

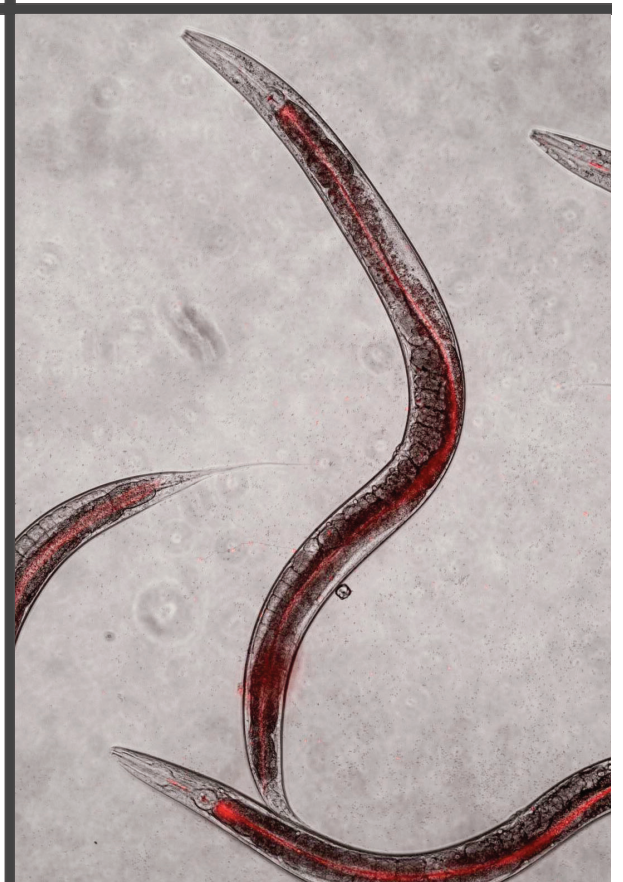
EL ESTRÉS DURANTE EL DESARROLLO COMO FACTOR DE  
RIESGO PARA ENFERMEDADES NEUROPSIQUIÁTRICAS:  
EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA INGESTA EN EL  
MODELO DEL GUSANO *C. ELEGANS*

Tesis para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología de la  
Universidad Nacional de San Martín

**Autora:** María Victoria Rodríguez Sbordi  
**Directora:** Dra. Marcela Brocco  
**Co-directora:** Dra. Melisa Monteleone  
Laboratorio de Neurobiología del Estrés

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas  
(IIBio - UNSAM)

Marzo 2024



## AGRADECIMIENTOS

*A la UNSAM y a cada uno de los destacados profesores que han dejado una huella significativa en mi desarrollo como Licenciada en Biotecnología.*

*A Marce por darme la oportunidad de hacer la tesis en su laboratorio. Gracias por tenerme inmensa paciencia y ver el potencial que hay en mí. Gracias por transmitirme todo tu conocimiento y por dedicar tu tiempo a mi aprendizaje.*

*A Meli y Mei por acompañarme en mis primeros pasos en el trabajo de mesada, por escucharme y por estar presentes para aconsejarme en mi camino.*

*A los jurados por aceptar ser parte de esta tesis.*

*A Collette por ser parte de mi experiencia formativa en el extranjero. Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio y transmitirme tu conocimiento con tanto placer.*

*A la familia Rodríguez Sbordi por su apoyo incondicional a lo largo de mi camino. Gracias por darme mi espacio cuando necesitaba estar sola y por ser la mejor compañía cuando salía de la cueva. Un agradecimiento especial a mis papás, que me dieron la oportunidad de dedicarme plenamente al estudio. Gracias por demostrarme lo orgullosos que están de mí y por festejar todos mis logros. Gracias por ser mi principal motivación, sin sus palabras de aliento durante todos estos años no estaría donde estoy hoy; mi formación como la profesional y la persona que soy es gracias a ustedes.*

*A papá por mostrarme lo que es el amor por el trabajo y la perseverancia. A mamá por transmitirme el amor por las ciencias naturales y el empoderamiento de la mujer en la ciencia.*

*A mis hermanos por tratar de hacer silencio mientras estudiaba y hacerme reír a carcajadas el resto del tiempo. Son los mejores compañeros de vida que me pudo tocar y estoy orgullosa de las personas en las que se están convirtiendo. En particular a Caro por las incontables y extensas charlas, sos el pepito grillo de mi consciencia.*

*A mis abuelos por ser mis mayores admiradores. Los ojos llenos de amor y admiración con los que me miran cuando hablo de mis estudios son toda la motivación que necesité para seguir adelante. Gracias por regalarme tanto de su tiempo y por hacerme sentir amada. Fui totalmente*

*privilegiada de tenerlos a ustedes a mi lado durante esta etapa de mi vida y mi mayor logro es hacerlos sentir orgullosos.*

*A mis padrinos por ser mis segundos padres. Gracias por su constante apoyo, por presumir de mí ante cualquier persona y por formar parte de mi vida desde que tengo memoria.*

*A Nico por ser el mejor compañero de vida que pude haber elegido. Desde que te conocí que sos mi ejemplo de responsabilidad y trabajo duro. Gracias por tu racionalidad que fue mi cable a tierra todos estos años. Gracias por tus palabras de aliento que siempre me motivaron a dar un poquito más. Gracias por transmitirme tu serenidad en mis momentos de estrés. Gracias por el respeto con el que nos tratamos, por entender mis tiempos y mis silencios. Gracias por tu compañía en los buenos y malos momentos. Gracias por confiar en mí.*

*A mis amigos del colegio por no soltarme la mano en todos estos años. Gracias por entender mis momentos nerd, por no enojarse cuando prefería quedarme estudiando antes que salir a bailar y por escucharme hablar sobre mis experimentos aunque cueste entenderlos. A Cami y Mechi por ser las mejores amigas del mundo. Gracias por elegirme para festejar todos nuestros logros juntas y por hacerme sentir que nunca voy a estar sola. Gracias por siempre escucharme y aconsejarme, hasta en los momentos más difíciles. Quiero que sepan que son mi inspiración y me enorgullece presumir sus logros y las increíbles mujeres que son. A Pedro por ser mi alma gemela. Gracias por nunca dejar de estar a mi lado, por compartir el amor por las plantas, los bichos y tantos de nuestros gustos. Gracias por tantos años de aventuras y por ser mi primer compañero de laboratorio (aunque haya sido en el patio de nuestras casas). A Guada por permitirme conocerte más allá del exterior. Gracias por las noches de salidas, tantas charlas y por ser mi amiga desde salita de cinco. Espero que las cartas digan que seguiremos así muchos años más.*

*A Aldi y Eve por ser mis primeras amigas de la facultad y por seguir siendo parte de mi vida. Gracias por ser un motor durante los estudios, por compartir tantas horas de charlas, por ser un oído que me escuchó y un hombro en el cual apoyarme, y por elegirme como amiga. Estoy orgullosa de ver las increíbles profesionales en las que nos convertimos.*

*A Coti, Valen y Toti por tantas horas de meet, catarsis y trabajos prácticos juntas, no podía haber pedido mejor grupo. Gracias por hacer de estos últimos años de cursada mucho más amenos. Son hermosas personas y estoy feliz de llevarme su amistad.*

*A Fede por los mates y charlas compartidos en becarios. Gracias por escucharme siempre que lo necesité y por confiar en mí con tus problemas. Fuiste un apoyo indispensable. Gracias por tu hermosa amistad.*

*A Lu, Emi, Noe, Juli, Cata, Juli, Coti y Cami por ser el grupo más hermoso de mujeres. Gracias por su bella amistad, por compartir tantos lindos momentos, por el apoyo emocional durante estos años. Me llevo un grupo de amigas y colegas increíbles.*

*A Eze por ser un amigo incondicional. Gracias por tantas charlas catárticas facultativas y personales.*

*A la camada de Biotecnología 2023 por hacer que el aprendizaje sea más divertido. Gracias por los mates compartidos, por las horas de estudio juntos y por los festejos descontracturantes post exámenes. Me llevo muchas amistades y espero cruzarnos como colegas. Las risas no faltaron.*

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	10
ABREVIATURAS.....	11
CAPÍTULO I.....	15
<i>Introducción</i> .....	15
EL ESTRÉS.....	16
EL DESARROLLO.....	18
<i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> .....	19
Anatomía.....	19
Ciclo de vida.....	20
Alimentación.....	23
Herramientas genéticas.....	25
El sistema nervioso.....	28
Comportamientos.....	29
La respuesta al estrés en <i>C. elegans</i> .....	32
<i>C. elegans y las enfermedades neuropsiquiátricas</i> .....	33
ABORDAJE EXPERIMENTAL.....	35
CAPÍTULO II.....	36
<i>Hipótesis y Objetivos</i> .....	36
HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVOS.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
CAPÍTULO III.....	38
<i>Resultados</i> .....	38

¿El estrés térmico afecta el comportamiento de los gusanos?.....	40
Efecto del estrés sobre la ingesta en <i>C. elegans</i> .....	43
Efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta sobre la ingesta en <i>C. elegans</i> .....	48
Efecto conjunto del estrés y la suplementación dietaria sobre la ingesta en <i>C.</i> <i>elegans</i> .....	50
Efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta sobre la ovipuesta en <i>C.</i> <i>elegans</i> .....	53
Puesta a punto de la tinción del contenido lipídico.....	54
Silenciamiento génico por interferencia de ARN (ARNi).....	55
CAPÍTULO IV.....	60
<i>Discusión, Conclusión y Perspectivas a futuro</i> .....	60
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIÓN.....	69
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	70
CAPÍTULO V.....	71
<i>Materiales y Métodos</i> .....	71
TÉCNICAS USADAS EN EL MODELO DE <i>C. ELEGANS</i> .....	72
Líneas de gusanos.....	72
Mantenimiento.....	72
Alimento.....	72
Cepas de bacterias.....	72
Cultivo de bacterias.....	72
Descontaminación y sincronización.....	73
Remoción de bacterias y levaduras.....	73
Remoción de hongos.....	74
Mantenimiento de stocks.....	74
Congelamiento.....	74
Descongelado.....	74

PROTOCOLOS PARA EL ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTOS.....	74
Sincronización de la población.....	74
Diseño experimental.....	75
Tratamiento de estrés.....	75
Cambio en calidad dietaria.....	75
Suplementación dietaria.....	76
Evaluación de ingesta.....	77
a. Medición de frecuencia de bombeo faríngeo.....	77
b. Medición de intensidad de fluorescencia intestinal.....	78
c. Medición de contenido lipídico.....	79
Análisis de imágenes de microscopía para medición de fluorescencia intestinal.....	80
Ovipuesta.....	81
Silenciamiento génico por interferencia de ARN (ARNi).....	81
Análisis estadístico de los datos.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	84
ANEXO.....	92

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1: Anatomía de <i>C. elegans</i> .....	19
Figura I2: Se grafica el sistema digestivo de <i>C. elegans</i> .....	20
Figura I3. Sexos en <i>C. elegans</i> .....	21
Figura I4. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> .....	23
Figura I5: Anatomía faríngea y bombeo faríngeo.....	25
Figura I6: Representación de la faringe del gusano y el transporte de bacterias.....	25
Figura I7: Esquema de una célula intestinal de <i>C. elegans</i> y del silenciamiento génico por ingestión de ARNdc.....	28
Figura I8: Imagen de fluorescencia del sistema nervioso de <i>C. elegans</i> .....	29
Figura I9: Esquema de las células involucradas en la postura de huevos.....	31
Figura I10: Faringe de <i>C. elegans</i> .....	32
Figura 1: Esquema del abordaje experimental.....	40
Figura 2: Gusano hermafrodita adulto con su contenido lipídico teñido con Nile Red.....	41
Figura 3: Efecto del estrés sobre el contenido lipídico.....	42
Figura 4: La deposición de huevos está alterada en los gusanos estresados.....	43
Figura 5: Frecuencia de bombeo faríngeo para cada grupo analizado.....	44
Figura 6: Imágenes de epifluorescencia de gusanos.....	45
Figura 7: Imágenes de epifluorescencia de individuos que ingirieron bacterias que expresan dTomato.....	46
Figura 8: Imagen representativa de la medición de fluorescencia intestinal.....	47
Figura 9: Efecto del estrés sobre la intensidad de fluorescencia intestinal.....	48
Figura 10: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.....	48
Figura 11: Efecto del estrés y la calidad de la dieta sobre la frecuencia de bombeo faríngeo.....	49
Figura 12: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.....	51
Figura 13: Efecto del estrés y la suplementación dietaria sobre la frecuencia de bombeo faríngeo.....	52



Figura 14: La suplementación dietaria incrementa la intensidad de fluorescencia intestinal.....	53
Figura 15: La exposición al estrés y la alimentación con HT115 aumentan la deposición de huevos.....	54
Figura 16: Gusano hermafrodita adulto con su contenido lipídico teñido con ORO.....	55
Figura 17: Efecto del silenciamiento génico sobre la frecuencia de bombeo faríngeo..	58
Figura 18: Resultado del análisis poblacional de los gusanos tras silenciamiento génico por ARNi.....	59
Figura M1: Cultivo de bacterias OP50-dTomato en LB agar.....	73
Figura M2: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.....	75
Figura M3: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado, mostrando el cambio de cepa bacteriana para el alimentado de los gusanos.....	76
Figura M4: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado, mostrando el agregado de suplementación al alimento de los gusanos.....	77
Figura M5: Demostración de como se observa un bombeo en imágenes.....	78
Figura M6: Protocolo para medición de intensidad de fluorescencia intestinal.....	79
Figura M7: Vector L4440.....	82
Figura M8: Esquema simplificado de la técnica de silenciamiento génico por ARN por alimentado.....	83

## RESUMEN

Los trastornos alimentarios están emergiendo como un desafío global en constante crecimiento. Se ha observado que el estrés puede desempeñar un papel crítico como desencadenante de enfermedades neuropsiquiátricas, incluidos los trastornos de la conducta alimentaria (TCA). Se dispone de evidencia que sugiere que la exposición al estrés durante el desarrollo podría aumentar la predisposición a estos trastornos. Por otro lado, se ha encontrado que la suplementación de la dieta con vitaminas y aminoácidos durante el embarazo puede disminuir la probabilidad de desarrollar trastornos alimentarios en las hijas de las mujeres que recibieron dicha suplementación.

El modelo *C. elegans* es altamente valorado en la investigación debido a su ciclo de vida corto, genoma completamente secuenciado y un sistema nervioso simple. Su hermafroditismo y su rápida reproducción facilitan estudios con relevancia estadística, mientras que su tamaño pequeño y transparencia permiten la observación directa de estructuras internas. Comparte homología genética con los humanos, lo que lo hace valioso para estudiar enfermedades y vías metabólicas. Además, su cultivo económico y de fácil mantenimiento lo convierte en una herramienta accesible para investigadores de diversos ámbitos.

En este estudio, nuestro objetivo fue simular los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) en *C. elegans*. Para ello, evaluamos la ingesta de los gusanos para entender cómo el estrés durante su desarrollo afecta su comportamiento alimentario. Utilizamos la progenie de gusanos expuestos a estrés térmico para nuestros experimentos. Desarrollamos tres métodos para analizar este comportamiento: la medición de fluorescencia intestinal, la frecuencia de bombeo faríngeo y el contenido lipídico. Aunque no observamos un efecto del estrés térmico en la ingesta, sí observamos cambios en la misma cuando suplementamos la dieta con vitaminas y aminoácidos. Esto sugiere la posibilidad de que el estrés aplicado a los parentales no haya alcanzado una intensidad suficiente para inducir efectos en la descendencia, lo que nos lleva a considerar la exploración de otros tipos de estrés para continuar nuestra investigación. Como alternativa, contemplamos la utilización de mutantes en genes de interés en lugar de gusanos silvestres. Este enfoque nos llevó a desarrollar habilidades en la generación de gusanos con silenciamiento de genes (ARNi) relacionados con la ingesta, lo que amplía nuestras herramientas experimentales.

Este trabajo de investigación ha sido fundamental para la implementación de diversas técnicas novedosas en nuestro laboratorio, representando el primer paso hacia el modelado de trastornos de la conducta alimentaria en el modelo *C. elegans*.

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxiribonucleico

AF: ácido fólico o vitamina B9

ANOVA: análisis de varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNdc: ARN doble cadena

ARNi: interferencia de ARN

ARNm: ARN mensajero

Asdf: fenotipo de depleción somática de grasa dependiente de la edad

B12: vitamina, cobalamina

CARS: del inglés *Coherent Anti-Stoke Raman Spectroscopy*, espectroscopía Raman coherente Anti-Stokes

CGC: *Caenorhabditis* Genetics Center

DAT-1: transportador de dopamina

DAF-16: único ortólogo de los factores de transcripción FOXO en *C. elegans*

DH5 $\alpha$ : cepa de *E. coli*

DMSO: dimetilsulfóxido

*dop-3*: gen de receptor de dopamina

DRD3: receptor de dopamina D3

*eat-2*: gen de la subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina

*eri-1*: mutaciones en ARNasas

FACS: del inglés, *fluorescence activated cell sorting*, citometría de flujo con sorteo

*fog-2*: gen de determinación de sexo en la línea germinal

FOXO: factor de transcripción

GFP: proteína verde fluorescente

GMP6A: glicoproteína de membrana M6A

HB101: cepa de *E. coli* híbrido B x K12

HNF4A: factor nuclear hepático 4 alpha

HPLC: del inglés *high-performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alta performance

HSF-1: por sus siglas en inglés, *Heat shock factor 1*

HSN: neuronas motoras

HSP: por sus siglas en inglés, *Heat shock protein*

HSR: por sus siglas en inglés, *Heat Shock Response*

HTR2A: receptor 2A de serotonina

HTR2B: receptor 2B de serotonina

HT115: cepa de *E. coli* derivada de K12, que expresa o no ARNdc para ARNi

HT115-L4440: cepa de *E. coli* HT115 con el plásmido de expresión L4440

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido

ISS: vía de la insulina

LB: Luria Bertani

LRO: del inglés *lysosome related organelles*, organelas relacionadas con el lisosoma

L1: estadio larval 1

L2: estadio larval 2

L3: estadio larval 3

L4: estadio larval 4

L4440: vector de expresión para ARNi

MAT: S-adenosiltransferasa

*mod-5*: gen de receptor de serotonina

MS: metionina sintasa

M6a: glicoproteína de membrana 6a

M9: medio líquido del nematodo

NGM: medio de crecimiento de nematodo

*nhr-35*: gen de receptor nuclear de hormonas

*nhr-64*: gen de receptor nuclear de hormonas

*nhr-69*: gen de receptor nuclear de andrógenos

*npr-39*: gen de receptor de neuropéptidos

*nmgp-1*: gen de glicoproteína de membrana neuronal 1

N2: cepa de gusano silvestre

ON: toda la noche

OP50: cepa de *E. coli*

OP50-GFP: bacterias OP50 que expresan la proteína verde fluorescente.

OP50-dTomato: cepa de *E. coli* que expresa la proteína dTomato

ORO: Oil Red O, colorante de lípidos

PBS: buffer fosfato salino

PLP: proteína proteolipídica

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

ROI: del inglés *region of interest*, región de interés

*rrf-3*: alelo mutante que genera cepa de gusanos sensibles a la interferencia de ARNi

*rsk-1*: gen de quinasa de la proteína ribosomal S6

SAM: S-adenosil metionina

SDS: dodecilsulfato sódico

SERT-1: transportador de serotonina

*ser-1*: gen de receptor de serotonina

SID-1: proteína presente en todas las células no neuronales del gusano

SID-2: proteína de las células intestinales del gusano

TCA: trastornos de la conducta alimentaria

TDM: trastorno depresivo mayor

UTR: región no codificante

VC: célula neuronal de la vulva

VCN: cordón nervioso central

vm1: célula muscular de la vulva

vm2: célula muscular de la vulva

# CAPÍTULO I

## *Introducción*

## EL ESTRÉS

La supervivencia de los seres vivos depende de la capacidad intrínseca de responder al medio ambiente. El monitoreo del ambiente se refiere al proceso de percibir y decodificar el medio circundante a través de los sentidos. Los animales sobreviven en entornos fluctuantes usando neuronas sensoriales que detectan los cambios en el ambiente y envían señales a otras neuronas que producen los comportamientos de respuesta a dichos cambios<sup>1</sup>. Así la supervivencia de un animal depende de la plasticidad de un sistema nervioso capaz de procesar e integrar rápidamente las señales ambientales y desencadenar las respuestas más apropiadas de modo de restaurar la homeostasis.

Los estímulos ambientales (como el estrés y la inanición<sup>2</sup>) provocan cambios epigenéticos<sup>3</sup> e inducen la remodelación celular que, en el caso del sistema nervioso, se conoce como plasticidad neuronal. La plasticidad implica cambios en el cerebro a nivel de la expresión génica<sup>4</sup>. Estos cambios derivan en alteraciones de la morfología neuronal<sup>5</sup>, que pueden llevar a cambios en la función y organización de las neuronas.

El estrés es una respuesta natural del organismo frente a una situación amenazante. En el caso de vertebrados, según la definición tradicional de estrés, la estabilidad se ve comprometida por situaciones físicas identificadas como agentes estresantes<sup>5</sup>. La respuesta al estrés implica cambios fisiológicos que llevan a la adaptación del individuo permitiendo que este responda adecuadamente y alcance nuevamente el equilibrio<sup>6</sup>. Estos cambios fisiológicos incluyen la activación de los sistemas nervioso, endócrino e inmunológico, la liberación de adrenalina y noradrenalina y los picos de glucocorticoides en sangre, etc. Es decir, el estrés es el sistema de protección del organismo, que permite adaptarnos a cambios en el ambiente.

Condiciones ambientales desfavorables persistentes o intensas causan estrés crónico, que altera la función de órganos y tejidos. La exposición al estrés crónico puede conducir a cambios patofisiológicos en el cerebro y éstos pueden desencadenar cambios cognitivos y/o desórdenes de la conducta<sup>7</sup>. Además, la incapacidad para responder al estrés puede provocar enfermedades, como las patologías neuropsiquiátricas, que incluyen la depresión o el déficit de atención con hiperactividad (Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; ADHD, por sus siglas en inglés)<sup>8,9</sup>. La repercusión negativa del estrés crónico puede incluir además el deterioro en la capacidad de aprendizaje y la memoria<sup>10</sup>.

Con el objetivo de identificar moléculas involucradas en la respuesta al estrés, nuestro laboratorio identificó a *gpm6a* como un gen modulado por el estrés crónico. Estudios anteriores con modelos animales mostraron que individuos expuestos a estrés psicosocial tenían niveles reducidos de ARNm de *gpm6a*, mientras que el tratamiento con el antidepresivo clomipramina revirtió estos niveles<sup>4</sup>. Además, protocolos de estrés por restricción en roedores adultos mostraron resultados similares<sup>11</sup>.



