

Barron, A. B. y Robinson, G. E. (2008). The utility of behavioral models and modules in molecular analyses of social behavior. *Genes Brain Behav*. 7, 257–265.

Brenner, S. (1973). The genetics of behavior. *Br. Med. Bull.* 29:269-271.

Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71. (Abstr.)

Brenner, S. (2002). Nature's gifts of science. Nobel literature. 274-282.

Cassada, R. C. (1986). Burrowing, spontaneous mutants, etc. with another wildtype strain. *Worm Breeder's Gazette*, 9(3), 29

Cheung, B. H. H., Arellano-Carbajal, F., Rybicki, I., y De Bono, M. (2004). Soluble guanylate cyclases act in neurons exposed to the body fluid to promote *C. elegans* aggregation behavior. *Curr Biol*, 14, 1105-11.

Chin K., Pearson D. y Ekdale, A.A. (2013). Fossil worm burrows reveal very early terrestrial animal activity and shed light on trophic resources after the end-Cretaceous mass extinction. *PLoS ONE* 8(8).

Crump, J.G., Zhen, M., Jin, Y., y Bargmann, C.I. (2001). The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. *Neuron* 29, 115-129.

de Bono, M. y Bargmann, C.I. (1998). Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food responses in *C. elegans*. *Cell* 94(5), 679-689.

Fay, D. S. (2013). Classical genetic methods. *WormBook*, ed. *The C. elegans Research Community*.

Gray, J. M., Karow, D. S., Lu, H., Chang, A. J., Chang, J. S., Ellis, R. E., Marletta, M. A., y Bargmann, C. I. (2004). Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature*, 430, 317-322.

Hall, D.H., Lints, R. y Altun, Z. (2006). The neurobiology of *C. elegans*. p.1 Elsevier Academic Press, California.

Hansel, M. H. (2005). Animal Architecture. Oxford Univ. Press. 126- 132.

Hazelton, P.D., Du, B., Haddad, S. P., Fritts, A. K., Chambliss, C. K., Brooks, B. W y Bringolf, R. B. (2014). Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. *Aquat. Toxicol.* 151: 27-35.

Hukema, R. K., Rademakers, S., Dekkers, M. P., Burghoorn, J., y Jansen, G. (2006). Antagonistic sensory cues generate gustatory plasticity in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J*, 25, 312-22.

Jensen, L.T. y Culotta, V.C. (2005). Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. *J. Biol. Chem.* 280, 41373–41379.

Kim, J.S., Hung, W., y Zhen, M. (2010a). The long and the short of SAD-1 kinase. *Communicative & Integrative Biology* 3:3, 251-255.

Kim, J.S., Hung, W., Narbonne, P., Roy, R., y Zhen, M. (2010b). *C. elegans* STRAD alpha and SAD cooperatively regulate neuronal polarity and synaptic organization. *Development*, 137, 93-102

King, J. A. (1955). Social behavior, social organization and population dynamics in a black tailed prairie god town in the Black Hills of South Dakota. *Contrib. Lab. Vert. Biol. Univ. Michigan.* 67: 1-123.

Liu, T. y Cai, D.(2013). Counterbalance between BAG and URX neurons via guanylate cyclases controls lifespan homeostasis in *C. elegans*. *EMBO J.* 32, 1529-1542.

Lizcano, J.M., Göransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Mäkelä, T.P., y Hardie, D.G. (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PARK-1. *EMBO J.* 23, 833-843.

Lledías, F. y Hansberg, W. (2000). Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol.* 319:110-119.

Marnett, L. J. y Plastaras, J. P. (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17:214-221

Nicholas, W.L., Dougherty, E.C., y Hansen, L. (1959). Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: *Rhabditidae*) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann NY Acad. Scien.* 77, 218-236.

Pocock, R. y Hobert, O. (2008). Oxygen levels affect axon guidance and neuronal migration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci.* 11, 894-900.

Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W. y Maxwell, P.H. (2000). Targeting tumors through the HIF system. *Nat. Med.* 6, 1315–1316

Ren, P., Lim, C.S., Johnsen, R., Albert, P.S., Pilgrim, D., y Riddle, D.L. (1996). Control of *C. elegans* larval development by neuronal expression of a TGF- β homolog. *Science* 274, 1389-1391.

Rogers, C., Persson, A., Cheung, B. y de Bono, M. (2006). Behavioral motifs and neural pathways coordinating O₂ responses and aggregation in *C. elegans*. *Curr Biol.* 16, 649-659.

Schackwitz, W.S., Inoue, T., y Thomas, J.H. (1996). Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in *C. elegans*. *Neuron* 17, 719-728

Sporn, M. (1999). TGF- β : 20 years and counting. *Microbes Infect* 1:1251-1253.

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., y Zuberer, D.A. (1998). Principles and Applications of Soil Microbiology. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.

Taber, F.W. (1945). Contributions on the life history and ecology of the nine-banded armadillo. *J. Mammal* 26:211-226.

Tallqvist, M. (2001). Burrowing behaviour of the Baltic clam *Macoma balthica*: effects of sediment type, hypoxia and predator presence. *Mar. Ecol. Prog. Ser* 212:183-191.

Torres, M. A., Dangi, J.L. y Jones, J. D. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:517-522.

Trent, C., Tsung, N., y Horvitz, H. R. (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 104, 619-47.

Vowels, J. J., y Thomas, J. H. (1992). Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 130, 105-23

Weber KP, De S, Kozarewa I, Turner DJ, Badu MM, y de Bono, M. (2010). Whole genome sequencing highlights genetics changes associated with laboratory domestication of *C. elegans*. *PLoS ONE* 5(11).

WormAtlas, Altun, Z.F., Herndon, L.A., Crocker, C., Lints, R. y Hall, D. H. (2015). <http://www.wormatlas.org>