GPM6A, perteneciente a la familia de las proteínas proteolípicas (PLPs), tiene un claro papel neuroplástico, promoviendo la extensión de neuritas y la diferenciación neuronal, así como la formación de protrusiones de membrana<sup>12-17</sup> y motilidad de las espinas sinápticas. Además, las PLPs se encuentran altamente conservadas en la evolución<sup>18</sup>. En cuanto a su relación con enfermedades neuropsiquiátricas, se ha descrito un polimorfismo en el gen *GMP6A* en individuos depresivos y reducción de los niveles del ARNm de GPM6A en pacientes suicidas con depresión<sup>19</sup>. Además, se ha detectado GPM6A en vesículas extracelulares, sugiriendo su potencial como marcador biológico para enfermedades neuropsiquiátricas<sup>20,21</sup>. El mantenimiento de niveles adecuados de GPM6A es crítico para funciones cognitivas, ya que la duplicación del gen conduce a problemas de aprendizaje y comportamiento<sup>22</sup>. Para comprender mejor su mecanismo de acción, se han utilizado modelos simples como *Drosophila melanogaster*<sup>23,24</sup> y *Caenorhabditis elegans*<sup>25</sup>, demostrando la importancia de M6, el ortólogo de GPM6A en *D. melanogaster*, en la oogénesis y la respuesta a la luz. En *C. elegans*, el gen *nmgp-1* codifica el único representante de la familia de proteínas proteolípicas (PLPs), siendo ortólogo de GPM6A en mamíferos y M6 en moscas. Los análisis de secuencias muestran similitudes significativas entre NMGP-1 y estas proteínas, sumado a que comparten características estructurales similares. Recientemente en nuestro laboratorio, se demostró que cepas de gusanos mutantes para el gen *nmgp-1* muestran una respuesta alterada al estrés térmico<sup>25</sup>. De esta manera, tanto GPM6A como sus ortólogos participan en la respuesta al estrés.

Por último, si bien hay evidencia de los efectos negativos del estrés sobre la conducta alimentaria<sup>26</sup>, no se han dilucidado completamente los cambios neuronales y conductuales relacionados con el estrés y la ingesta de alimentos. Recientemente se ha centrado la atención en la interacción entre los factores genéticos y ambientales en el desarrollo de trastornos alimentarios. Por ejemplo, a través de estudios llevados a cabo mediante metanálisis de estudios de asociación a nivel genómico (*genome-wide association study*; GWAS, por sus siglas en inglés) se identificaron ocho *loci* genéticos asociados con la anorexia nerviosa<sup>27-29</sup>. Estos hallazgos sugieren una base genética compleja y poligénica para la enfermedad, con varias vías biológicas y procesos celulares implicados. Además, se identificaron correlaciones genéticas significativas entre la anorexia nerviosa y una variedad de trastornos psiquiátricos<sup>27</sup>, así como rasgos metabólicos y antropométricos, lo que apunta hacia la importancia de considerar tanto los componentes metabólicos como psicológicos en la comprensión y tratamiento de los trastornos alimentarios<sup>26,27</sup>.

A su vez cabe destacar que existe evidencia en mamíferos de la implicancia del estrés durante la gestación<sup>3</sup>. Estrés aplicado a madres gestantes incrementan la susceptibilidad de la progenie a desarrollar síndromes metabólicos y enfermedades psicológicas como los TCA<sup>30,31</sup>. Sumado a esto, la prevalencia a desarrollar TCA es mayor en mujeres<sup>31</sup>. Esto destaca el efecto que puede tener el estrés durante el desarrollo.

## EL DESARROLLO

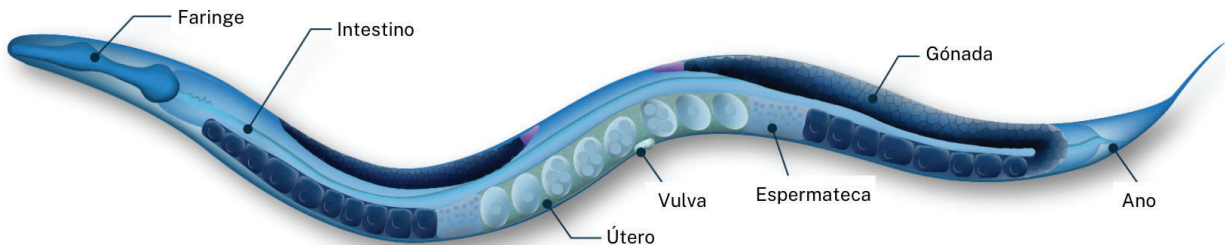
Durante el proceso de desarrollo de un ser vivo<sup>2</sup>, las células pasan por etapas de reprogramación y especialización en las que experimentan alteraciones en la expresión génica. Este proceso está dirigido por factores que controlan la transcripción genética y modificaciones epigenéticas<sup>2,32</sup>. Las modificaciones epigenéticas son cambios en la expresión de genes que pueden ser transmitidas de generación en generación y que no están determinadas por la secuencia de ADN en sí. En particular, la metilación del ADN es un ejemplo de estas alteraciones, la cual es producida por la enzima metiltransferasa al añadir un grupo metilo al anillo de citosina en la molécula de ADN<sup>33</sup>. Las variaciones en los patrones de metilación del ADN tienen la capacidad de inducir modificaciones en la expresión génica, lo que puede dar lugar a una variedad de cambios en las características observables de un organismo, e incluso aumentar la susceptibilidad a enfermedades<sup>34</sup>. Las enzimas encargadas de la metilación requieren sustratos y cofactores esenciales<sup>34</sup>. En el normal funcionamiento de las células, estos son aportados por la vía metabólica llamada “one-carbon”, que comprende una serie de vías metabólicas entrelazadas que incluyen los ciclos de metionina y folato<sup>35</sup>. Esta red compleja de reacciones provee unidades de carbono en la forma de grupos metenilo, formilo y metilo, requeridos para la función celular. En esta vía participan distintas enzimas que requieren de micronutrientes encontrados en la dieta como folato (B9), vitaminas B (B2, B6, B12), metionina y colina<sup>34</sup>. Por lo tanto, la metilación del ADN puede ser modulada externamente por la dieta. Asimismo, el suministro adecuado de metionina y vitaminas en la dieta materna podría ser crucial para, por ejemplo, mitigar los efectos adversos del estrés prenatal en la programación metabólica de la descendencia.

## CAENORHABDITIS ELEGANS

El gusano *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre que habita en el suelo y se alimenta de bacterias acumuladas en la tierra. En la década de 1960, *C. elegans* fue establecido como modelo para investigación por el científico Sidney Brenner. Brenner estaba en búsqueda de un organismo con un número limitado de neuronas y de manejo sencillo para llevar a cabo sus investigaciones en el ámbito de la genética. Identificó que el nematodo *C. elegans* cumplía con los criterios deseados, lo que lo llevó a iniciar el uso de este organismo en sus estudios. Desde entonces es ampliamente empleado como organismo de estudio en una variedad de áreas de investigación como: genética, biología del desarrollo, neurociencias, toxicología, interacciones huésped-patógeno, estudios sobre el envejecimiento y como modelo de gusanos parasíticos causantes de enfermedades, entre otros<sup>36</sup>.

### Anatomía

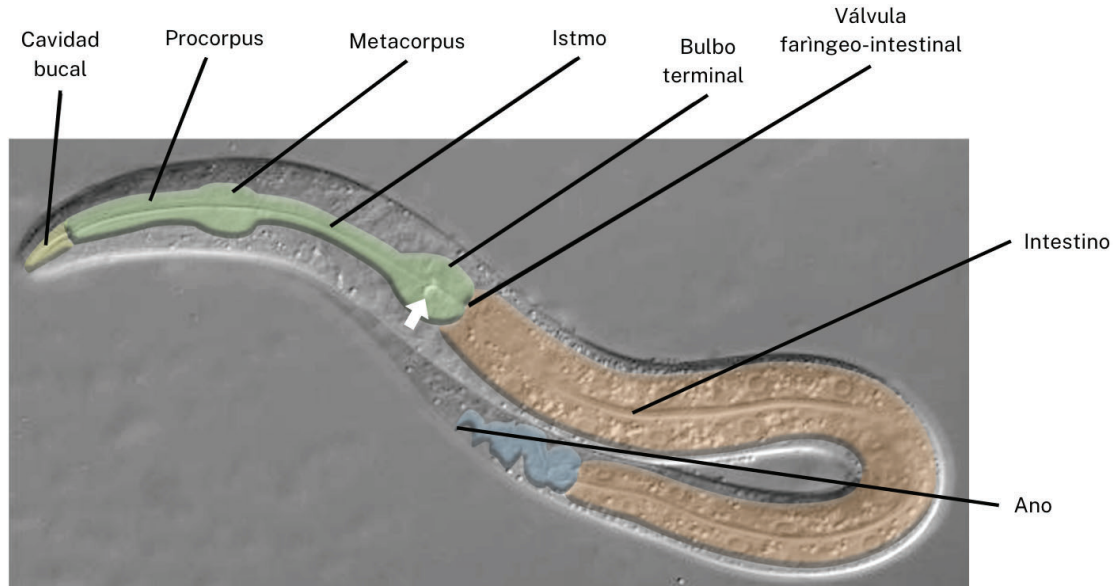
*C. elegans* es microscópico, con su forma adulta de 1 mm de longitud y las larvas alcanzando los 0,25 mm. Presenta una anatomía simple compuesta por la boca, seguida por una faringe, el intestino y el ano (Figura I1). Sumado a esto, tiene músculos a lo largo de su cuerpo que le permiten el movimiento. Únicamente el sexo hermafrodita presenta ambas gónadas (ovarios y espermateca), un útero donde se desarrollan los huevos y una vulva para la postura de los mismos.



**Figura I1: Anatomía de *C. elegans*.** Se indican los principales órganos o estructuras del gusano que serán mencionados en esta tesis. Figura modificada de “*Qué es Caenorhabditis elegans?*”, Departamento de Ciencias de la Vida Molecular, Universidad de Zurich<sup>37</sup>.

El sistema digestivo del gusano comienza con la cavidad bucal. Esta es una abertura que utiliza para ingerir su alimento. Luego se encuentra la faringe. La misma es un músculo tubular que se divide en tres partes funcionales: el corpus, que está conectado por el extremo anterior a la boca, el istmo y el bulbo terminal conectado por el extremo posterior al intestino mediante la válvula faríngeo-intestinal (véase la Figura I2)<sup>38</sup>. El triturador (flecha blanca en la Figura I2) es una porción de la faringe compuesta por músculos dentro del bulbo terminal que se contraen para triturar la comida y empujarla hacia el interior del intestino.

Una vez en el intestino, las bacterias son degradadas y los nutrientes son absorbidos para ser incorporados por el resto de las células del gusano. El descarte de materia es expulsado finalmente fuera del organismo a través del ano. Este se encuentra en la cola que es la parte final del nematodo.



**Figura I2:** Se grafica el sistema digestivo de *C. elegans*. En amarillo se señala la cavidad bucal, en verde la faringe con sus partes, en naranja el intestino medio y en azul el intestino posterior. La flecha blanca señala el triturador. Imagen adaptada de "The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis"<sup>39</sup>.

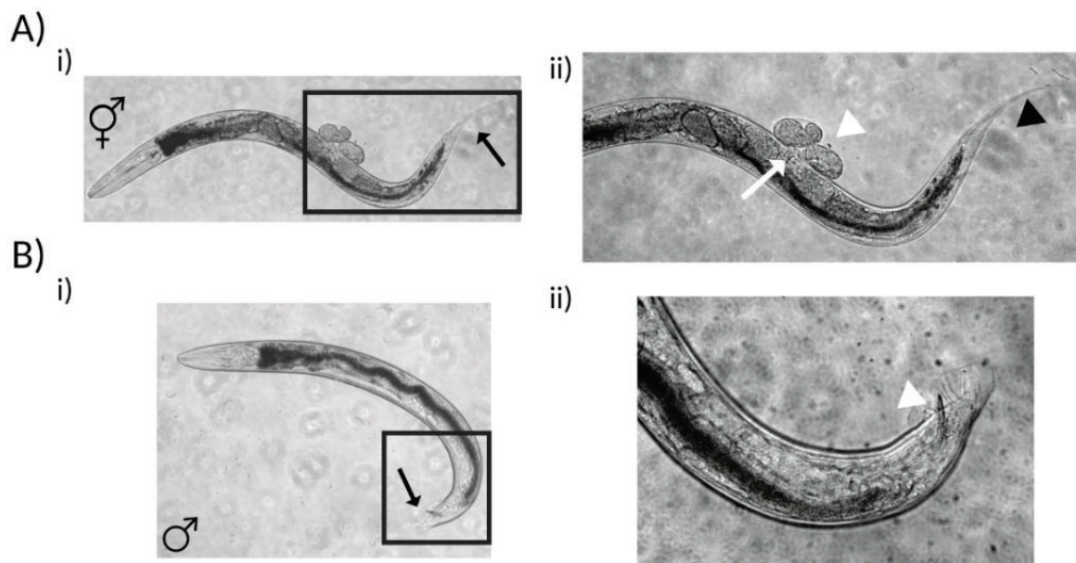
### **Ciclo de vida**

*C. elegans* exhibe dos sexos, machos y hermafroditas (véase la Figura I3). Los hermafroditas son mayoritarios en la población en tanto que la presencia de machos es poco común (con una frecuencia inferior al 0,2%). Los gusanos hermafroditas adultos tienen 959 células somáticas, incluyendo 302 células nerviosas. En contraste, los machos presentan un sistema nervioso con un mayor número de células, alcanzando un total de 473, siendo la mayoría de estas células involucradas en el proceso de apareamiento. Además de las disparidades en la cantidad de células, ambos sexos exhiben variaciones anatómicas (Figura I3 A, B) y de comportamiento.

Como su nombre indica, las hermafroditas tienen la capacidad de autofecundarse. Esta característica resulta beneficiosa en el entorno del laboratorio, ya que nos permite mantener las líneas genéticas de manera eficiente. Esta habilidad se atribuye a la presencia tanto de una cavidad especializada conocida como espermateca, destinada a almacenar espermatozoides, y de un ovario donde se encuentran los oocitos. La fusión de estos gametos da origen a embriones que se desarrollan en el útero. La autofecundación da como resultado una progenie compuesta mayoritariamente por hermafroditas. Sin

embargo, una vez agotadas las reservas de esperma, la única manera de asegurar la descendencia es a través del apareamiento de la hermafrodita con gusanos macho.

Por otro lado, los machos exclusivamente producen esperma y dependen de las hermafroditas para su reproducción. A diferencia de la autofecundación, el apareamiento da lugar a una descendencia con partes iguales de machos y hermafroditas.

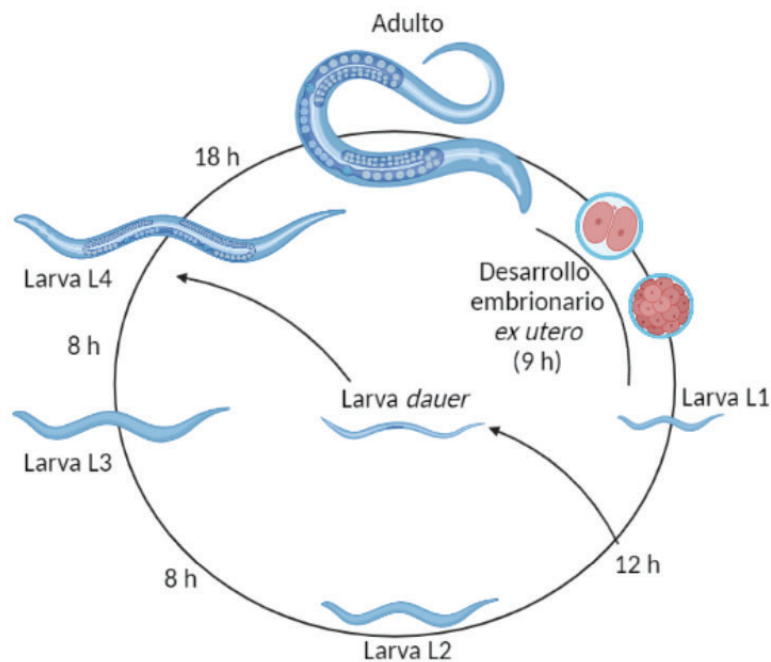


**Figura 13. Sexos en *C. elegans*.** Ai) Las hermafroditas son el sexo más común en la mayoría de las cepas y tienen una cola en forma de espiga (Flecha negra). Aii) Magnificación del recuadro negro de la imagen Ai). El triángulo negro apunta a la cola característica del hermafrodita, en forma de aguja. Las hermafroditas albergan huevos en su interior y los expulsan al ambiente a través de la vulva. La flecha blanca señala la vulva y el triángulo blanco los huevos ya depositados. Bi) Los machos son fácilmente identificables por su cola en forma de punta de flecha (Flecha negra) y por su comportamiento típico de apareamiento en el cual exploran el cuerpo de la hermafrodita con su cola. Una vez que el macho encuentra la vulva de la hermafrodita ocurre el apareamiento. Bii). Se observa la cola del macho y el gancho típico de la anatomía de este sexo. Figura tomada de Tesis doctoral de Eliana Fernández.

El desarrollo de *C. elegans* está estrechamente vinculado a la temperatura. Este gusano exhibe viabilidad y fertilidad en un rango térmico que abarca desde aproximadamente 12 °C hasta 26 °C<sup>40-42</sup>. A una temperatura de 20 °C, *C. elegans* experimenta un período de desarrollo que lleva tres días, desde el estado de huevo hasta alcanzar la madurez reproductiva<sup>43</sup>. Este intervalo de desarrollo se prolonga a temperaturas más bajas. El ciclo de vida de *C. elegans* es rápido y abarca cuatro estadios larvales desde L1 hasta L4 (Figura 14).

Las hermafroditas adultas liberan los huevos contenidos en su útero mediante contracciones del útero y de las células musculares de la vulva, aproximadamente a las 2,5 horas después de la fertilización<sup>44</sup>. Posteriormente, el huevo experimenta un desarrollo extrauterino durante otras 9,2 horas, atravesando diferentes etapas como la gastrulación y la elongación. Después de 14 horas desde la fertilización, tiene lugar la eclosión, liberando la larva L1 al entorno. Luego, la larva L1 progresa a través de tres estadios larvales adicionales hasta alcanzar la adultez. La transición de un estadio larval a otro conlleva cambios morfológicos, desarrollo del sistema nervioso y modificaciones transcripcionales<sup>44-48</sup>. Una vez que el individuo alcanza la adultez, se reinicia el ciclo.

Los gusanos hermafroditas son autofecundantes y los patrones de deposición de huevos son modulados por diversas señales. Los gusanos hermafroditas del estadio L4/adulto producen primero espermatozoides, que es almacenado en la espermateca, y luego producen ovocitos. Entre 10-15 huevos fertilizados son acumulados en el útero y la deposición se produce cuando músculos especializados se contraen produciendo la apertura de la vulva y permitiendo que los huevos sean expulsados. La deposición de huevos está regulada por una serie de condiciones ambientales. Por ejemplo, la estimulación mecánica, tal como la vibración del medio de cultivo, inhibe la oviposición<sup>49</sup>. Soluciones salinas hipertónicas, tales como el medio M9 compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  y  $\text{NaCl}$ , también inhiben fuertemente la deposición de huevos, mientras que abundantes cantidades de alimento la aumenta significativamente<sup>50</sup>.



**Figura I4. Ciclo de vida de *C. elegans*.** Las hermafroditas depositan huevos en el ambiente y éstos se desarrollan de forma extrauterina hasta dar lugar a una larva L1. Dicha larva transita por tres transiciones o mudas hasta alcanzar la adultez y reiniciar el ciclo. Figura tomada de la Tesis doctoral de Eliana Fernández.

*C. elegans* también presenta un estadio larval alternativo denominado dauer (Figura I4). Este estadio constituye una alternativa al programa reproductivo típico de *C. elegans*, ya que se trata de una fase resistente al estrés que permite al gusano sobrevivir en ambientes adversos durante varios meses<sup>51</sup>. Las larvas permanecen en este estadio hasta que las condiciones favorables se restablecen. En ese momento, la larva dauer reingresa al ciclo de vida como una larva L4 y prosigue con el programa reproductivo.

### **Alimentación**

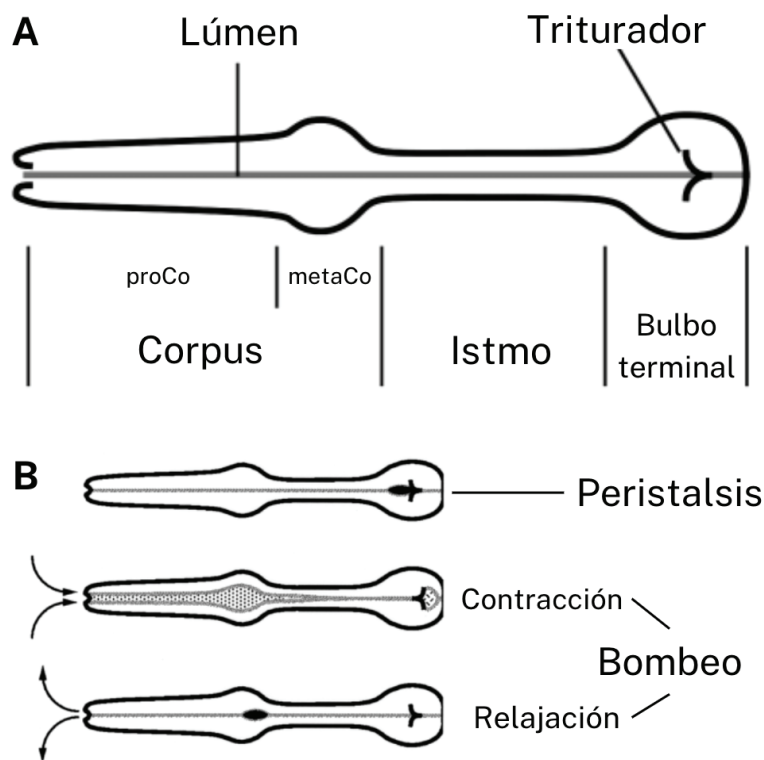
En la naturaleza, *C. elegans* se alimenta de bacterias del suelo acumuladas cerca de materia orgánica en descomposición. En el laboratorio, existe una cepa estandarizada derivada de *E. coli*, OP50<sup>1</sup>. Esta es utilizada porque en la placa de Petri con el medio de cultivo estándar (NGM) genera un césped bacteriano poco frondoso, que permite la fácil visualización de los gusanos<sup>1</sup>.

Shtonda y Avary definen calidad alimentaria como “la capacidad de un alimento (cepa bacteriana) para sostener el crecimiento de *C. elegans* según la tasa de crecimiento; esta es la inversa del tiempo que tarda un gusano en crecer desde la eclosión hasta la adultez”<sup>52,53</sup>. Por lo tanto, distintas cepas bacterianas ofrecen diversas calidades de dieta, posiblemente debido a variaciones en su composición molecular, lo que se traduce en diferentes aportes nutricionales para los gusanos.

En *C. elegans*, la alimentación comienza en la faringe. Este es un órgano neuromuscular responsable de concentrar las bacterias suspendidas en el fluido circundante, molerlas e impulsarlas hacia el intestino<sup>54</sup>. La faringe desempeña una función crucial al actuar como una bomba que genera presión para impulsar el avance de los alimentos hacia el intestino. Esta acción es de vital importancia, considerando que el interior del nematodo exhibe una presión interna superior a la del entorno circundante<sup>55</sup>. Además, la faringe no solo cumple con su papel como bomba; también desempeña una función adicional al concentrar los alimentos. Este órgano atrae y transporta las bacterias hacia la parte posterior del lumen faríngeo, mientras que la mayor parte del líquido que las rodea es expulsado por la boca en lugar de ser dirigido hacia el intestino. Se presume que esta concentración de partículas alimenticias resulta clave para facilitar una digestión y absorción eficientes. Dado el volumen limitado del lumen intestinal, una ingesta reducida permite que los alimentos permanezcan en el intestino durante períodos prolongados. Además, una menor cantidad de alimentos ingeridos favorece la

concentración de nutrientes, lo que facilita su absorción eficiente y reduce la dilución de las enzimas digestivas<sup>38</sup>.

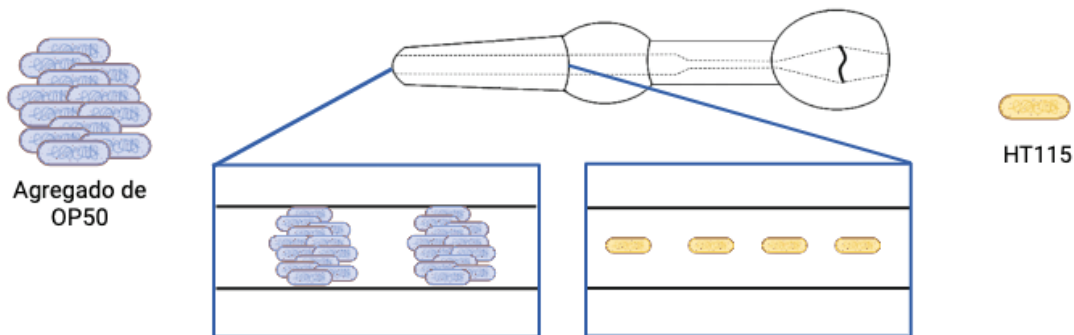
Como hemos mencionado anteriormente, la faringe de *C. elegans* se compone de tres regiones anatómicas distintas: el corpus, el istmo y el bulbo terminal (Figura I5 A). Durante el proceso normal de alimentación, la faringe realiza dos movimientos principales: el bombeo y la peristalsis del istmo<sup>56</sup> (Figura I5 B). El bombeo faríngeo implica la contracción casi simultánea de los músculos ubicados en el corpus, el istmo anterior y el bulbo terminal, seguida de una relajación igualmente coordinada de estos mismos músculos<sup>38</sup>. Esta secuencia de contracción y relajación en el corpus y el istmo anterior permite la apertura del lumen intestinal y la acumulación de alimento en su interior, como se describe con más detalle más adelante. Por otro lado, la contracción del bulbo terminal produce la inversión de las placas del triturador, lo que resulta en la trituración de las bacterias presentes frente al triturador durante la contracción, impulsándolas hacia el intestino. Durante este proceso, el bulbo terminal se encuentra hidrodinámicamente aislado del istmo anterior y el corpus, ya que el istmo posterior permanece cerrado. Posteriormente, la peristalsis, que constituye el segundo movimiento de la faringe, tiene lugar después de aproximadamente cuatro bombeos, y lleva el alimento desde el istmo anterior hasta el bulbo terminal<sup>57</sup>.





**Figura 15: Anatomía faríngea y bombeo faríngeo.** (A) La faringe es un músculo tubular dividido en tres regiones: el corpus, el istmo y el bulbo terminal. El corpus se subdivide además en una sección anterior, el procorpus (proCo), y un bulbo posterior, el metacorpus (metaCo). (B) Movimientos de la faringe. El bombeo faríngeo es un ciclo de contracción-relajación, que involucra el corpus, la mitad anterior del istmo y el bulbo terminal. La peristalsis del istmo posterior lleva el alimento desde el istmo anterior hacia el bulbo terminal. Figura adaptada de Avery et al<sup>38</sup>.

A su vez, mediante una simulación para analizar cómo las bacterias son transportadas en la faringe, se determinó que bacterias de gran tamaño son consideradas un alimento de mala calidad<sup>58-60</sup> porque su tamaño dificulta el transporte a través del lumen de la faringe. *E. coli* OP50 y *E. coli* HT115 son dos cepas bacterianas altamente utilizadas en el laboratorio. Estas difieren en la cantidad y composición de nutrientes<sup>61</sup>. Si bien presentan el mismo tamaño, *E. coli* OP50 forma agregados en cultivo líquido<sup>38</sup>. Esto ocasiona que al alimentarse los gusanos deban lidiar con el transporte de “grumos” de bacterias en lugar de células aisladas (véase Figura 16); lo cual resulta en una menor capacidad de digestión y por tanto en una menor tasa de crecimiento de los gusanos. De esta manera, *E. coli* OP50 es una cepa de menor calidad que *E. coli* HT115. Esta última causa una mayor tasa de crecimiento en *C. elegans*.



**Figura 16: Representación de la faringe del gusano y el transporte de bacterias.** *E. coli* OP50 forma agregados de bacterias que son transportados como “grupos” por la faringe; esto genera un transporte dificultoso e influye en el disgregado y triturado de las bacterias, así como en la cantidad de nutrientes disponibles. *E. coli* HT115 no forma agregados; es transportada como unidades por la faringe. El triturado de las bacterias es más sencillo, permitiendo mayor disponibilidad de nutrientes que respaldan una mayor tasa de crecimiento del nematodo. Esta última cepa es un alimento de mejor calidad. Imagen creada en BioRender.

### **Herramientas genéticas**

A lo largo de casi seis décadas de investigación con *C. elegans*, se han desarrollado diversas herramientas que, combinadas con la simplicidad de este modelo, permiten explorar aspectos

fundamentales de la biología. A partir de la comparación entre la proteómica del gusano y el genoma humano, se ha identificado que aproximadamente el 83 % de los genes son homólogos<sup>62</sup>. Además, se ha observado que entre el 60 % y el 80 % de los genes humanos tienen homólogos en *C. elegans*<sup>63</sup>.

También, existe un amplio conjunto de herramientas bioinformáticas, dentro del cual se destacan bases de datos como Wormbase, CenGen y WormAtlas, que proporcionan información detallada sobre los productos génicos y el conectoma del gusano<sup>64</sup>. Asimismo, abunda la literatura disponible en fuentes como WormBook y *C. elegans* II.

Una de las principales ventajas de *C. elegans* como modelo es su fácil mantenimiento en el laboratorio. El gusano requiere solo humedad, oxígeno y bacterias como alimento, y puede mantenerse tanto en medios líquidos como sólidos, siendo este último el más comúnmente utilizado. Su tamaño permite manejar cientos de individuos en una sola placa de Petri, y su viabilidad no se ve afectada por la congelación en nitrógeno líquido y su posterior recuperación.

En los últimos años, se han adaptado al estudio de *C. elegans* una diversidad de herramientas que abarcan desde la citometría de flujo con sorting (*fluorescence activated cell sorting*; FACS, por sus siglas en inglés) hasta microarrays para análisis transcriptómicos, tecnologías de imagen como la microscopía confocal, técnicas de transgénesis e inactivación génica específica de tejidos<sup>36,65</sup> y análisis con microfluídica. El tamaño y la transparencia de *C. elegans* lo vuelve ideal para este gran número de técnicas<sup>66-68</sup>.

Sumado a esto, es fácil de manipular genéticamente, lo que ha dado lugar a la generación de numerosas cepas mutantes en genes específicos y cepas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes como GFP (proteína verde fluorescente) y Cherry (proteína rojo fluorescente). Estas cepas están disponibles en el *Caenorhabditis elegans* Genetic Center (CGC), uno de los principales repositorios de líneas de nematodos, y también pueden generarse en el laboratorio si no están disponibles en el CGC.

Una técnica estándar para investigar las funciones e interacciones génicas en *C. elegans* es la interferencia por ARN (ARNi<sup>69</sup>) que produce la reducción de los niveles de un determinado ARN mensajero. Esta es una de las técnicas más empleadas en *C. elegans*. Existen tres métodos para realizarlo:

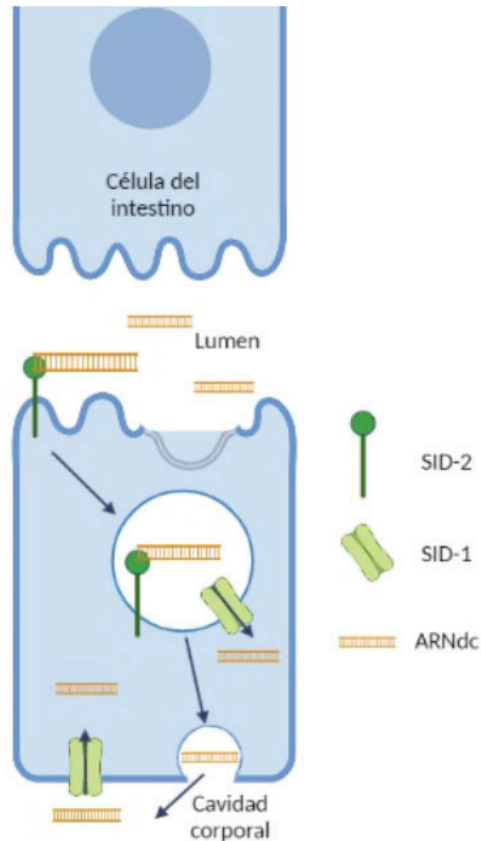
1. *Inmersión*. Los gusanos son sumergidos en una solución conteniendo el ARN doble cadena (ARNdc). Si bien este método permite tratar una gran cantidad de gusanos a la vez, también requiere una cantidad considerable de ARNi<sup>70</sup>.

2. *Microinyección*. De manera *in vitro*, se sintetiza el ARNdc y se inyecta en las gónadas o en el intestino de hermafroditas jóvenes. Si bien este método es excesivamente laborioso, logra buenos resultados<sup>71</sup>.

3. *Alimentación*. Se alimentan los gusanos con bacterias *E. coli* que expresan el ARNdc que permite la interferencia de un gen específico. Esta es la estrategia más simple. Sin embargo, es el método menos confiable debido a la heterogeneidad en la alimentación de los gusanos. Las principales ventajas de esta metodología son el bajo costo y la capacidad de interferir cientos de gusanos a la vez. El método puede aplicarse en medio sólido o líquido y en cualquier etapa del desarrollo del gusano<sup>72</sup>.

Para inducir la interferencia de un gen específico se encuentra disponible una colección de 11.000 clones de los ORF (del inglés *open reading frames*, marcos abiertos de lectura) de *C. elegans*<sup>73</sup> que se pueden adquirir comercialmente. Estos ORF están clonados en el vector L4440 y han sido introducidos en cepas particulares de *E. coli* (cepa HT115). Estas bacterias expresan directamente el ARNi y pueden utilizarse para alimentar a los gusanos, para purificar los plásmidos y para realizar la síntesis *in vitro* de los ARNdc para usarlos en las técnicas de microinyección y/o inmersión.

En el caso de la técnica de alimentación con *E. coli*, al ser ingeridas las bacterias son disgregadas por el triturador y el debris es impulsado hacia el intestino. Una vez que el ARNdc liberado alcanza el intestino, el silenciamiento de los genes depende de proteínas localizadas en las células intestinales del gusano: SID-1 y SID-2<sup>74</sup> (véase Figura I7). Estas proteínas permiten el transporte de los ARNdc desde el lumen intestinal hacia el resto de las células del cuerpo del gusano, generando un efecto sistémico de silenciamiento. SID-2 permite la internalización del ARNdc desde el lumen por endocitosis y SID-1 actúa como un transportador pasivo que permite la diseminación al resto de las células del cuerpo para generar un efecto sistémico de silenciamiento. Mientras SID-1 se encuentra en todas las células no neuronales del gusano, SID-2 se expresa únicamente en la cara apical de las células intestinales. Debido a la ubicación desigual, se estima que SID-2 sólo participa en la toma del ARNdc ambiental mientras que la propagación y el efecto sistémico de silenciamiento estarían a cargo de SID-1.



**Figura 17: Esquema de una célula intestinal de *C. elegans* y del silenciamiento génico por ingestión de ARNdc (en color naranja). El ARNdc es introducido en las células mediante los transportadores SID-1 y SID-2 (en color verde) para luego ser transportado al resto de los tejidos. Adaptado de Mcewan (Figura realizada con Biorender de la tesis doctoral de Eliana Fernández)<sup>75,76</sup>.**

Cuando se usa la técnica de ARNi debe elegirse cuidadosamente la cepa de gusanos en la que se harán los experimentos ya que difieren en su sensibilidad a la interferencia. Por esto es preferible usar cepas sensibilizadas, por ejemplo con mutaciones en ARNasas como *eri-1*<sup>77</sup>, con mayores niveles de transportadores SID-1 y SID-2 o que sean *knock-out* para mediadores negativos del ARNi como *rrf-3*<sup>78</sup>. En este trabajo se usó la cepa *rrf-3*, aportada por el laboratorio de Parasitología y Veterinaria de la Universidad de Glasgow, Escocia (ver Materiales y Métodos).

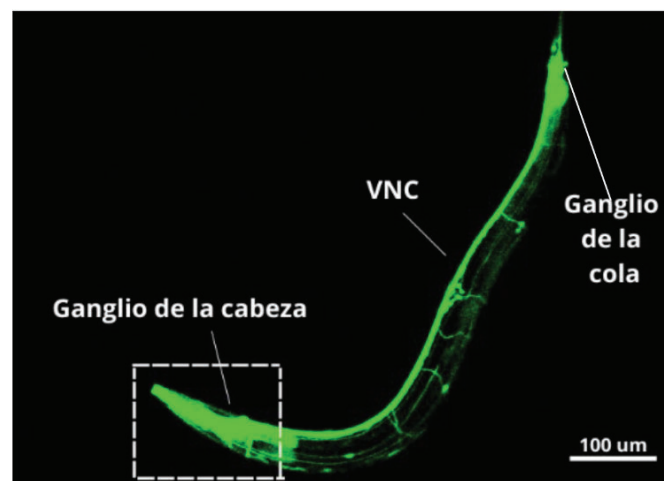
### ***El sistema nervioso***

Aunque los gusanos parecen demasiado simples para imitar la cognición humana, tienen una tentadora combinación de simplicidad y complejidad. Los circuitos neuronales de *C. elegans* están bien establecidos y la plasticidad resultante es sorprendentemente compleja<sup>26,79</sup>. Esto lo convierte en un modelo atractivo para explicar el comportamiento animal, incluido el humano. Como los gusanos son

altamente susceptibles a la manipulación genética, son útiles para identificar genes y vías claves para el funcionamiento y la conectividad neuronal<sup>26,79</sup>. Además, como ya se dijo, *C. elegans* es transparente, lo que permite la visualización de neuronas en el organismo completo y vivo.

*C. elegans* presenta un sistema nervioso relativamente simple, caracterizado por la uniformidad morfológica y posicional de sus neuronas entre individuos<sup>64</sup>. Los hermafroditas poseen un total de 302 neuronas (vs. 100.000 millones en humanos), alrededor de 7600 sinapsis y 56 células de glía<sup>26,79</sup>. La comunicación neuronal en *C. elegans* involucra diversos neurotransmisores, incluyendo acetilcolina, serotonina, dopamina, GABA y glutamato<sup>80-82</sup>.

El sistema nervioso *C. elegans* desempeña un papel fundamental en la detección de señales ambientales y la generación de respuestas adaptativas, como ajustes en la postura de los huevos, la entrada al estadio dauer o la evasión de compuestos nocivos. Este sistema es capaz de percibir una amplia gama de estímulos, incluyendo señales solubles, volátiles, mecánicas, cambios en la temperatura, la osmolaridad, el campo magnético y eléctrico, así como feromonas<sup>83-87</sup>. Las neuronas del sistema nervioso están agrupadas principalmente en ganglios ubicados en la cabeza, la cola y los cordones ventral y dorsal (Figura 18 A).



**Figura 18: Imagen de fluorescencia del sistema nervioso de *C. elegans*.** Todas las neuronas expresan GFP. Se aprecian los ganglios de la cabeza y de la cola junto con el cordón nervioso ventral (VNC). El rectángulo blanco indica la cabeza del gusano. Figura adaptada de Tesis Doctoral de Eliana Fernández<sup>75</sup>.

### **Comportamientos**

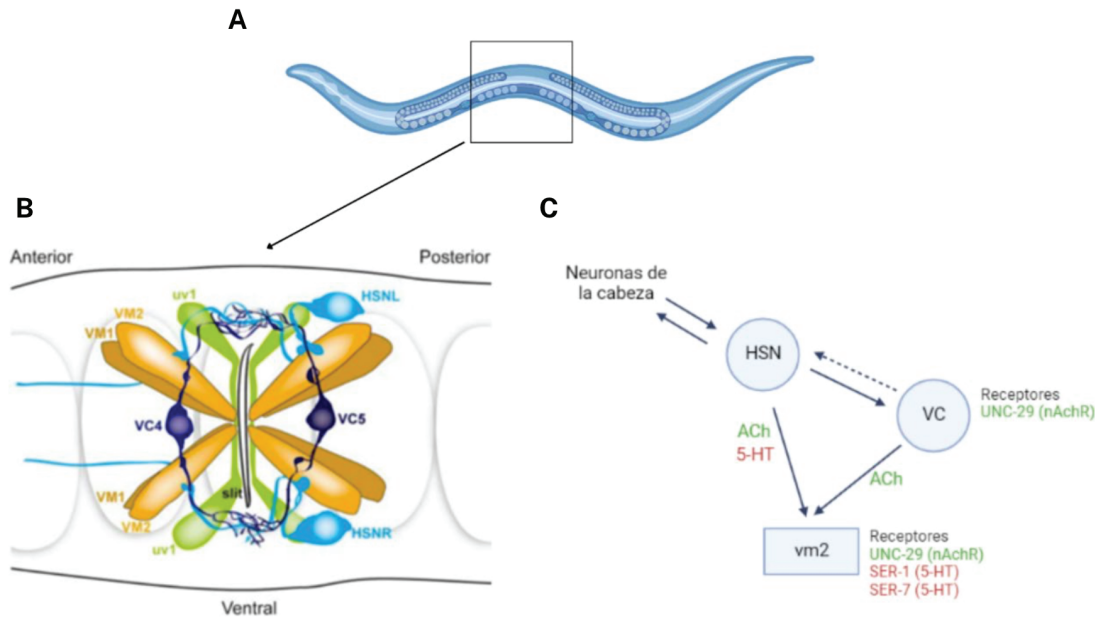
*C. elegans* presenta una variedad de comportamientos motores cuantificables que se pueden utilizar para estudiar los efectos de las distintas manipulaciones, incluido el estrés. Estos comportamientos son predecibles y estereotipados. Para esto, los gusanos integran múltiples señales del entorno con el

estado interno del animal. Esto quiere decir que los comportamientos son plásticos y que dependen de la historia previa del animal.

Algunos de estos comportamientos son la ingesta de alimento, la locomoción, la postura de huevos y los movimientos para el apareo. Además, presenta un segundo tipo de comportamiento no motor que consiste en el pasaje por el estadio larval dauer, que ocurre en respuesta a condiciones ambientales adversas (estrés intenso).

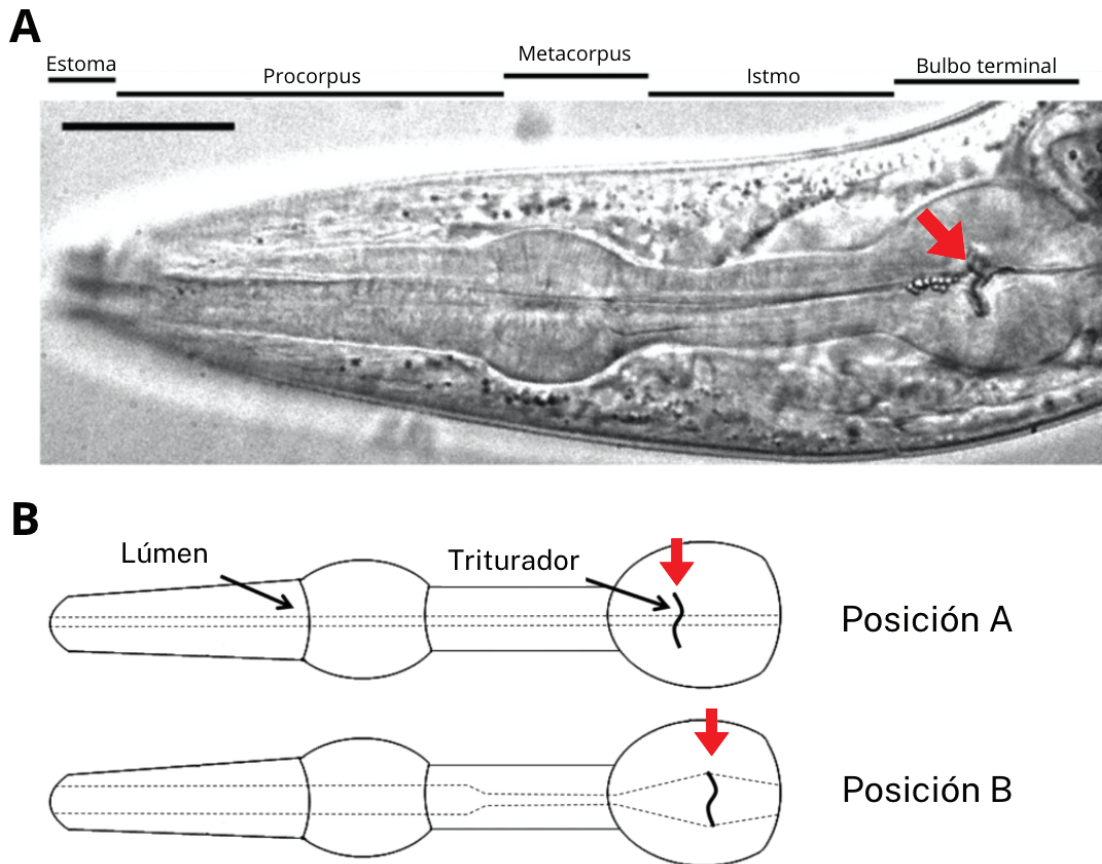
La movilidad constituye otro comportamiento influenciado por la integración de estímulos tanto externos como internos. Se ha observado que los hermafroditas que experimentan privación alimentaria exhiben una menor velocidad de desplazamiento cuando se colocan en placas con alimento en comparación con aquellos que han sido adecuadamente alimentados<sup>86</sup>. Esta conducta asegura que los gusanos no se distancien del área donde se encuentran las bacterias, permitiéndoles así alimentarse adecuadamente.

La ovipuesta también está influenciada por factores ambientales. En principio, la presencia de comida estimula la postura de huevos mientras que la misma se ve inhibida por vibraciones o medios hipertónicos<sup>49,50,89</sup>. El circuito neuronal que controla la postura de huevos implica a las neuronas sensoriales de la cabeza y las neuronas motoras HSN y VC de la vulva y las células musculares vm1 y vm2 del aparato reproductor<sup>64</sup> (Figura I9 A y B). Las neuronas sensoriales de la cabeza detectan condiciones favorables, como una baja densidad de población y la presencia de alimento, estimulando así a las neuronas HSN para promover la postura de huevos (Figura I9 C). Estas neuronas HSN estimulan principalmente, mediante serotonina, a los músculos de la vulva (vm2). Además, las neuronas VC también contribuyen estimulando la contracción de las vm2 mediante acetilcolina. La contracción de las células vm y del útero facilita la liberación de los huevos al medio externo.



**Figura 19: Esquema de las células involucradas en la postura de huevos. A) Ilustración de una hermafrodita de *C. elegans*. El recuadro negro indica la región donde se encuentra la vulva y las células involucradas en la postura de huevos. B) Esquemización de la apertura de la vulva (slit), las células musculares (vm1 y vm2), las neuronas VC y HSN. C) Se esquematiza la coordinación entre las neuronas ámfidias de la cabeza del gusano, las neuronas del aparato reproductor como las HSN y VC y los músculos de la vulva (vm2). En verde se resalta el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y sus receptores mientras que en rojo se señala a la serotonina (5-HT) y sus receptores. Los círculos indican a las neuronas y el rectángulo a las células musculares. Figura tomada de Tesis Doctoral de Eliana Fernández<sup>75</sup>.**

El bombeo de la faringe también es un comportamiento cuantificable de *C. elegans*. Se encuentra regulado por múltiples factores, entre ellos la presencia de comida y el tratamiento con serotonina<sup>49,90,91</sup>. Para cuantificar este comportamiento, se evalúa la frecuencia de bombeo. Para esto se analiza el movimiento del triturador (flechas rojas en la figura I10). El triturador se ve como un punto negro dentro del bulbo terminal de la faringe. En un principio, el triturador se encuentra en su configuración relajada (posición A, Figura I10 B). Cuando se contrae, se observa que el punto negro (triturador) se mueve en dirección al intestino (posición B, Figura I10 B), para regresar luego a su posición original durante la relajación y peristalsis. Este movimiento puede observarse al mirar los gusanos al microscopio. Por lo tanto, el mismo puede contabilizarse para analizar el comportamiento de frecuencia de bombeo.



**Figura I10: Faringe de *C. elegans*.** (A) Imágen DIC (diferencial de contraste de interferencia) de la faringe de un individuo hermafrodita adulto de *C. elegans* (campo de visión 177 mm x 57 mm), extraída de Brenner et al. (2022)<sup>92</sup> y editada (B) Interpretación gráfica de la faringe, extraída de Trojanowski et al. (2016)<sup>93</sup> y editada. La posición A corresponde a la faringe en relajación. La posición B corresponde a la faringe en contracción. Flechas rojas: triturador, porción de la faringe.

### ***La respuesta al estrés en *C. elegans****

Como se ha señalado anteriormente, todos los organismos vivos, incluido *C. elegans*, necesitan mantener su homeostasis. Ante una amenaza a esta estabilidad, *C. elegans* activa un programa de respuesta al estrés. Es importante aclarar que las vías moleculares implicadas en estas respuestas están preservadas en mamíferos, según indican estudios pasados<sup>94-97</sup>.

Las respuestas a situaciones de estrés térmico, oxidativo y osmótico han sido extensamente investigadas en *C. elegans*. Varios de los componentes involucrados en estas respuestas están relacionados con enfermedades humanas, incluyendo algunas de carácter neurodegenerativo como el Parkinson o la esclerosis amiotrófica lateral<sup>98</sup>. El alto grado de conservación genética y en las vías



moleculares confiere a *C. elegans* un papel adecuado como modelo para la investigación del estrés crónico.

### Respuesta al estrés térmico

En respuesta a condiciones de temperatura elevada, los organismos activan una serie de mecanismos adaptativos conocidos como la respuesta al estrés térmico<sup>99</sup> (*heat shock response*; HSR por sus siglas en inglés). Esta respuesta es compartida por diversas especies, desde invertebrados como *C. elegans* hasta mamíferos<sup>100-102</sup>. La elevación de la temperatura induce la activación del factor de transcripción HSF-1 (*heat shock factor 1*), el cual está altamente conservado en la evolución<sup>103,104</sup>. HSF-1 se transloca al núcleo celular, donde promueve la expresión de las conocidas proteínas de respuesta al estrés térmico, o HSP (*heat shock proteins*). Estas proteínas actúan como chaperonas y son responsables de mantener la estabilidad proteica y mitigar el daño celular inducido por el estrés térmico<sup>102,105</sup>. Además de HSF-1, otro factor de transcripción relevante en este proceso es DAF-16, un homólogo de FOXO, que también puede regular la expresión de HSPs<sup>106</sup>. Este hallazgo establece una conexión entre la vía de señalización de insulina y la respuesta al estrés térmico, subrayando la complejidad y redundancia de los mecanismos moleculares involucrados en esta respuesta adaptativa<sup>107</sup>.

Dentro de los comportamientos observables que conforman la respuesta al estrés térmico se encuentran<sup>108-111</sup>: la producción de señales de estrés volátiles, la inhibición de la reproducción, aumento de la expectativa de vida, reducción de la fecundidad, entre otros.

### ***C. elegans y las enfermedades neuropsiquiátricas***

Las enfermedades psiquiátricas son trastornos conductuales multidimensionales que afectan al órgano más complejo del ser humano: el cerebro. Estas enfermedades se caracterizan por su complejidad y heterogeneidad, así como su dificultad para ser vinculadas con genes específicos<sup>112-115</sup>. Las contribuciones genéticas a la patogénesis de la esquizofrenia, el trastorno depresivo mayor (TDM), el trastorno bipolar y otras condiciones mentales son significativas<sup>113</sup>. No obstante, variantes génicas en un único gen no pueden explicar la totalidad de los síntomas que caracterizan cada uno de estos trastornos y lo que se observa en los pacientes son variación en múltiples genes que contribuyen a los síntomas que presentan. Asimismo, la intrincada naturaleza del cerebro ha dificultado los intentos de entender a un nivel molecular cómo los factores genéticos y ambientales desencadenan enfermedades.

La notable conservación en *C. elegans* de genes asociados con un mayor riesgo de enfermedad mental refuerza la relevancia de este sistema modelo para la investigación neuropsiquiátrica<sup>116</sup>. El empleo de *C. elegans* como organismo modelo para estudiar enfermedades humanas ha sido una práctica establecida durante años. Diversas afecciones, como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas

como el Alzheimer y el Parkinson, así como patologías relacionadas con las mitocondrias, se han modelado exitosamente en este nematodo<sup>117-122</sup>.

Los síntomas de la depresión mayor, como la anhedonia y la apatía<sup>123,124</sup>, también se han asociado a ciertos comportamientos de *C. elegans*. Los gusanos con mutaciones sensibles a la temperatura en la vía IIS (vía de la insulina) y las mutaciones en la syntaxina, proteína reguladora de la liberación de neuropéptidos, exhiben un comportamiento similar a la anhedonia en condiciones de privación de alimentos y baja concentración de DMSO<sup>125</sup>; los gusanos permanecen inmóviles y al ser expuestos a comida no se acercan a ella y mueren de inanición. Este comportamiento es reversible con antidepresivos, lo que sugiere su similitud con la anhedonia humana<sup>125</sup>. Además, se ha observado que los pacientes con diabetes tienen una mayor prevalencia de depresión, que incluye síntomas como anhedonia y apatía, lo que destaca la conexión entre ambas enfermedades<sup>126</sup> y explica por qué mutaciones en componentes de la vía de la insulina producen ese fenotipo en los gusanos<sup>127</sup>.

En resumen, *C. elegans* ofrece una plataforma valiosa para el estudio y la identificación de genes relacionados con enfermedades neuropsiquiátricas, así como para el descubrimiento de nuevas terapias antidepresivas<sup>128,129</sup>.

Como mencionamos anteriormente, recientemente se comenzó a dilucidar el componente genético de los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) en humanos. Para ello se encontraron una serie de genes asociados con cambios en la conducta alimentaria<sup>31</sup>. A su vez, estos genes presentan una estrecha relación con genes asociados con enfermedades psiquiátricas<sup>27</sup>. Sumado a esto, se encontraron ortólogos en *C. elegans* de genes relacionados con TCA como: *ser-1*<sup>130</sup>, *nhr-35*<sup>131</sup> y *npr-39*<sup>132,133</sup>. A través de su intrincada red neuronal, el nematodo puede manifestar síntomas de aversión a los alimentos<sup>117</sup>. Por ejemplo, estudios utilizando fármacos antipsicóticos que causan aumento de peso en humanos indujeron acumulación de lípidos en *C. elegans*, lo que sugiere que las vías metabólicas que estos medicamentos pueden afectar están conservadas, lo que es útil para el modelado de algunos aspectos de desordenes mentales en los gusanos<sup>134</sup>. Además, se han evaluado medicamentos conocidos por inducir anorexia (pérdida de apetito) en seres humanos para determinar su efecto sobre la búsqueda de alimento en *C. elegans*. Se ha observado que el topiramato, la acetazolamida y la furazolidona causan anorexia como efecto secundario, disminuyendo significativamente el comportamiento de búsqueda de alimento<sup>113</sup>. En contraste, la ciproheptadina, que se utiliza como estimulante del apetito<sup>135</sup>, y la olanzapina, conocida por causar aumento de peso en pacientes<sup>136</sup>, aumentan la búsqueda de alimento en *C. elegans*. Esto lo convierte en un modelo convincente para estudiar trastornos de la conducta alimentaria.

## ABORDAJE EXPERIMENTAL

El estudio de los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) es de vital importancia debido a su impacto significativo en la salud física y mental de las personas. A su vez, como mencionamos con anterioridad, el estrés durante el desarrollo aumenta la susceptibilidad a los TCA. Asimismo, estos trastornos presentan una mayor prevalencia en mujeres. A pesar de décadas de investigación, aún existe una comprensión limitada de las causas subyacentes y una falta de método de prevención y tratamientos efectivos y duraderos. La escasez de terapias exitosas y la creciente incidencia de estos trastornos en todo el mundo resaltan la urgencia de comprender sus mecanismos y desarrollar intervenciones más precisas y efectivas.

Por esta razón, planteamos el uso del nematodo *C. elegans* como modelo en el estudio de TCA. En primer lugar, el genoma de *C. elegans* está completamente secuenciado, lo que permite una manipulación genética precisa para investigar los mecanismos subyacentes a estos trastornos. Además, su sistema nervioso simple pero conservado ofrece la oportunidad de comprender los circuitos neuronales y las vías metabólicas involucradas en la regulación de la alimentación. Asimismo, la transparencia de *C. elegans* facilita la observación directa de los procesos fisiológicos internos, como la ingesta y la digestión de alimentos. En conjunto, estas características hacen de *C. elegans* un modelo valioso y complementario para abordar la complejidad de los trastornos alimentarios y para explorar nuevas estrategias terapéuticas.

A pesar de que el uso de *C. elegans* como modelo experimental tiene el potencial de descubrir los mecanismos que provocan cambios en los niveles de ingesta de alimentos, hasta ahora no se han establecido modelos intergeneracionales para estudiar estos trastornos. Esto implica que aún no se ha dilucidado completamente cómo los efectos del estrés o la dieta en una generación pueden influir en las generaciones futuras en términos de comportamiento alimentario. Este proyecto representa el inicio del desarrollo de modelos de TCA en gusanos.

Para comprender las alteraciones en la conducta alimentaria y su relación con el estrés durante el desarrollo en *C. elegans*, proponemos analizar la ingesta luego de distintas manipulaciones. Para ello, una alternativa es modular la ingesta perturbando a los gusanos durante el desarrollo con diferentes protocolos de estrés para observar la consecuencia en la conducta alimentaria. Otra alternativa es modular los efectos de la dieta mediante el uso de alimentos de distinta calidad y la suplementación con moléculas que podrían regular a nivel epigenético la conducta alimentaria. Usando gusanos *wild type*, en este proyecto se propuso evaluar los efectos del estrés y la dieta sobre la ingesta y se plantea como la puesta a punto de un modelo de trastornos de la conducta alimentaria en invertebrados, de los cuales existen pocas evidencias<sup>79</sup>.

## CAPÍTULO II

### *Hipótesis y Objetivos*

## HIPÓTESIS

El estrés aplicado a la madre puede modificar la conducta alimentaria de la descendencia que está en desarrollo in utero. A su vez, la respuesta al estrés de un individuo varía según diferentes dietas y suplementaciones proporcionadas a la madre. La suplementación de la dieta puede contribuir a mejorar la respuesta de los gusanos al estrés si esta se ve afectada.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo general***

Modelar trastornos de la conducta alimentaria en *C. elegans*. Analizar el efecto del estrés sobre la conducta alimentaria en *C. elegans*. Investigaremos patrones alimentarios bajo estrés, con diferentes dietas y su relación con el desarrollo del organismo.

### ***Objetivos específicos***

Objetivo 1: Estandarizar herramientas para evaluar la ingesta en *C. elegans*.

Objetivo 2: Evaluar el efecto del estrés durante el desarrollo sobre la conducta alimentaria.

Objetivo 3: Evaluar el efecto conjunto del estrés y diferentes dietas (a y b) proporcionadas durante el desarrollo sobre la conducta alimentaria:

- A. Dieta de baja y alta calidad nutricional (diferentes cepas bacterianas).
- B. Suplementación con moléculas involucradas en la generación de grupos metilo: vitamina B12, ácido fólico y metionina.

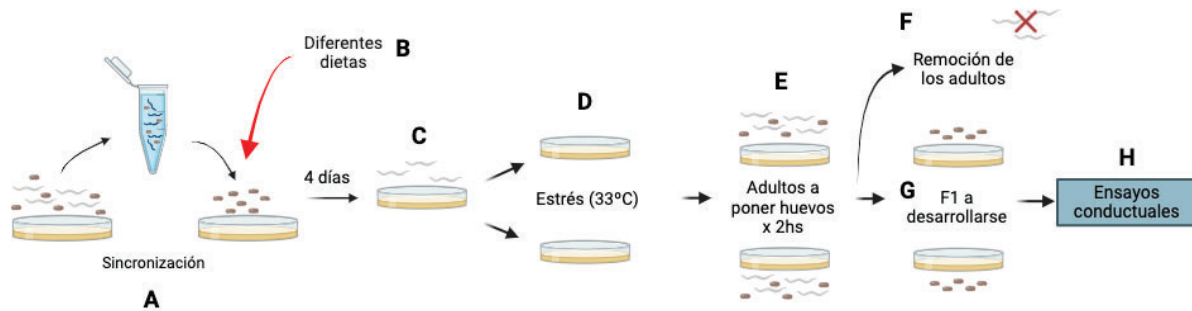
## CAPÍTULO III

### *Resultados*

El principal síntoma de trastornos de la conducta alimentaria (TCA) en humanos es una relación aberrante con la comida y variaciones en la ingesta. Para establecer al nematodo *C. elegans* como un modelo de TCA en invertebrados, primero debimos poner a punto herramientas que nos permitieran analizar la ingesta de los gusanos. Esta medida proporcionará información crucial sobre cómo los factores ambientales, como el estrés y diferentes dietas, pueden modular la ingesta de alimentos y, por ende, influir en la salud y el bienestar de estos organismos modelo.

A diferencia de los mamíferos, la cuantificación directa y precisa de la ingesta alimentaria en gusanos no es viable. Para solucionar este problema, buscamos poner a punto tres técnicas que significan aproximaciones de la ingesta diferentes. Por un lado, en el laboratorio ya estaba estandarizada la medición de la frecuencia de bombeo faríngeo en los gusanos. Propusimos esta medición como primera aproximación de ingesta. La experimentación fue realizada por la Dra. Eliana Fernandez, quien proporcionó los datos crudos para realizar el análisis en este trabajo. Luego, pusimos a punto dos métodos nuevos: la medición de fluorescencia intestinal con bacterias fluorescentes y la medición del contenido lipídico.

A su vez, para modular la ingesta en *C. elegans*, hemos optado por implementar un protocolo de estrés con el fin de analizar su efecto. Entre los diversos tipos de estrés empleados en estudios previos en nuestro laboratorio, hemos seleccionado el estrés térmico por su naturaleza física, que no presenta químicos que puedan interferir a nivel molecular. Sumado a esto, hemos emprendido la tarea de modular la ingesta en los gusanos mediante la administración de diferentes dietas. El abordaje experimental completo se encuentra esquematizado en la Figura 1. Cabe destacar que estos enfoques no habían sido empleados previamente en nuestro laboratorio, dado que el interrogante de medir la ingesta es una novedad en nuestra investigación.



**Figura 1: Esquema del abordaje experimental.** A) Sincronización de la población para obtener huevos. B) Administración de diferentes dietas. C) Desarrollo de los huevos por 4 días hasta llegar a estadio adulto. D) Separación en dos grupos: control y estrés (exposición de 1hr a 33 °C) E) 2 horas de postura de huevos. F) Remoción de los adultos. G) Desarrollo de los huevos resultantes, por 4 días hasta etapa adulta. H) Realización de ensayos conductuales. Imagen creada en Biorender.

### ¿El estrés térmico afecta el comportamiento de los gusanos?

Nuestro primer interrogante fue determinar si el estrés agudo aplicado a los gusanos generaba algún efecto sobre el comportamiento. Lo primero que observamos fue una reducción de la locomoción (datos no mostrados). Esto fue un primer indicio del efecto del estrés sobre los parentales. Si bien nuestros individuos objetivo fueron aquellos expuestos al estrés durante el desarrollo embrionario, evaluamos como primera medida el estrés sobre sus parentales analizando dos comportamientos: ingesta (contenido lipídico) y ovipuesta.

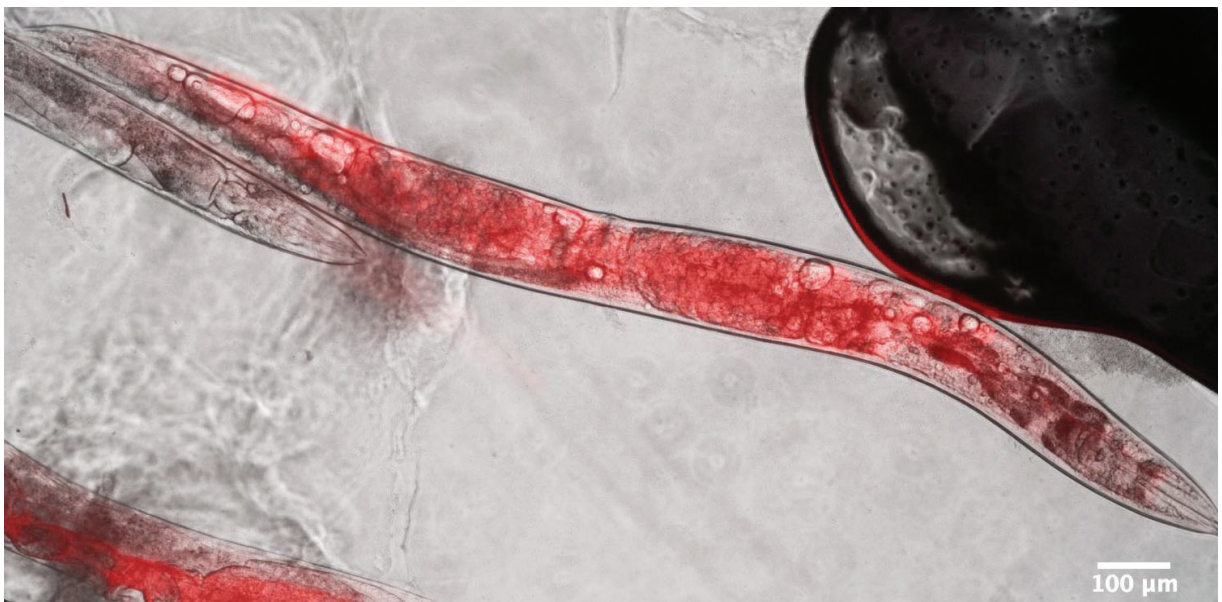
Como una aproximación para la medición de la ingesta, buscamos analizar el contenido lipídico de los gusanos. Para ello, se puso a punto el protocolo de tinción con Nile Red, que tiñe lípidos neutros como triglicéridos o ésteres de colesterol, en gusanos vivos<sup>137</sup>.

Para realizar la tinción con Nile Red, huevos sincronizados se depositaron en una placa conteniendo OP50 como alimento mezclado con Nile Red y se permitió su desarrollo. Pasados 4 días, los gusanos hermafroditas adultos fueron divididos en tres grupos. Uno se lo utilizó como control. Otro se lo expuso a estrés térmico: una hora de exposición a 33 °C de temperatura. Al tercero se lo privó de alimento por 6 horas, para provocarles hambruna a los gusanos (control positivo) ya que la hambruna reduce los depósitos lipídicos<sup>138</sup>. Además, se colectaron gusanos adultos jóvenes, progenie de los gusanos control para analizar el contenido lipídico como segundo control positivo. Como en gusanos *C. elegans* el almacenamiento de lípidos en células somáticas va en aumento a medida que se da el desarrollo del individuo, esperamos ver una menor cantidad de lípidos en este grupo de adultos jóvenes comparados con sus parentales con mayor desarrollo. De esta manera, los gusanos de los cuatro grupos resultantes fueron teñidos haciendo uso del colorante Nile Red. Este colorante emite luz

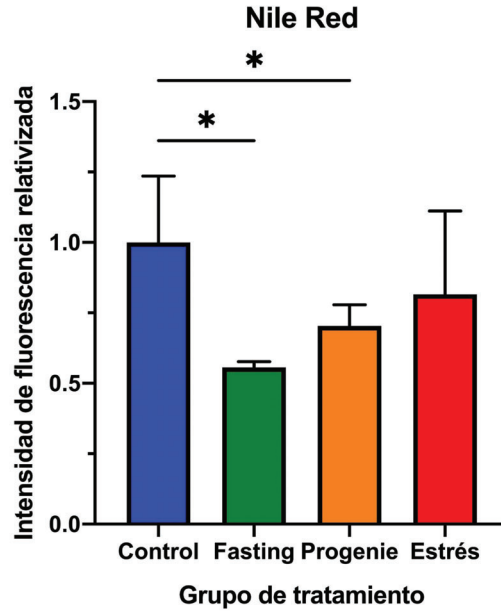


fluorescente roja que es utilizada para la observación y cuantificación de lípidos bajo el microscopio de epifluorescencia. Se tomaron imágenes de campo claro y fluorescencia de cada gusano teñido con esta técnica. En la Figura 2 se observa un ejemplo de un gusano teñido con este colorante. En cada imagen se midió la intensidad de fluorescencia total en el gusano completo como aproximación de la cantidad de contenido lipídico, lo cual ha sido propuesto que correlaciona de manera directamente proporcional con la ingesta.

Los resultados para este análisis se observan en la Figura 3. Existe una disminución de la intensidad de fluorescencia para los gusanos hambreados y la progenie de los gusanos control, con respecto a los gusanos control. Estos resultados indican que la hambruna genera una disminución del contenido lipídico de los gusanos *C. elegans*, sumado a que la cantidad de lípidos totales varía según la etapa de desarrollo. Luego, no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre la intensidad de fluorescencia de los gusanos estresados con respecto al grupo control. Por lo tanto, no podemos confirmar que el estrés tenga o no un efecto sobre el contenido lipídico en *C. elegans*.



**Figura 2:** Gusano hermafrodita adulto con su contenido lipídico teñido con Nile Red. La imagen es una superposición de campo claro y epifluorescencia.

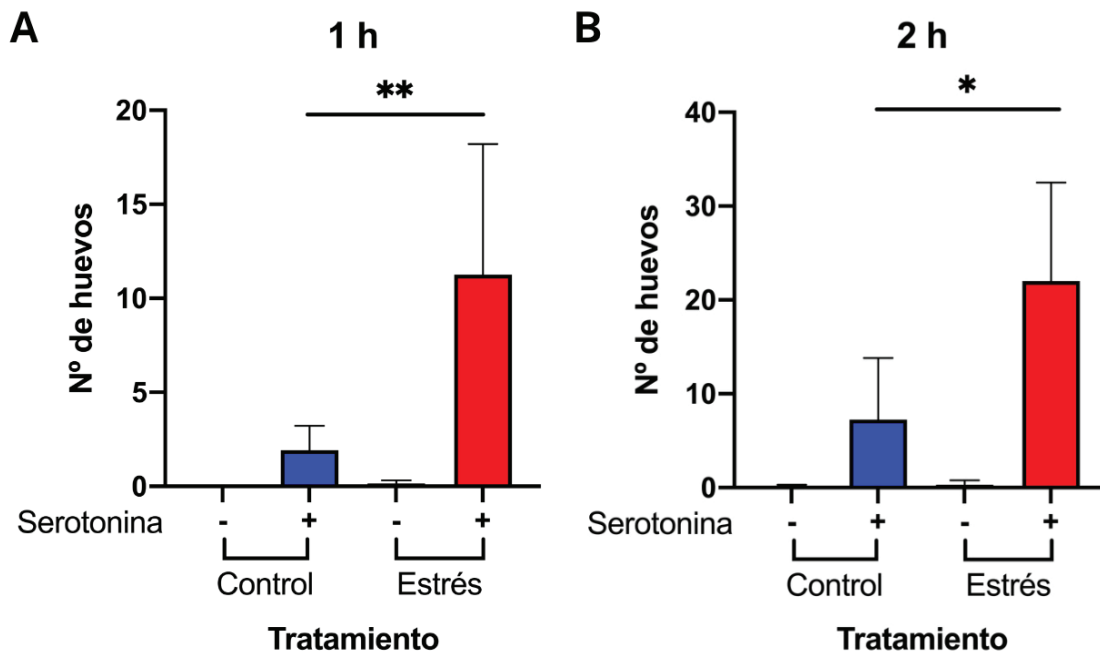


**Figura 3: Efecto del estrés sobre el contenido lipídico.** Resultado para la medición de contenido lipídico en gusanos teñidos con Nile Red. Los grupos de gusanos son parentales control, parentales estresados, parentales hambreados y progenie de los parentales control. Cada barra corresponde a la media intensidad de fluorescencia para 1-6 individuos en cada condición. ANOVA de 1 vía, seguido de test de comparaciones múltiples de Dunnett (\*  $p < 0.05$  vs control).

A continuación, dado que debíamos recolectar huevos para observar los individuos estresados *in utero*, encontramos cualitativamente que los gusanos parentales hermafroditas estresados depositaban menos huevos que los gusanos no estresados, durante las 2 horas en las que se colectaron huevos (paso E en Figura 1). Debido a esto decidimos evaluar los efectos del estrés sobre la ovipuesta estimulada con serotonina de los parentales. La serotonina cumple una función como neurotransmisor y regula diversos comportamientos del gusano, como la ovipuesta, entre otros<sup>139-142</sup>.

Para estudiar este comportamiento, gusanos controles y estresados fueron incubados en medio líquido M9 sin y con serotonina 35 mM. La cantidad de huevos depositados se contabilizó a la hora y a las dos horas y para ambos tiempos se comparó entre los grupos.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Tras 1 hora, los gusanos control depositaron una media de 2 huevos mientras que los gusanos estresados depositaron 11 huevos. Tras 2 horas, los gusanos control depositaron una media de 7 huevos/hora mientras que los gusanos estresados depositaron 22 huevos/hora. En ambos tiempos, los gusanos estresados depositaron una mayor cantidad de huevos que los gusanos control y la diferencia fue estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que el estrés afectó la ovipuesta estimulada con serotonina.



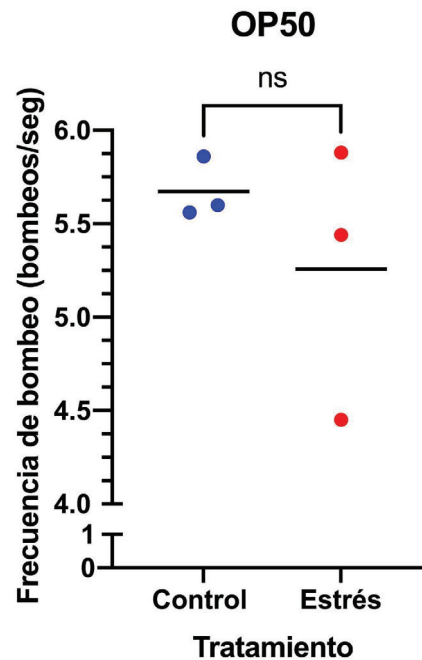
**Figura 4: La deposición de huevos está alterada en los gusanos estresados.** Se graficó la media del número de huevos depositados por los gusanos hermafroditas en medio líquido adicionado (+) o no (-) con serotonina 35 mM en (A) 1 hora o en (B) 2 horas.  $n = 4$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa). Cada placa se midió por triplicado, con un tamaño de muestra de 8 gusanos en cada pocillo. ANOVA de 2 vías: estimulación con serotonina y tratamiento (control vs estrés), seguido de Test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,005$ ) entre los grupos marcados con las barras horizontales.

#### Efecto del estrés sobre la ingesta en *C. elegans*

Para comenzar con el análisis del efecto del estrés durante el desarrollo, se pasó a utilizar nuestros individuos objetivo que fueron aquellos expuestos al estrés durante el desarrollo embrionario. En primer lugar se midió la frecuencia de bombeo faríngeo como un indicador de la ingesta, ya que el cambio en dicha frecuencia podría implicar un cambio en la deglución de alimento, convirtiéndose así en una aproximación para estimar la ingesta.

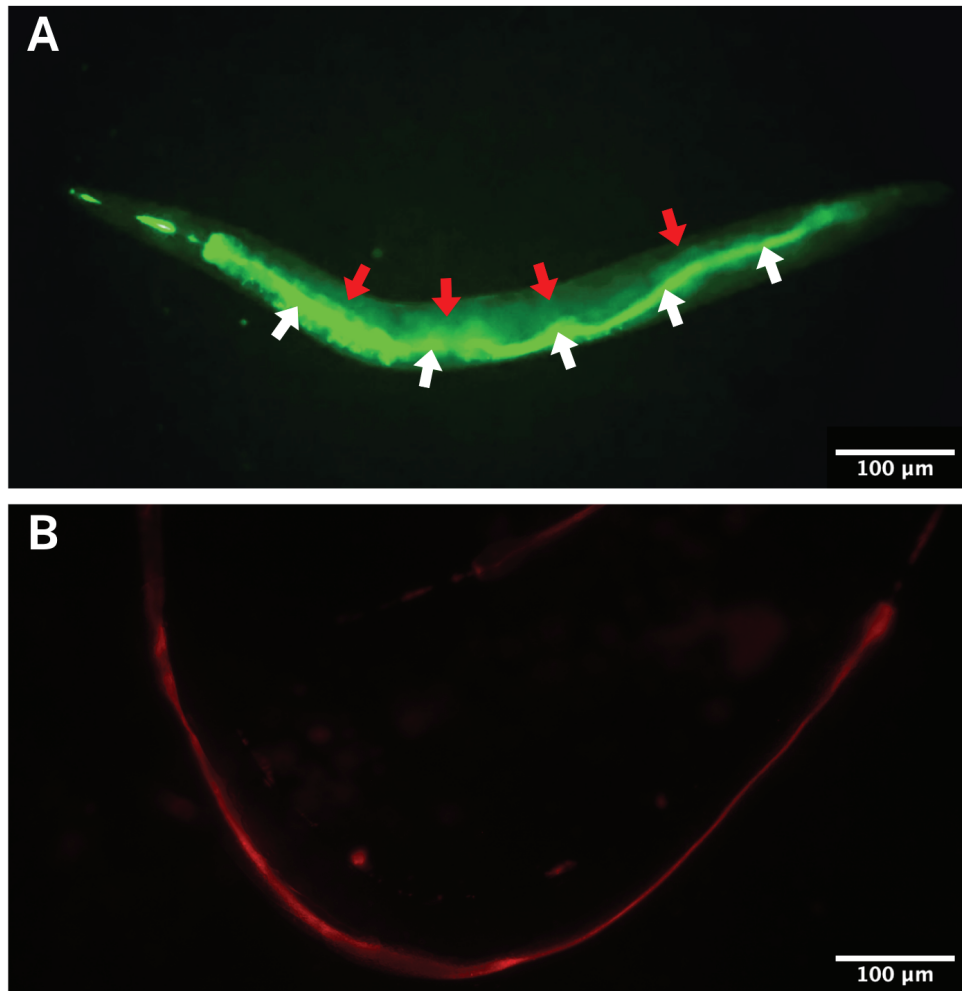
Se obtuvieron videos de individuos de dos grupos: grupo proveniente de parentales estresados y grupo proveniente de parentales control, ambos alimentados con *E. coli* OP50 (ver video suplementario: [https://drive.google.com/file/d/1cHucz3krifaYbjoe0B91L\\_mOBqMFaGDw/view?usp=drive\\_link](https://drive.google.com/file/d/1cHucz3krifaYbjoe0B91L_mOBqMFaGDw/view?usp=drive_link)). A ellos se les midió la frecuencia de bombeo contando la cantidad de veces por segundo que se abre y cierra el triturador.

Los resultados para ambos grupos experimentales (control y estrés) se muestran en la Figura 5. Observamos que la frecuencia media de bombeo fue de alrededor de 5,65 bombeos/seg para el control y 5,20 bombeos/seg para los gusanos estresados. El test estadístico mostró que no hay una diferencia significativa ( $p = 0,7000$ ). Cabe destacar además la marcada dispersión entre los datos de los animales estresados. Ya que no hay diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado, no se puede concluir que el estrés tenga o no un efecto sobre la frecuencia de bombeo faríngeo en *C. elegans*.



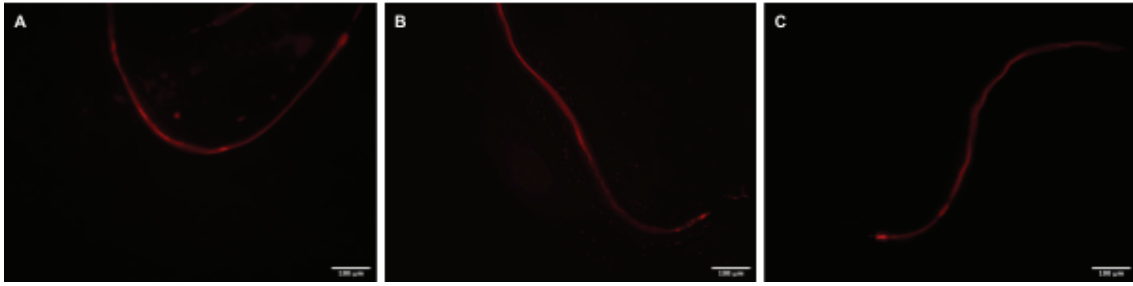
**Figura 5: Frecuencia de bombeo faríngeo para cada grupo analizado.** Cada punto corresponde al promedio de frecuencias de bombeo de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa). Mann Whitney test ( $p = 0.701$ ).

Siguiendo con el objetivo de medir ingesta en *C. elegans*, utilizamos una segunda estrategia. Esta fue la medición de intensidad de fluorescencia intestinal de los gusanos, haciendo uso de bacterias fluorescentes. Se buscó obtener bacterias de la cepa de *E. coli* OP50 que expresaran una proteína fluorescente, para poder cuantificar el contenido intestinal. Se utilizó primero una cepa de bacterias OP50 que expresaban la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein; GFP, por sus siglas en inglés); en la Figura 6 A se muestra una imagen de cómo se observan gusanos alimentados con bacterias OP50-GFP. Se procuró cuantificar la intensidad de fluorescencia en toda la extensión del intestino del individuo (flechas blancas en la Figura 6 A). Sin embargo, esta tarea se vio dificultada por el elevado nivel de autofluorescencia observado en el individuo completo (flechas rojas en la Figura 6 A), por lo cual la experimentación con esta proteína fluorescente fue descartada.



**Figura 6: Imágenes de epifluorescencia de gusanos.** Foto representativa de  $n = 7-15$  individuos. (A) Individuo que ingirió bacterias que expresan GFP. Las flechas blancas indican el intestino del gusano. Las flechas rojas indican autofluorescencia en el gusano. (B) Individuo que ingirió bacterias que expresan *dTomato*.

Se decidió utilizar la cepa de *E. coli* OP50 que expresa la proteína roja fluorescente *dTomato* y el gusano no exhibió autofluorescencia (véase imagen obtenida en Figura 6 B). Se llevó a cabo la puesta a punto del protocolo para la medición de fluorescencia intestinal expuesto en la sección Materiales y Métodos. Durante la puesta a punto, se probaron diferentes tiempos de alimentación (15, 30 y 60 minutos), en los que se permitía a los gusanos alimentarse de un césped de bacterias OP50-*dTomato* (Figura 7, A, B, C). Se observa la porción intestinal de los gusanos en color rojo y que no hay diferencias en la intensidad de color entre los diferentes tiempos de alimentación. Por esto, se decidió utilizar 15 minutos de exposición al césped bacteriano para la futura experimentación porque este tiempo fue suficiente para observar los niveles deseados de tinción intestinal que permita la cuantificación de la intensidad. Esto permitió a su vez disminuir el tiempo total necesario para el experimento.



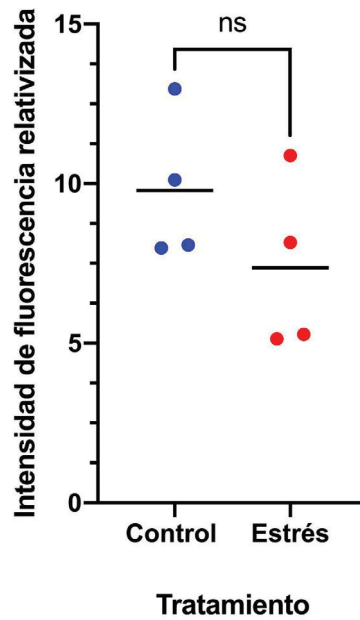
**Figura 7: Imágenes de epifluorescencia de individuos que ingirieron bacterias que expresan dTomato, alimentados por A) 15 minutos, B) 30 minutos y C) 60 minutos. Imágenes representativas de  $n = 7-15$  individuos en cada condición.**

Se procuró cuantificar la intensidad de fluorescencia de la proteína dTomato expresada por las bacterias ingeridas. Ya que la fluorescencia guarda proporción con la cantidad de bacterias presentes en el intestino, se puede utilizar como aproximación para evaluar la ingesta de los individuos.

Se obtuvieron imágenes de epifluorescencia de cada individuo y en ellas se midió la intensidad de fluorescencia mediante una línea que pasa por el medio del gusano, de faringe a ano (línea amarilla en la Figura 8). Los resultados para ambos grupos experimentales (control y estrés) se muestran en la Figura 9. Aunque algunos de los individuos estresados muestran una menor intensidad que los controles, la diferencia entre ambos grupos no es significativa. Por lo tanto, no se puede concluir que el estrés tenga o no un efecto sobre la intensidad de fluorescencia intestinal en *C. elegans*.



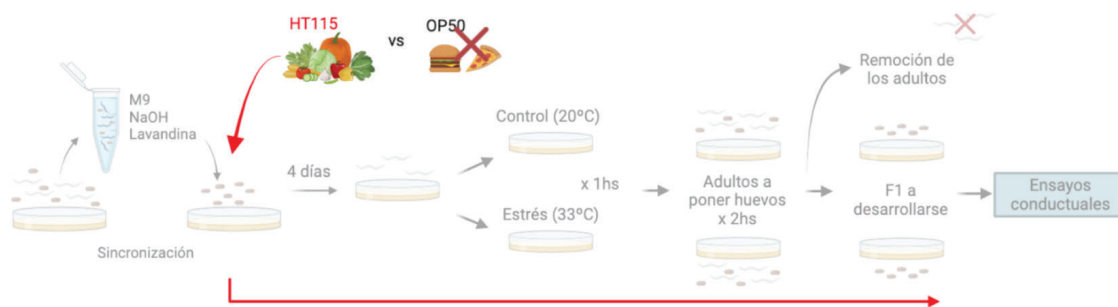
**Figura 8: Imagen representativa de la medición de fluorescencia intestinal.** La imagen es una superposición de una imagen en contraste de fase con una imagen de fluorescencia. La región de interés es la línea amarilla trazada sobre todo el intestino del gusano. En la esquina superior derecha se observa la imagen original de fluorescencia.



**Figura 9: Efecto del estrés sobre la intensidad de fluorescencia intestinal.** Cada punto corresponde al promedio de intensidad de fluorescencia intestinal de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes ( 1 experimento = 1 placa). Mann Whitney test ( $p = 0.490$ ).

Efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta sobre la ingesta en *C. elegans*

Para evaluar el efecto de la calidad de la dieta sobre la ingesta, se utilizaron dos cepas bacterianas que representan diferente calidad de alimento para los gusanos. El detalle sobre la relación entre la calidad de alimento y las cepas utilizadas fue descrito en la introducción. Para recordar, las bacterias *E. coli* HT115 generan una mayor tasa de desarrollo en los gusanos y no forman acúmulos en cultivo, lo cual facilita su ingestión y digestión. Mientras que la cepa OP50 genera menor tasa de desarrollo de los gusanos y presenta acúmulos en cultivo, que dificultan la alimentación. Por ello es que en la experimentación, se hizo uso de bacterias *E. coli* OP50 como cepa de baja calidad y bacterias *E. coli* HT115 como cepa de alta calidad. Como el objetivo fue evaluar el efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta, el cambio de dieta (de OP50 a HT115) lo realizamos previo al tratamiento del estrés (esquemático en la Figura 10). A lo largo de su desarrollo (desde la fertilización, la etapa *in utero* y el desarrollo *ex utero* hasta llegar a la adultez), los gusanos fueron expuestos a cada dieta. Es decir, los gusanos adultos a los cuales se les analiza la ingesta fueron expuestos a estrés (o no, grupo control) y a dietas de diferente calidad durante su desarrollo.

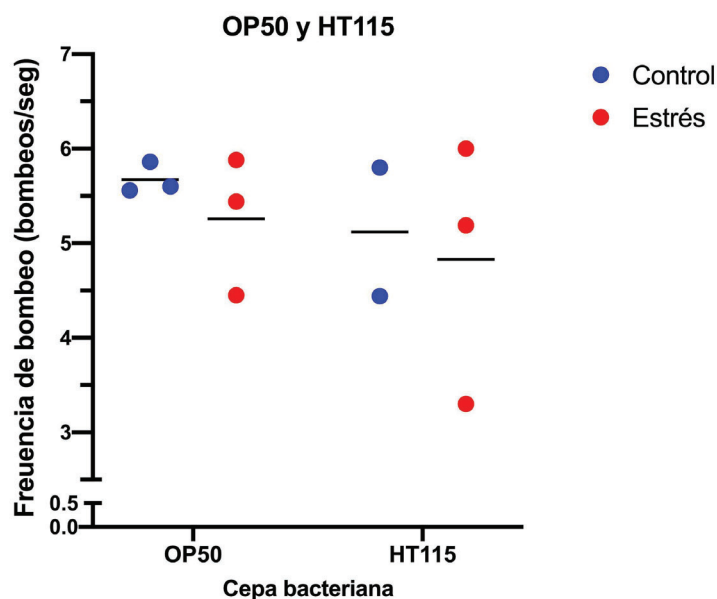


**Figura 10: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.** Se destaca el cambio de cepa bacteriana para el alimentado de los gusanos. Imagen creada en Biorender.

Como primera aproximación de ingesta, se midió la frecuencia de bombeo faríngeo y los resultados se muestran en la Figura 11. En este caso, obtuvimos más dispersión de datos cuando los gusanos fueron alimentados con HT115 que con OP50, y además una de las muestras control no fue posible medirla. Los gusanos control alimentados con HT115 presentaron una media de frecuencia de bombeo de 5,1 bombeos/seg y los gusanos estresados una media de 4,8 bombeos/seg (diferencia no es significativa,  $p > 0,05$ ). Además, no hay diferencia significativa entre las distintas cepas bacterianas. Por lo tanto, no



podemos concluir que el estrés tenga un efecto o no sobre la frecuencia de bombeo cuando los gusanos son alimentados con HT115, ni que la dieta de mejor calidad modifique este comportamiento.



**Figura 11: Efecto del estrés y la calidad de la dieta sobre la frecuencia de bombeo faríngeo.** Cada punto corresponde al promedio de frecuencias de bombeo de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa) por condición. A los efectos de la comparación, los datos de OP50 son los mismos que en la Figura 9. ANOVA de 2 vías: cepa bacteriana (OP50 vs HT115) y tratamiento (control vs estrés) - Test de comparaciones múltiples de Šidák.

Luego, se utilizó la alternativa de aproximación de ingesta mediante fluorescencia intestinal, variando la cepa bacteriana que se utiliza como alimento, como se describió con anterioridad. Sorpresivamente, al momento de tomar imágenes de los gusanos alimentados con HT115 durante su desarrollo, ninguno exhibía fluorescencia. Nótese que para medir fluorescencia, los gusanos son alimentados por 15 minutos con OP50-dTomato. Luego de varias réplicas en las que probamos con cultivos frescos tanto de gusanos como de bacterias, concluimos que se debía al cambio en la dieta generado al momento de suministrarles OP50-dTomato en los gusanos que se desarrollaban adaptados a HT115 como alimento. Este cambio estaría impidiendo la medición, ya que la cantidad de bacterias ingeridas por estos gusanos no eran suficientes para observar la fluorescencia bajo el microscopio.

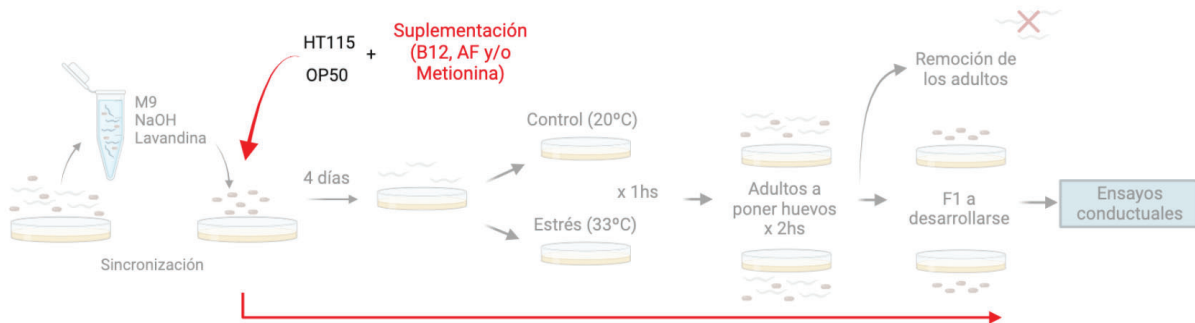
Debido a esto, buscamos transformar las bacterias *E. coli* HT115 con el plásmido conteniendo el gen para la expresión de la proteína dTomato. Probamos obtener bacterias HT115 competentes para su transformación por el método de CaCl y por el método de electrocompetencia, utilizando las bacterias DH5 $\alpha$  como control positivo (estos métodos son utilizados de forma estándar en el laboratorio con estas bacterias). Si bien se obtuvieron bacterias DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido de expresión

dTomato, no logramos obtener bacterias HT115 competentes por lo cual la transformación no fue exitosa. Por lo tanto, no fue posible evaluar el efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta utilizando la fluorescencia intestinal como aproximación de ingesta.

### Efecto conjunto del estrés y la suplementación dietaria sobre la ingesta en *C. elegans*

Para evaluar el efecto conjunto del estrés y la suplementación dietaria sobre la ingesta, se puso a punto un protocolo que incluyó las diferentes cepas bacterianas descritas con anterioridad y la suplementación del alimento con vitaminas y aminoácidos. Las vitaminas utilizadas fueron B12 y ácido fólico (AF) porque ambos son esenciales durante el ciclo “un carbón” para producir metionina<sup>35,143</sup>. Durante este ciclo, el folato transfiere su grupo metilo a la homocisteína para generar metionina, reacción mediada por la acción de la enzima metionina sintasa (Methionine Synthetase; MS, por sus siglas en inglés) y de su coenzima cobalamina (derivada de B12). Posteriormente, la metionina es convertida en S-adenosil metionina (SAM) por la metionina S-adenosiltransferasa (MAT, del inglés Methionine S-AdenosylTransferase) y será utilizado para la metilación de diferentes moléculas dentro de la célula<sup>35</sup>. De este modo, se vería afectada la metilación del ADN, la cual también puede estar regulada por el estrés<sup>3</sup>. Además se incluyó en algunos experimentos metionina porque existe evidencia en humanos y ratones de que variaciones en la disponibilidad de metionina, causadas por diferentes niveles de estrés prenatal, afectan la contribución de nutrientes al ciclo de un solo carbono en la placenta durante el embarazo tanto en ratones como en humanos<sup>31</sup>. Esto a su vez afecta la regulación epigenética durante el desarrollo fetal, llevando a un aumento de la predisposición a enfermedades como diabetes y síndrome metabólico, predominantemente en hembras<sup>31</sup>. Por lo tanto, buscamos analizar si esta respuesta al estrés está conservada en los gusanos *C. elegans*, mediante el agregado de metionina a la dieta.

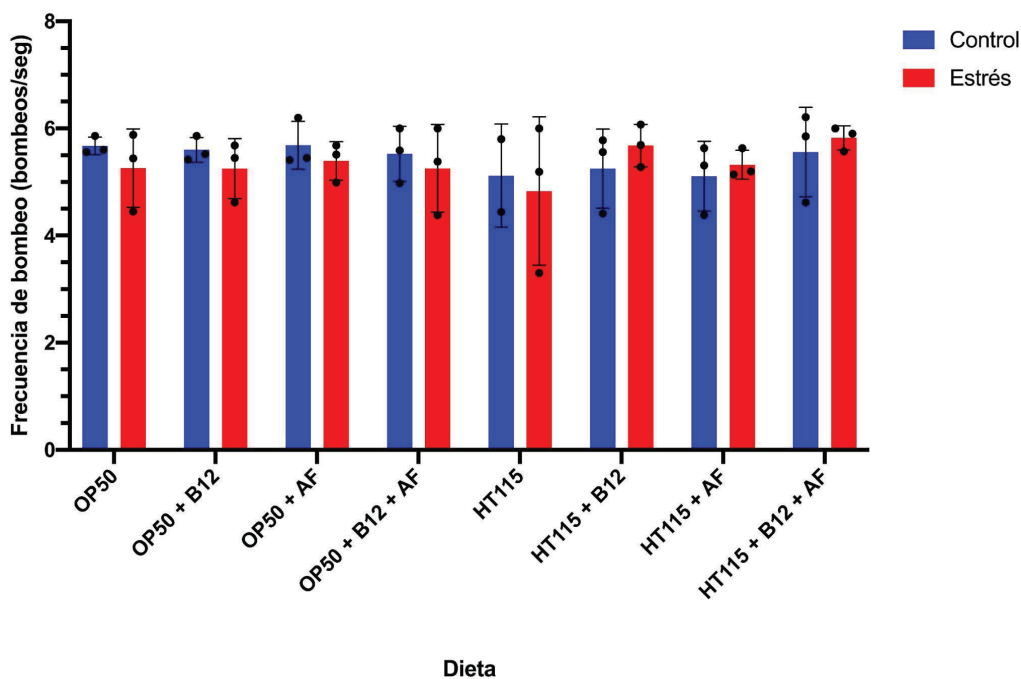
En particular, para analizar cómo el estrés y la suplementación de la dieta afectan la frecuencia de bombeo faríngeo se utilizaron diferentes mezclas de vitaminas agregadas al alimento (esquemático en la Figura 12). Desde la sincronización de los parentales hasta el momento del análisis conductual, los gusanos fueron alimentados con un cultivo de bacterias al cual se lo suplementa con las vitaminas mencionadas.



**Figura 12: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.** Se destaca el momento de la suplementación para el alimentado de los gusanos. Imagen creada en Biorender.

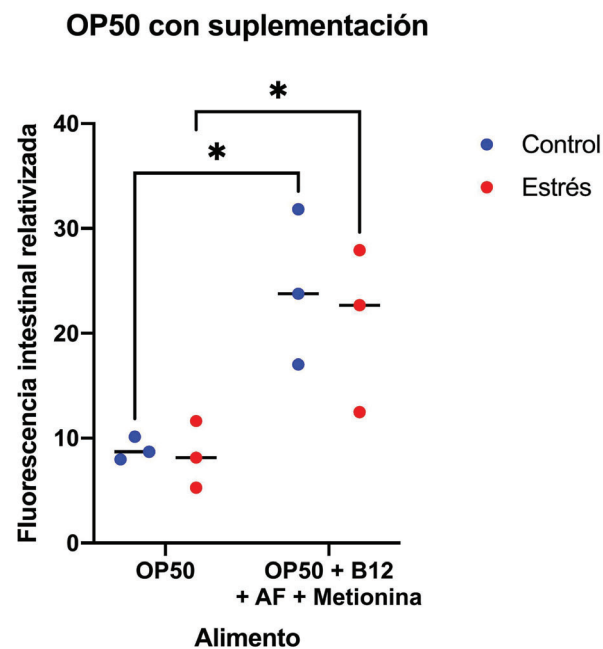
Se obtuvieron videos de individuos de los dos grupos: grupo proveniente de parentales estresados y grupo proveniente de parentales control, sobre los cuales se midió la frecuencia de bombeo faríngeo. Se realizaron comparaciones múltiples, a modo de analizar tanto el efecto del estrés como el efecto de las dietas de diferente calidad nutricional y la suplementación con vitaminas.

Los resultados para el análisis del efecto del estrés y la suplementación con vitaminas sobre la frecuencia de bombeo faríngeo se muestran en la Figura 13. No existen diferencias significativas entre tratamientos (control y estrés), ni entre las diferentes suplementaciones. Por lo tanto, no se puede concluir que el estrés y/o las suplementaciones dietarias tengan o no un efecto sobre la frecuencia de bombeo faríngeo en *C. elegans*.



**Figura 13: Efecto del estrés y la suplementación dietaria sobre la frecuencia de bombeo faríngeo.** Cada punto corresponde al promedio de frecuencias de bombeo de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa) en cada condición. A los efectos de la comparación, los datos de OP50 y HT115 (grupos de tratamiento y control) sin suplementación son los mismos que en la Figura 11. ANOVA de 3 vías seguido de test de comparaciones múltiples de Tukey.

Luego, se utilizó la alternativa de aproximación de ingesta mediante fluorescencia intestinal, utilizando únicamente *E. coli* OP50 como alimento y suplementando la dieta, como se describió con anterioridad. Los resultados se muestran en la Figura 14. Observamos que no hay diferencia significativa entre los grupos control y estresados, como fue señalado previamente. De forma similar, para los gusanos alimentados con una dieta suplementada, no se observaron diferencias entre control y estrés. Por otro lado, vemos que los gusanos cuya dieta fue suplementada con vitaminas mostraron una mayor fluorescencia intestinal para ambos grupos: control y estrés, observándose una diferencia estadísticamente significativa para el grupo control ( $p=0,0213$ ) y para el grupo estresado ( $p=0,0499$ ), con respecto a los gusanos alimentados únicamente con OP50. Por lo tanto, podemos inferir que la suplementación de la dieta con vitaminas dadoras de metilo incrementa la ingesta en *C. elegans*.

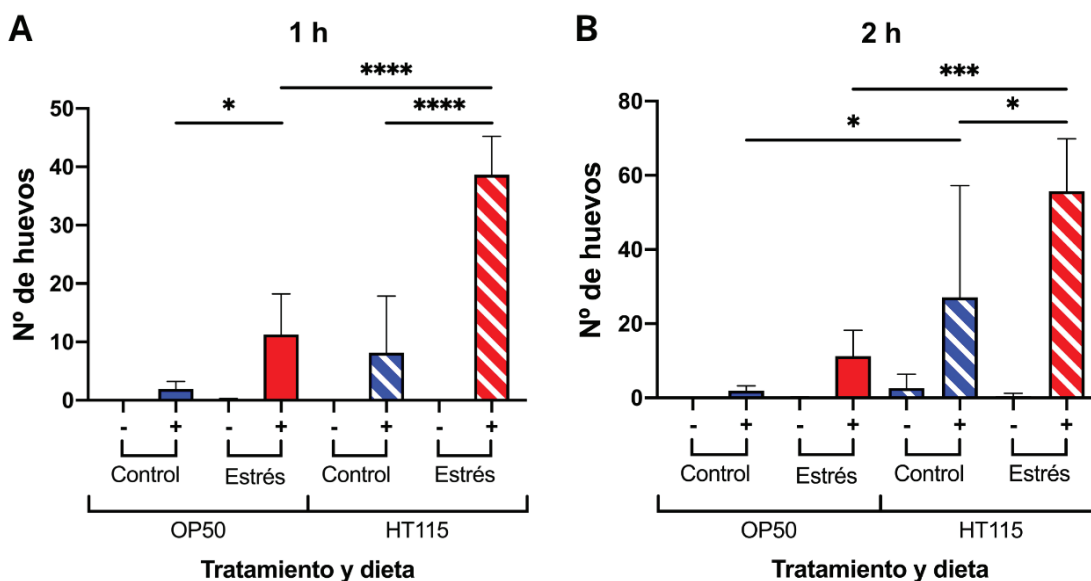


**Figura 14: La suplementación dietaria incrementa la intensidad de fluorescencia intestinal.** Cada punto corresponde al promedio de intensidad de fluorescencia intestinal de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa) por condición. ANOVA de 2 vías: suplementación (con o sin vitaminas) y tratamiento (control vs estrés) - Test de comparaciones múltiples de Šidák.

Efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta sobre la ovipuesta en *C. elegans*

Durante los análisis del efecto conjunto del estrés y diferente calidad de dieta expuestos con anterioridad, se observó cualitativamente que los gusanos parentales hermafroditas alimentados con HT115 depositaban menos huevos que los gusanos alimentados con OP50, durante las 2 horas que se permitía la ovipuesta en el tratamiento de estrés. Debido a esto decidimos evaluar el efecto conjunto del estrés con la calidad de dieta sobre la ovipuesta.

Para esto, evaluamos gusanos alimentados con OP50 o con HT115 y a su vez expuestos o no a estrés térmico. Los resultados se muestran en la Figura 15. Tras 1 hora, dentro del grupo de gusanos alimentados con HT115, los gusanos estresados depositaron más huevos que los gusanos control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Además, los gusanos estresados alimentados con HT115 depositaron mayor cantidad de huevos que los gusanos estresados alimentados con OP50, diferencia que también es relevante estadísticamente. A su vez, estas diferencias recién mencionadas se mantuvieron luego de las dos horas de ovipuesta. De esta manera, la exposición al estrés y la alimentación con HT115 aumentaron la deposición de huevos, lo cual sugiere un efecto conjunto del estrés y la calidad de la dieta sobre la ovipuesta en *C. elegans*.



**Figura 15: La exposición al estrés y la alimentación con HT115 aumentan la deposición de huevos.**

Se graficó la media de número de huevos depositados por los gusanos hermafroditas en medio líquido adicionado (+) o no (-) con serotonina en (A) 1 hora o en (B) 2 horas.  $n = 4$  experimentos independientes (1 experimento = 1 placa). Cada placa se midió por triplicado, con un tamaño de muestra de 8 gusanos en cada pocillo. A los efectos de la comparación, los datos de OP50 son los mismos que en la Figura 4. ANOVA de 2 vías: tratamiento (control vs estrés) y calidad de dieta (OP50 vs HT115) - Test de comparaciones múltiples de Tukey. Los asteriscos indican diferencias significativas (\*  $p < 0,050$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) entre los grupos marcados con las barras horizontales.

Puesta a punto de la tinción del contenido lipídico

Para complementar la medición de la frecuencia de bombeo faríngeo y la tinción del contenido intestinal con bacterias fluorescentes pusimos a punto el protocolo de tinción del contenido lipídico con Oil Red O (ORO). Este es un colorante que tiñe triglicéridos y lipoproteínas en gusanos fijados.

Se partió del protocolo utilizado por Lynn *et al.*<sup>144</sup>. Las condiciones que se modificaron durante la puesta a punto, a fin de obtener el mejor resultado de tinción disminuyendo el tiempo total de la técnica, fueron las siguientes:

- Tiempo de fijación con isopropanol: 3, 10, 30 y 60 minutos.
- Número de etapas de congelado y descongelado: 1, 2 y 3 veces.
- Temperatura de congelado: -70 °C o nitrógeno líquido (-170 °C).
- Tiempo de incubación con ORO: 2, 16 y 24 horas.

El protocolo final propuesto está detallado en Materiales y Métodos e incluye un paso de fijación con isopropanol 60 % por 10 minutos, 3 repeticiones de congelado en nitrógeno líquido y descongelado a 37 °C y una incubación con ORO de 16 horas.

Un ejemplo de una imagen de un gusano hermafrodita adulto con su contenido lipídico teñido con ORO se observa en la Figura 16. Las imágenes se utilizarán para determinar un método de análisis del contenido lipídico. Una opción es aquella ya utilizada por Lynn *et al.*<sup>144</sup> que se basa en un método de presencia o ausencia de lípidos teñidos. Ellos observan un fenotipo de depleción somática de grasa dependiente de la edad (*Age-dependent Somatic Depletion of Fat*; Asdf, por sus siglas en inglés). Asdf es un fenotipo que ocurre en gusanos envejecidos, en el cual los animales muestran una disminución de lípidos en las células somáticas, mientras que los lípidos en las células germinales permanecen inalterados. Si categorizamos el gusano observado en la Figura 16 de acuerdo a la presencia o ausencia de Asdf, este no presenta depleción de lípidos, ya que la tinción se encuentra a lo largo de todo el gusano.



**Figura 16:** Gusano hermafrodita adulto con su contenido lipídico teñido con ORO. Se tomaron imágenes de campo claro de cada gusano. Las flechas negras indican las gotas lipídicas teñidas con ORO.

El análisis mediante el contenido lipídico de los efectos tanto del estrés, la calidad dietaria y la suplementación, como de estos en conjunto no pudo realizarse debido a falta de equipamientos y falta de tiempo.

#### Silenciamiento génico por interferencia de ARN (ARNi)

Como el objetivo de este trabajo fue estudiar la ingesta de los gusanos, se realizó un análisis bibliográfico en busca de evidencia de genes que, mutados o silenciados, generen un fenotipo de ingesta afectada. El objetivo de ello fue obtener, mediante silenciamiento génico, gusanos con dichos fenotipos. Estas cepas luego serán utilizadas para analizar los efectos del estrés sobre los fenotipos logrados.

Los genes de interés, junto con su función y su fenotipo expresado (cuando los mismos se encuentran mutados o silenciados por ARNi) se encuentran a continuación en la Tabla 1. Los fenotipos anotados son aquellos de interés para este trabajo.

**Tabla 1:** Listado de genes seleccionados, con su respectiva función, los fenotipos registrados en mutantes y en silenciamiento génico.

Gen	Función	Razón por la cual es de nuestro interés
<i>eat-2</i>	Subunidad del receptor nicotínico de acetilcolina <sup>145</sup>	Funciona en el músculo faríngeo regulando la tasa de bombeo faríngeo <sup>146</sup> . Los mutantes presentan un bombeo faríngeo lento, un contenido lipídico reducido y evitan el césped bacteriano <sup>91,146</sup> .
<i>ser-1</i>	Receptor de serotonina <sup>147</sup>	Es un ortólogo de los genes humanos HTR2A (receptor 2A de serotonina) y HTR2B (receptor 2B de serotonina). Estos están implicados en varias enfermedades, incluyendo anorexia nerviosa <sup>130</sup> .
<i>nhr-64</i>	Receptor nuclear de hormonas <sup>148</sup>	El receptor está implicado en el metabolismo de lípidos <sup>148</sup> .
<i>nhr-69</i>	Receptor nuclear de andrógenos <sup>149</sup>	Es ortólogo del gen humano HNF4A (factor nuclear hepático 4 alpha) que está asociado con diabetes <sup>131,150</sup> .
<i>nhr-35</i>	Receptor nuclear de hormonas <sup>151</sup>	Es ortólogo del gen humano HNF4A (factor nuclear hepático 4 alpha) que está asociado con diabetes <sup>131,150</sup> .
<i>dop-3</i>	Receptor de dopamina <sup>152</sup>	El gen es un ortólogo del gen humano DRD3 (receptor de dopamina D3), asociado a trastornos alimentarios <sup>153</sup> .
<i>npr-39</i>	Familia de receptores de neuropéptidos <sup>154</sup>	El sistema de receptores de neuropéptidos en <i>C. elegans</i> es ortólogo del sistema de receptores de neuropéptidos en humanos <sup>154</sup> . En humanos, la familia de neuropéptidos Y está asociada a la regulación de la ingesta de alimentos y a TCA <sup>132,133</sup> .
<i>mod-5</i>	Transportador de serotonina <sup>155</sup>	El gen es ortólogo del gen humano SERT-1 (transportador de serotonina) y de DAT-1 (transportador de dopamina) involucrados en anorexia nervosa <sup>156</sup> .
<i>rsk-1</i>	Quinasa de la proteína ribosomal S6 <sup>157</sup>	Regula el establecimiento adecuado de la línea germinal. Media el efecto de la restricción dietaria (por limitación general de nutrientes) sobre la producción de células germinales <sup>158</sup> .
<i>fog-2</i>	Gen de determinación de sexo en la línea germinal <sup>159</sup>	Su mutación genera la feminización de la línea germinal <sup>159</sup> .

Se buscó que los genes seleccionados presentaran una asociación con la ingesta, con la postura de huevos y/o con la determinación del sexo de los gusanos; de manera que el fenotipo observado para gusanos de cepas mutantes del gen o con silenciamiento del mismo sea una variante de estos comportamientos. A su vez, nos interesaron particularmente aquellos genes relacionados con desórdenes alimentarios o mentales humanos. En humanos, los desórdenes alimentarios tienen mayor prevalencia en mujeres<sup>31,160</sup>, por lo cual es de nuestro interés generar cepas de gusanos feminizados

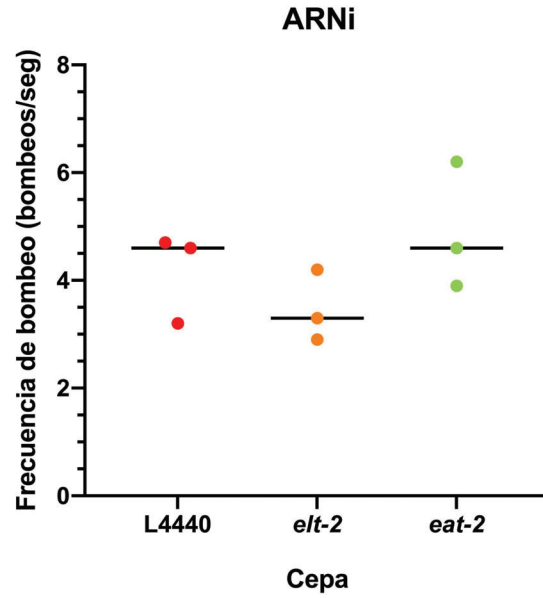


para estudiar estos trastornos. Es por ello que buscamos genes relacionados con la determinación del sexo en gusanos.

Luego, de cada gen se buscó el código que indica la posición en el genoma de *C. elegans*. El código se utilizó para buscar en la biblioteca de clones de *E. coli* HT115 el clon que contuviera el plásmido para expresión del ARNdc para el silenciamiento del gen de interés. Los códigos y número de clones se muestran en la Tabla AX en el anexo. Únicamente los clones para los genes *eat-2*, *ser-1*, *nhr-64*, *nhr-69*, *nhr-35*, *dop-3* y *npr-39* se encontraban disponibles en la biblioteca. Se prosiguió con el trabajo haciendo uso de estos clones, descartando los genes para los que no encontramos el clon correspondiente.

Se obtuvieron cultivos de bacterias *E. coli* HT115 que expresaban los ARNdc de los diferentes genes de interés y se utilizaron durante el protocolo de silenciamiento génico por ARNi detallado en Materiales y Métodos. Además se utilizó un cultivo de *E. coli* HT115 con el plásmido L4440 vacío como control negativo y un cultivo de *E. coli* HT115 con el plásmido para expresión del gen *elt-2* como control positivo. *Elt-2* es un factor de transcripción crucial para el desarrollo terminal del intestino en *C. elegans*<sup>161</sup>. Los mutantes nulos homocigotos de *elt-2* exhiben una malformación o degeneración aparente de las células intestinales, lo que conduce a su muerte en la etapa larval L1<sup>162,163</sup>. Debido a esto, se utiliza como control positivo, ya que su silenciamiento generaría un arresto del desarrollo.

Por un lado, como análisis conductual se realizó la medición de frecuencia de bombeo. Los resultados se muestran en la Figura 17. En este análisis se utilizó gusanos con el gen *eat-2* silenciado debido a que existe evidencia bibliográfica de que el mismo genera un fenotipo de bombeo faríngeo disminuido. No observamos diferencias estadísticamente significativas entre *elt-2* o *eat-2* y el control negativo. Por lo tanto, ninguno de los dos silenciamientos pareciera afectar este comportamiento. Dado que no evaluamos la expresión de los genes por qPCR para verificar si hubo silenciamiento o no, este resultado contradictorio con la bibliografía podría ser un artefacto.

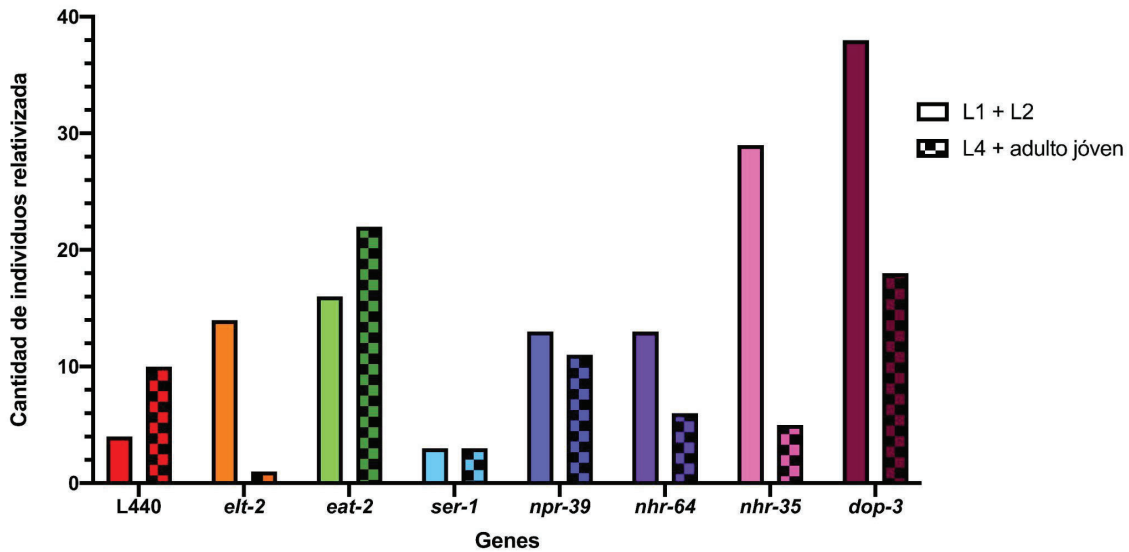


**Figura 17: Efecto del silenciamiento génico sobre la frecuencia de bombeo faríngeo.** Cada punto corresponde al promedio de frecuencias de bombeo de 7-15 individuos provenientes de una misma placa.  $n = 3$  experimentos independientes (placas) para cada condición. ANOVA seguido de test de Kruskal-Wallis.

Por otro lado, realizamos un análisis poblacional contabilizando la cantidad de individuos en cada estadio. Este análisis nos permitió analizar de manera preliminar el papel de los genes estudiados sobre el desarrollo de los gusanos. Para ello, dividimos los estadios en 2 grupos: larvas L1 y L2 y larvas L4 y adultos jóvenes. En este punto, descartamos contabilizar los huevos, debido a la dificultad de esta tarea. Además, descartamos el último grupo, ya que los adultos de mayor desarrollo son aquellos que fueron depositados en la placa en la primera instancia de esta técnica. Estos reciben menor silenciamiento génico, debido a que pasan menos tiempo de su vida alimentándose con las bacterias que expresan los plásmidos de interés, a diferencia de su descendencia. Este análisis se realizó de forma preliminar, por lo cual utilizamos 1 placa de gusanos por condición y los resultados se muestran en la Figura 18. Se graficó la cantidad de individuos de cada grupo relativizada por la cantidad inicial de individuos. En primer lugar, observamos que en la placa del control negativo hubo individuos para ambos grupos, lo que es esperado porque los gusanos siguen su desarrollo normal. A diferencia de esto, en la placa para los gusanos *elt-2* había larvas L1 y L2, mientras que no había L4 y adultos jóvenes. Esto ocurre porque el gen es esencial para el desarrollo y su silenciamiento genera un arresto en L2. Esto da un indicio de que el silenciamiento está ocurriendo correctamente. Luego, para los gusanos *eat-2*, *ser-1* y *npr-39* se observa un resultado similar que para el control negativo, donde hay individuos para ambos grupos, lo que sugiere que estos genes no tienen un efecto sobre el desarrollo de los gusanos. Mientras que para *nhr-64*, *nhr-35* y *dop-3* el fenotipo fue comparable con el control

positivo, donde hay mayor cantidad de larvas L1 y L2 con respecto a las larvas L4 y adultos jóvenes, sugiriendo que estos genes afectan el desarrollo de los gusanos, posiblemente arretando los individuos en el estadio larval L2.

La obtención de las bacterias *E. coli* HT115 que expresaban los ARNdc de los genes de interés, junto con el análisis conductual y poblacional de los gusanos expuestos al silenciamiento se realizó en el laboratorio de Veterinaria y Parasitología, en la Universidad de Glasgow, Escocia.



**Figura 18: Resultado del análisis poblacional de los gusanos tras silenciamiento génico por ARNi.**

Los estadios fueron divididos en 2 grupos: larvas L1 + L2 y larvas L4 + adultos jóvenes. Únicamente la cantidad de larvas L1 y L2 y larvas L4 y adultos jóvenes fueron contabilizadas y graficadas. 5-10 gusanos iniciales, 15-230 L1 + L2 y 25-180 L4 + adultos jóvenes. ANOVA de 2 vías, seguido de test de comparaciones múltiples Tukey.

## CAPÍTULO IV

*Discusión, Conclusión y Perspectivas a futuro*

## DISCUSIÓN

Los trastornos alimentarios representan un creciente desafío a nivel mundial. Se ha observado que el estrés puede desempeñar un papel crucial como desencadenante de enfermedades neuropsiquiátricas<sup>7</sup>, incluidos los trastornos de la conducta alimentaria (TCA)<sup>26</sup>. Existen pruebas que sugieren que la exposición al estrés durante el desarrollo puede aumentar la susceptibilidad a estos trastornos<sup>31</sup>. Por otro lado, se ha encontrado evidencia de que la suplementación de la dieta con vitaminas y aminoácidos durante el embarazo puede reducir la susceptibilidad a desarrollar trastornos alimentarios en las hijas de las mujeres suplementadas<sup>31</sup>.

En el presente trabajo buscamos modelar los TCA en *C. elegans*. Analizamos la ingesta en los gusanos para dilucidar el efecto del estrés durante el desarrollo sobre la conducta alimentaria. Para ello, los gusanos utilizados fueron la descendencia de los gusanos expuestos a estrés térmico. Logramos poner a punto tres aproximaciones que nos permiten analizar este comportamiento en gusanos: la medición de fluorescencia intestinal, la medición de frecuencia de bombeo faríngeo y la medición de contenido lipídico. Si bien no logramos observar el efecto del estrés térmico durante el desarrollo en la ingesta haciendo uso de estas aproximaciones, observamos que la suplementación de la dieta con vitaminas y aminoácidos aumenta la fluorescencia intestinal, es decir, la ingesta en los gusanos.

Como se mencionó con anterioridad, en el modelo *C. elegans* la medición de ingesta no se puede observar de forma directa y es necesario buscar aproximaciones para medir la misma. Por ello, este trabajo consistió en establecer protocolos para la medición de la ingesta en *C. elegans* que no se utilizaban en el laboratorio hasta el momento.

El bombeo faríngeo en *C. elegans* implica la succión de líquidos conteniendo bacterias del entorno mediante la contracción y relajación de músculos de la faringe. En nuestro laboratorio, el protocolo de medición de la frecuencia de bombeo faríngeo se encontraba puesto a punto.

Se espera que una mayor ingesta de alimentos se traduzca en una mayor frecuencia de bombeo faríngeo. Este parámetro sirve como indicador de la actividad alimentaria, reflejando la tasa de alimentación<sup>164,165</sup>. La transparencia de *C. elegans* permite observar directamente este proceso bajo un microscopio, lo que facilita el estudio de la ingesta de alimentos mediante la cuantificación directa de bombeos por minuto. Un caso ilustrativo donde se emplea la medición de frecuencia de bombeo para analizar el comportamiento de ingesta es mediante el estudio de la cepa de *C. elegans* mutante para el gen *eat-2*<sup>146</sup>. Esta cepa exhibe una mutación que da lugar a un fenotipo caracterizado por una disminución en la frecuencia de bombeo faríngeo de los gusanos<sup>146</sup>. En esta situación, la incapacidad para bombear de manera eficiente afecta la ingesta, resultando en un estado de hambruna<sup>146</sup>. Estos movimientos de alimentación pueden ser regulados por el estado interno del gusano y por señales

ambientales<sup>164</sup>. Los gusanos aumentan la frecuencia de bombeo faríngeo cuando están hambrientos o lo disminuyen en ambientes con alta disponibilidad de alimentos<sup>166-168</sup>. Esto demuestra su capacidad de adaptar la ingesta de alimentos a la disponibilidad de los mismos en el ambiente.

La ingesta también puede ser indirectamente evaluada mediante el uso de bacterias que expresan una proteína fluorescente<sup>165</sup>. Para la puesta a punto de la medición de fluorescencia intestinal, en primera instancia se usó la cepa de *E. coli* OP50 que expresaba la proteína verde fluorescente GFP<sup>169</sup>. Esta proteína presenta muchas aplicaciones en la biología celular, como su uso para la visualización del sistema nervioso en *C. elegans*<sup>165</sup>. Sin embargo, como demostramos con anterioridad, el nematodo presenta autofluorescencia a 503 nm, longitud de onda de emisión reportada para GFP<sup>169</sup>. Esto se debe principalmente a que el intestino de *C. elegans* contiene gránulos que autofluorescen en verde y amarillo (*lysosome related organelles*; LROs, por sus siglas en inglés)<sup>170-172</sup>. En el intestino, los liposomas generan un depósito de lipofuscina que es un marcador para el daño celular en células envejecidas<sup>173</sup>. La deposición se forma durante el envejecimiento de los gusanos o durante exposiciones a estrés<sup>174</sup>. Además, la fluorescencia emitida por los gránulos puede interferir con la interpretación de resultados cuando se utiliza la proteína GFP durante protocolos de tinción intestinal. Por todo esto no usamos la cepa *E. coli* OP50-GFP para la medición de ingesta.

Para continuar con la puesta a punto, se tuvo en cuenta que cualitativamente observamos que los gusanos no exhibían autofluorescencia roja, por lo cual se seleccionó la proteína dTomato<sup>175</sup>. Esta es una proteína fluorescente color rojo derivada de *Discosoma sp.*<sup>176</sup> (género de anémonas marinas rojas). Exhibe una longitud de onda de emisión de 580 nm. Entonces, utilizando bacterias *E. coli* OP50 que expresan dTomato pudimos observar fluorescencia intestinal sin autofluorescencia, para la observación del intestino de los nematodos.

Lo siguiente que realizamos fue establecer el tiempo de alimentación con las bacterias fluorescentes requerido para la observación de fluorescencia intestinal en los gusanos. De esta manera, si bien probamos períodos más largos de tiempo, 15 minutos fueron suficientes para observar el intestino de gusanos *C. elegans* completamente llenos de debris de bacterias OP50 que expresaban la proteína fluorescente dTomato. Dado que los gusanos defecan cada 45-50 segundos cuando hay abundante alimento, los materiales ingeridos permanecen en el intestino por un lapso de 5 a 15 minutos<sup>165</sup>. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia en el lumen intestinal está principalmente influenciada por la ingesta de alimentos (o partículas fluorescentes) ocurrida entre 5 y 15 minutos antes de la observación<sup>165</sup>. Teniendo en cuenta que este es el tiempo máximo que el alimento permanece en el intestino y viendo que no se observó un efecto del estrés sobre la intensidad de fluorescencia intestinal, podríamos pensar que este tiempo fue excesivo. Tras los 15 minutos, el intestino de los gusanos se encontraría completamente lleno de bacterias, impidiendo observar si hay un cambio en la

ingesta. Posiblemente deberíamos probar menor tiempo desde la exposición a las bacterias d'Tomato hasta su observación al microscopio, para ver un cambio en la ingesta.

Los lípidos son esenciales para la vida. Tienen funciones variadas, desde ser componentes de membranas, o actuar como lípidos de señalización, hasta ser reservorio de energía. Cuando el metabolismo de lípidos está desregulado conduce a enfermedades como la obesidad y la diabetes tipo II, que son preocupaciones urgentes de salud pública mundial<sup>65</sup>. 94 de los 471 genes relacionados con el metabolismo lipídico de *C. elegans*, tienen su contraparte en humanos. Estos además están asociados con el síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes<sup>177</sup>. Incluso, ya que *C. elegans* es un modelo excelente para analizar diversos procesos biológicos, es posible que sea un sistema adecuado para describir el mecanismo de acumulación de grasa.

Las técnicas utilizadas para esto se separan en dos grupos: la visualización por microscopía o técnicas bioquímicas. El análisis de la acumulación de lípidos en el organismo por microscopía puede realizarse mediante métodos con colorantes o métodos libres de marca. Los colorantes son económicos y una forma de medir cuantitativamente los niveles de lípidos, como también observar cualitativamente la distribución de lípidos en los diferentes tejidos<sup>178</sup>. Ejemplos de estos colorantes son el Nile Red y el Oil Red O. Su naturaleza hidrofóbica facilita su solubilidad en lípidos y reduce la interacción con el tejido circundante. Aunque estos métodos son efectivos para analizar el contenido lipídico en general, no revelan información sobre la composición química de los depósitos lipídicos. Esto último debe realizarse mediante microscopía con métodos libres de marca (*Coherent Anti-Stoke Raman Spectroscopy*; CARS, por sus siglas en inglés) o las técnicas bioquímicas como espectrometría de masa, cromatografía líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography*; HPLC, por sus siglas en inglés), ensayos enzimáticos, cromatografía gaseosa, entre otras<sup>137</sup>.

Nile red (9-dietilamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]fenoxazina-5-ona) es un colorante fluorescente que tiñe lípidos neutros como triglicéridos o ésteres de colesterol<sup>179</sup>. Cuando gusanos *C. elegans* se tiñen con Nile Red, se pueden observar cuerpos lipídicos discretos en todo el intestino y otros tejidos, ya sea en grupos o distribuidos uniformemente, dependiendo del genotipo del animal o el tratamiento experimental<sup>138,178</sup>.

El Oil Red O (ORO) es un tinte graso soluble utilizado para colorear triglicéridos y lipoproteínas<sup>137</sup>. Los gusanos *C. elegans* teñidos con ORO exhiben gotas de lípidos rojas que sobresalen en el cuerpo transparente del animal, facilitando así la evaluación cualitativa de la distribución de lípidos entre distintos tejidos mediante microscopía óptica<sup>144</sup>.

Una diferencia entre los dos colorantes es el tipo de tratamiento de los gusanos necesario para la tinción<sup>137</sup>. Mientras que la tinción con Nile Red se realiza sobre los gusanos vivos los cuales son alimentados con una mezcla de bacterias y el colorante, la tinción con Oil Red O es sobre gusanos

fijados<sup>137</sup>. De esta manera, para el primero es necesario un largo período de tiempo de exposición al colorante para lograr la tinción deseada. Otra diferencia es el tipo de lípidos que tiñe cada colorante, como mencionamos hace unos instantes. Si bien ambos tiñen lípidos, Nile Red tiñe además fosfolípidos lisosomales. Esto podría generar una sobreestimación en el análisis si no se hace una distinción durante la observación de la fluorescencia<sup>137</sup>. En este estudio desarrollamos ambos métodos debido a que se reportó el uso de ambos colorantes en literatura<sup>137,178</sup>; sin embargo, durante nuestra experimentación comprobamos que la tinción con Nile Red presentaba más limitaciones que la tinción con ORO.

En primera instancia, se puso a punto la técnica de tinción del contenido lipídico intestinal de gusanos *C.elegans* utilizando el colorante Nile Red, para medir ingesta que no se utilizaba en el laboratorio hasta el momento. Mediante la misma se analizó cuantitativamente la cantidad de lípidos intestinales totales. En gusanos *C. elegans* el almacenamiento de lípidos en células somáticas va en aumento a medida que se da el desarrollo del individuo<sup>144</sup>. Esto coincide con lo observado ya que la progenie presentó menor cantidad de contenido lipídico que sus progenitores. Sumado a esto, durante momentos de escasez de nutrientes, en lugar de recurrir a la glucosa de la dieta, los organismos aprovechan los lípidos y los aminoácidos almacenados para cubrir las necesidades energéticas del organismo. Los lípidos se liberan como fuente de energía mediante procesos de lipólisis y oxidación de ácidos grasos<sup>138</sup>. Por lo tanto, este hecho coincide con observar una disminución de los lípidos totales en gusanos que experimentaron privación de alimento. El grupo de gusanos hambreados fue utilizado como control positivo de nuestra investigación. Debido a la disminución del contenido lipídico observada para este grupo con respecto al grupo control, podemos confirmar que la técnica fue realizada con éxito. Los gusanos de este grupo se encontraban en proceso de utilizar los lípidos como fuente de energía para sobrevivir tras 6 horas de falta de alimento, tiempo suficiente para que la glucosa de su organismo se consumiera totalmente.

El estrés térmico es de tipo físico, poco invasivo y presenta un protocolo para su aplicación poco laborioso. Debido a la bibliografía<sup>180</sup> y a las ventajas recién presentadas, elegimos el estrés térmico para aplicar durante el desarrollo *in utero* como factor para modelar la ingesta en los gusanos.

El nematodo *C. elegans* puede desarrollarse en temperaturas dentro del rango de 12 a 25 °C y sufre estrés térmico una vez que la temperatura supera los 25 °C<sup>110</sup>. *C. elegans* presenta una respuesta al estrés conservada con otras especies, que le permite adaptarse a altas temperaturas<sup>100-102</sup>. Se conoce que la exposición al estrés crónico (período de tiempo prolongado de exposición a 28 °C) genera la alteración de la señalización neuronal y la cesación de la puesta de huevos<sup>109</sup>. En coincidencia con esto, tras la exposición al estrés térmico agudo, se observamos cualitativamente que los gusanos presentaban menor deposición de huevos.



Por otro lado se reportó que el estrés ambiental puede inducir ventajas en la supervivencia que se transmiten a múltiples generaciones, lo que representa una adaptación evolutivamente ventajosa a nivel de especie. Más en concreto, el estrés térmico genera el aumento de la sobrevivencia de la generación que es sometida al mismo y hasta cinco generaciones futuras<sup>110</sup>. Además, existe evidencia de que un aumento de la disposición de serotonina genera resistencia al estrés térmico en los gusanos<sup>181</sup>. En este trabajo, cuando evaluamos la ovipuesta estimulada con serotonina de los parentales, observamos un aumento en el número de huevos, lo que sugiere que el estrés modifica la tasa de ovipuesta. De manera similar, encontramos que la dieta de mejor calidad (HT115) también indujo una mayor tasa de postura de huevo con respecto a la dieta de menor calidad (OP50).

Estos resultados sugieren la existencia de un circuito neural complejo en el que la serotonina podría actuar como mediador entre el estrés térmico y la respuesta reproductiva del organismo. Así, la discrepancia en los efectos del estrés en la oviposición (observada entre el análisis cualitativo durante el protocolo y la técnica de medición de ovipuesta con estimulación con serotonina) podría estar relacionada con la interacción entre la sensibilidad a la serotonina, la señalización neural y la presencia de estrés en el ambiente.

Durante este trabajo, nuestro objetivo fue analizar los efectos del estrés aplicado durante el desarrollo embrionario sobre la ingesta de los gusanos. Para ello, la población de interés fue aquella descendiente de los parentales estresados. En esta población, no observamos diferencias en la ingesta del grupo de gusanos estresados versus el grupo de gusanos control bajo ninguna de las aproximaciones de medición. Vale la pena destacar que en la naturaleza los gusanos deben protegerse de una serie de peligros normales, para lo cual se desarrollaron diversos mecanismos. Uno de ellos es la protección de los embriones mediante la resistencia de los huevos para asegurar la progenie. En el entorno del laboratorio, los huevos son resistentes tanto a tratamiento con SDS como a tratamiento con NaOH y lavandina. Todo esto permite inferir que el estrés térmico agudo aplicado durante el desarrollo puede no haber sido suficiente para observar una respuesta en gusanos adultos. Una alternativa para este problema sería utilizar estrés térmico crónico, aplicando temperaturas más altas que su temperatura óptima de cultivo (mayor a 20 °C, pero menor a 33 °C para evitar su muerte) durante un período más largo de tiempo, incluso abarcando todo el desarrollo embrionario del nematodo (desde la fecundación del ovocito, hasta la eclosión del huevo). La desventaja que conlleva esto es que debido al corto tiempo de vida, a que todos los individuos son iguales y que se utiliza una población (cientos de individuos a la vez) durante la experimentación, se requiere implementar alguna manera de diferenciar los individuos estresados de los que no fueron expuestos a estrés. Otra alternativa para el estrés térmico sería el uso de otro tipo de estrés. Entre los diversos protocolos para inducir estrés en los gusanos utilizados en nuestro laboratorio podemos mencionar el estrés osmótico (mediante variaciones en las concentraciones de sales en el medio NGM) y el estrés oxidativo (mediante el uso de

químicos como el herbicida paraquat). Estos podrían ser utilizados como opción en lugar del estrés térmico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos tienen naturaleza química y que al administrar las moléculas estresantes se están perturbando vías moleculares relacionadas con la ingesta directa o indirectamente, dificultando la identificación de los componentes de la respuesta al estrés.

La modificación exagerada de la dieta en seres humanos puede desencadenar trastornos alimentarios, manifestándose en una variedad de condiciones clínicas que afectan la alimentación y la nutrición. Estos trastornos pueden surgir como resultado de cambios en los patrones alimentarios, la calidad de los alimentos consumidos o las prácticas dietéticas adoptadas<sup>160,182,183</sup>. El entendimiento de cómo los cambios en la dieta pueden influir en la salud nutricional y en el desarrollo de trastornos alimentarios es fundamental para abordar estos problemas de manera efectiva.

Dado que nuestro objetivo fue posicionar al nematodo *C. elegans* como modelo para estudiar trastornos de la conducta alimentaria, investigamos cómo diferentes dietas pueden afectar la ingesta. Conocemos que existen cepas de bacterias *E. coli* estandarizadas para su uso como alimento de estos nematodos a escala de laboratorio<sup>146</sup>. A su vez, existen diferentes cepas que representan diferente calidad de dieta ya sea por la disponibilidad de nutrientes como la facilidad para su deglución, procesamiento y asimilación<sup>52,59,60</sup>. La exposición a diferentes cepas como alimento causa diversas respuestas de comportamiento en los gusanos. Por ejemplo, la cepa HB101 se considera de alta calidad y resulta más sencilla de ingerir por los gusanos que otras cepas de *E. coli*. Gusanos alimentados con esta cepa se desarrollan en menor tiempo y enlentecen su bombeo faríngeo. Este comportamiento también es observado en gusanos que se alimentan con HT115. HB101 y HT115 son cepas derivadas de *E. coli* y tienen un origen común; HB101 es un híbrido B x K12, mientras que HT115 es una cepa derivada de K12 y deficiente en RNAasa III<sup>61</sup>. Ambas cepas son consideradas de alta calidad nutricional como alimento para los gusanos<sup>184</sup>. A pesar de la literatura recién comentada, haciendo uso de las bacterias HT115 como cepa de alta calidad y OP50 como cepa de baja calidad, no encontramos un efecto de la calidad de la dieta proporcionada durante el desarrollo *in utero* y *ex utero* sobre la ingesta, midiendo frecuencia de bombeo faríngeo. Asimismo, tampoco encontramos un efecto conjunto de la calidad de la dieta y el estrés durante el desarrollo *in utero* en relación con la ingesta. Cabe destacar que en la literatura mencionada se analiza la ingesta de los gusanos estresados, mientras que en este trabajo analizamos la ingesta de la descendencia de los gusanos expuestos a estrés, lo cual es una diferencia considerable.

En este trabajo, también propusimos utilizar la medición de fluorescencia intestinal para analizar el efecto de la calidad de la dieta (distintas cepas bacterianas) proporcionada durante el desarrollo *in utero* y *ex utero* sobre la ingesta. Un punto de relevancia es la imposibilidad que hallamos de medir

fluorescencia intestinal para los gusanos que fueron alimentados con *E. coli* HT115 durante su desarrollo. Atribuimos esto al cambio abrupto de calidad de alimento que sufren los gusanos alimentados con HT115 cuando son cambiados a placas con OP50-dTomato para su observación bajo el microscopio. Los gusanos ingerirían cantidades limitadas de las bacterias de OP50-dTomato que no son suficientes para la observación microscópica. Consideramos que el cambio de cepa bacteriana debe hacerse de forma progresiva para permitir un acostumbamiento, o no alimentar a los gusanos por cierto tiempo para luego introducir una dieta diferente. Sin embargo, estas soluciones implican un tiempo prolongado de cambio de dieta, durante el cual se perderían los posibles efectos del estrés en los gusanos. Por ende, no es posible utilizar el protocolo puesto a punto en el laboratorio para la medición de fluorescencia intestinal con alimentación con OP50-dTomato en el caso en que los gusanos fueran alimentados con HT115 durante su desarrollo. Un nuevo enfoque para solucionar este problema es la generación de una cepa de HT115 que exprese una proteína fluorescente<sup>59</sup>. Sin embargo, esto requiere de una nueva puesta a punto, ya que durante este trabajo se probó generar estas bacterias sin éxito. De hecho, OP50 y HT115 requieren una manipulación genética para inducir la competencia para la transformación<sup>59</sup>. Existe poca evidencia del uso de HT115 expresando una proteína fluorescente<sup>185</sup>.

Se demostró que la suplementación de la dieta con vitaminas y aminoácidos durante el embarazo disminuye la susceptibilidad de las hijas a desarrollar trastornos alimentarios<sup>31</sup>. Esto se observó tanto en humanos como en ratones. Para analizar si esta respuesta se encuentra conservada en gusanos, propusimos suplementar la dieta de los gusanos con distintas vitaminas y aminoácidos para observar su efecto en la ingesta de la progenie.

En nuestro trabajo encontramos que la suplementación dietaria aumentaba la ingesta en los gusanos alimentados con OP50. En particular, estos gusanos presentaron un aumento de fluorescencia intestinal. Si bien el resultado refleja un aumento en la ingesta, se desconoce la razón del aumento de fluorescencia intestinal que no correlaciona con un aumento de la frecuencia de bombeo asociado<sup>185,186</sup>.

Como explicamos con anterioridad, durante este trabajo no observamos efectos del estrés térmico durante el desarrollo *in utero* sobre la conducta alimentaria de los gusanos. Además, se infirió que el estrés térmico agudo utilizado podría no ser suficientemente intenso para generar un efecto notorio en la descendencia. Una alternativa para solucionar este problema sin variar el tipo de estrés y las aproximaciones de ingesta utilizadas, sería encontrar nuevas cepas de gusanos para la experimentación. Idealmente, las cepas deberían diferir en fenotipos asociados a la ingesta u otros rasgos de la conducta alimentaria perturbada. Un ejemplo es la cepa de gusanos con el gen *eat-2* mutado que expresa un fenotipo de disminución de bombeo faríngeo<sup>146</sup>. De esta manera, se utilizarían

cepas con fenotipo de ingesta afectado, en la cual los efectos del estrés térmico sobre la ingesta se podrían observar con más claridad.

Como fue descrito en la introducción, *C. elegans* es fácil de manipular genéticamente para investigar las funciones e interacciones génicas. Una técnica estándar para esto es la interferencia por ARN (ARNi) que produce la reducción de los niveles de un determinado ARN mensajero<sup>69</sup>. Durante este trabajo, utilizamos esta técnica como una primera aproximación para observar los fenotipos causados por el silenciamiento de diversos genes. Los genes seleccionados presentan una asociación con la ingesta, con la postura de huevos, con la determinación del sexo de los gusanos y/o con un gen ortólogo en humanos relacionado con trastornos alimentarios. El objetivo fue delucidar qué genes podrían ser utilizados en futuras investigaciones para analizar el efecto del estrés sobre la ingesta.

Durante este trabajo, llevamos a cabo la técnica de ARNi para los genes expuestos en la Tabla 1. Además, utilizamos bacterias HT115 con el plásmido L4440 sin inserto como control negativo, y bacterias que expresaban ARNdc para *elt-2* como control positivo. *Elt-2* desempeña un papel fundamental como factor de transcripción durante la etapa final del desarrollo del intestino en *C. elegans*<sup>161</sup>. Cuando los gusanos carecen de *elt-2* en forma homocigota, se observa una aparente malformación o degeneración de las células intestinales, lo que resulta en la muerte de los individuos en el estadio larval L1<sup>162,163</sup>. Por lo cual, confirmamos que el silenciamiento ocurrió correctamente porque los gusanos alimentados con estas bacterias mostraron un arresto en el desarrollo (Figura 17).

Los resultados preliminares de ARNi sugieren la participación o no de algunos de los genes silenciados en el desarrollo. Por lo tanto, para analizar la ingesta realizaríamos el silenciamiento de aquellos genes no involucrados en el desarrollo, como *eat-2*, *ser-1* y *npr-39*.

## CONCLUSIÓN

En este trabajo de tesis:

- Se pusieron a punto dos aproximaciones para analizar la ingesta: la medición de fluorescencia intestinal y el análisis del contenido lipídico.
- El modelo implementado no nos permitió observar un efecto del estrés térmico durante el desarrollo sobre la ingesta.
- No observamos diferencias en la respuesta al estrés en relación a la calidad de la dieta (cepas OP50 vs HT115).
- Observamos un aumento de la ingesta en gusanos alimentados con dietas suplementadas con vitaminas y aminoácidos.

Si bien, el estrés aplicado no nos permitió perturbar la ingesta, estos ensayos contribuyeron a desarrollar y optimizar técnicas de evaluación de la ingesta que previamente no se utilizaban en nuestro laboratorio.

Este estudio proporciona una primera visión del potencial de *C. elegans* como modelo para estudiar los TCA. Para avanzar en nuestro entendimiento de la modulación de la ingesta, es necesario explorar los efectos de diferentes tipos de estrés y utilizar diversas cepas de gusanos con fenotipos de ingesta alterados. Estos hallazgos no solo tienen implicaciones para la comprensión de la biología básica de estos organismos modelo, sino que también ofrecen perspectivas sobre los mecanismos subyacentes a los trastornos alimentarios y al estrés en otros organismos, incluyendo los seres humanos.

## PERSPECTIVAS A FUTURO

- Habiendo puesto a punto el protocolo de tinción de lípidos, se propone analizar el efecto del estrés y las diferentes dietas sobre el contenido lipídico en *C. elegans* mediante análisis cuantitativos de los lípidos presentes en los gusanos por tinción con Nile Red y ORO.
- Realizar un análisis molecular (qPCR) para determinar si el estrés térmico induce cambios en la expresión de genes sensibles al estrés (*nmgp-1* o *daf-16*).
- Ampliar el estudio incluyendo estrés térmico crónico u otros tipos de estrés, como el estrés oxidativo o el estrés osmótico, para evaluar sus efectos sobre la ingesta y el comportamiento alimentario en *C. elegans*.
- Replicar los experimentos de ARNi para comprobar molecularmente (qPCR) que el silenciamiento génico ocurra. Analizar los efectos del estrés sobre la ingesta en gusanos con genes interferidos.

# CAPÍTULO V

## *Materiales y Métodos*

## TÉCNICAS USADAS EN EL MODELO DE *C. ELEGANS*

### ***Líneas de gusanos***

Contamos con la cepa silvestre Bristol N2, solicitada al Caenorhabditis Genetics Center (CGC, USA) y la cepa *rrf-3*, sensible a la interferencia de ARNi, cedida gentilmente por la Dra. Collette Britton (Laboratorio de Veterinaria y Parasitología, Universidad de Glasgow, Escocia).

### ***Mantenimiento***

Las cepas de *C. elegans* se mantuvieron en condiciones estándar<sup>1</sup>. Los gusanos se mantuvieron a 20 °C en placas de Petri con medio NGM-agar y fueron alimentados con una gota de un cultivo de bacterias *E. coli* OP50. Para mantenerlos en condiciones óptimas, se realizaron repiques 2-3 veces por semana, transfiriendo un trozo de ágar con gusanos a una placa fresca con alimento<sup>52</sup>.

Nematode Growth Medium (NGM): NaCl 3 g; peptona 2,5 g; agar 17 g; CaCl<sub>2</sub> 1 ml 1 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 ml 1 M; MgSO<sub>4</sub> 1 ml 1 M; colesterol 5 mg/ml (en etanol 100%) 1 ml; agua c.n.p. 1 l.

### ***Alimento***

#### **Cepas de bacterias**

Se alimentó a los gusanos con *E. coli* OP50, *E. coli* OP50-dTomato (esta cepa expresa la proteína rojo fluorescente dTomato) y OP50-GFP (esta cepa expresa la proteína verde fluorescente GFP). Además se utilizó *E. coli* HT115. En este trabajo contamos con dos cepas de *E. coli* HT115. La primera se utilizó durante los experimentos conductuales de medición de fluorescencia intestinal y frecuencia de bombeo. La segunda, que se utilizó durante la medición de contenido lipídico, contiene el plásmido L4440 que le confiere resistencia a ampicilina y que puede expresar ARNi si presenta la secuencia del gen de interés (ver apartado de silenciamiento génico por ARN de interferencia más adelante).

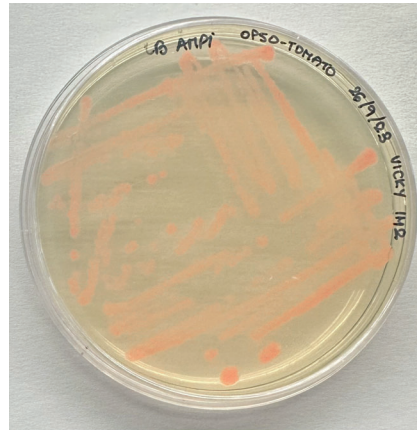
#### **Cultivo de bacterias**

Cultivos líquidos frescos (crecidos una noche a 37 °C en agitación) se utilizaron para la preservación de las cepas. Se fraccionaron con glicerol 80%, en un volumen final de 1 ml y se guardaron a -70 °C.

Las bacterias se crecieron a partir de los stocks de -70 °C en LB sólido (OP50-GFP y HT115), LB sólido con ampicilina (HT115-L4440) o LB sólido con estreptomycin (OP50). Se tomó una colonia y se realizó un cultivo líquido LB (OP50-GFP y HT115), LB-ampicilina (HT115-L4440) o LB-estreptomycin (OP50), que se incubó a 37 °C ON con agitación. Estos cultivos se alicuotaron y se guardaron a 4 °C. para ser utilizados como alimento, se sembraron 100 µl sobre NGM-agar. La cepa OP50-dTomato se



creció y se mantuvo en cultivos sólidos en LB-agar-ampicilina (véase Figura M2) para luego realizar un cultivo líquido fresco LB-ampicilina al momento de utilizar la cepa como alimento.



**Figura M1: Cultivo de bacterias OP50-dTomato en LB agar.** Nótese la coloración de las colonias debido a la expresión de la proteína dTomato.

### ***Descontaminación y sincronización***

La presencia de hongos, levaduras y bacterias en las placas de *C. elegans* es común y es un problema de contaminación. Aunque no representa un riesgo para los gusanos, resulta indeseable para analizar fenotipos o comportamientos o transferirlos para experimentos. Por esta razón, se implementó el siguiente procedimiento para descontaminar las placas.

### **Remoción de bacterias y levaduras**

Se tomaron placas con gusanos en sus diferentes estadios: hermafroditas adultos, larvas y huevos. Se lavaron con M9 estéril a fin de remover todos los gusanos y huevos. Se colectó el líquido en un eppendorf y se completó el volúmen hasta llegar a 750  $\mu$ l. A este se le agregaron 55  $\mu$ l de NaOH y 110  $\mu$ l de lavandina a fin de llegar a un volumen final de 915  $\mu$ l. Se mezcló para integrar los componentes y se dejó actuar por 5 minutos, agitando eventualmente. Se centrifugó por 1 minuto a 13000 *g* y se realizó un lavado con 1 ml de M9 estéril. Se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 13000 *g*, se eliminó el exceso de volumen y se colocó en una placa con medio NGM fresco. Protocolo adaptado de Porta-de-la-Riva, 2012<sup>187</sup>.

Con este tratamiento, además de eliminar bacterias y hongos, se elimina la población adulta y las larvas, dejando únicamente los huevos, que son resistentes a la técnica. Este procedimiento permite sincronizar el tiempo de vida de los gusanos.

## **Remoción de hongos**

Se removió un trozo de agar de la placa contaminada y se depositó en una placa de NGM fresco y limpio con alimento. Se permitió que los gusanos se dirigieran a la comida y se tomaron algunos (ya sea uno por uno o tomando un trozo de agar nuevamente con varios gusanos) para pasarlos a una nueva placa con medio fresco y alimento.

Este tratamiento no permite la sincronización de la población.

### ***Mantenimiento de stocks***

## **Congelamiento**

A fin de preservar las líneas de gusanos obtenidas, se realizaron congelamiento de las mismas. Para ello se colectaron gusanos de una placa de Petri que contenía gran número de huevos y larvas L1 o L2. La recolección se realizó agregando partes iguales de M9 y solución de congelamiento a la placa; ambas soluciones estaban estériles. El líquido se colectó en crioviales y se mantuvieron una noche a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el sistema Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Freezing Container con isopropanol, para luego pasarlos a nitrógeno líquido.

Solución de congelamiento: NaCl 20 ml 1 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 ml 1 M ph 6, glicerol 100% 60 ml,  $\text{MgSO}_4$  0,6 ml 0,1 M, agua 200 ml.

## **Descongelado**

Para descongelar las cepas de interés se tomaron los crioviales del nitrógeno líquido y se descongelaron a temperatura ambiente. Se centrifugó cuidadosamente a 200 *g* por 30 segundos para eliminar el exceso de solución de congelado y se depositaron 50-100  $\mu\text{l}$  en una placa de NGM fresca con alimento.

## **PROTOSCOLOS PARA EL ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTOS**

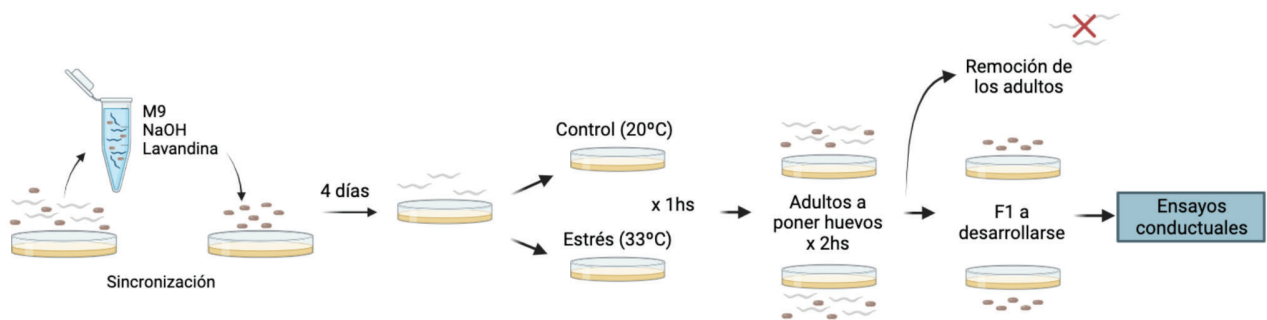
### ***Sincronización de la población***

Se utilizó el procedimiento indicado con anterioridad como “remoción de bacterias y levaduras”. Este procedimiento permite contar con gusanos en la misma etapa de desarrollo. Luego de 11,5 h, los huevos recolectados y depositados en placas frescas eclosionaron y al cabo de 3 días llegaron a la edad adulta.

## Diseño experimental

### Tratamiento de estrés

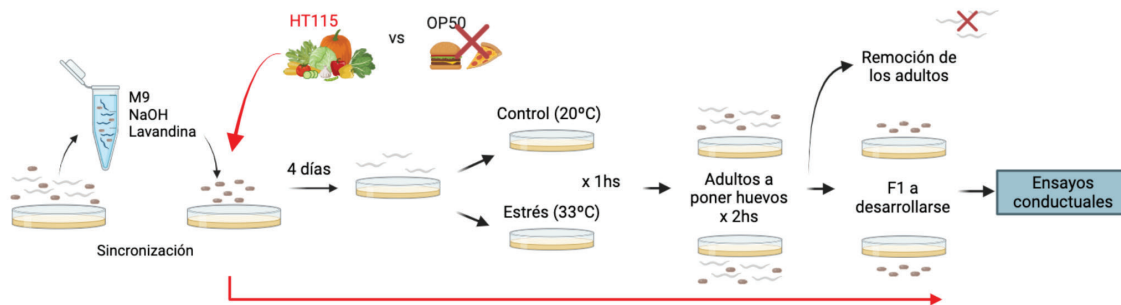
Los gusanos hermafroditas adultos sincronizados se separaron en 2 grupos: el grupo control y el grupo de tratamiento (estrés térmico). El grupo tratado se expuso a 33 °C durante 1 h (protocolo adaptado de De Rosa, 2019<sup>188</sup>); mientras que el grupo control permaneció a 20 °C. Pasado ese tiempo, se permitió que los gusanos se recuperaran por 15 minutos a 20 °C y luego se colocaron gusanos de ambos grupos en placas nuevas individuales frescas con alimento a 20 °C por 2 horas para que depositen huevos. Transcurridas las 2 h, se descartaron los adultos. Se permitió que los huevos se desarrollen a 20 °C hasta llegar a la etapa adulta y fueron estos los individuos en los que evaluamos las consecuencias del estrés térmico sufrido por las hermafroditas parentales. De este modo, estos individuos fueron expuestos al estrés durante su desarrollo *in utero*. En el estadio adulto, se evaluaron los comportamientos de ingesta. El protocolo completo se esquematiza en la Figura M2.



**Figura M2: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado.** Imagen creada en Biorender.

### Cambio en calidad dietaria

Los gusanos fueron crecidos en placas con alimento de diferente calidad. Se utilizó la cepa *E. coli* OP50 como alimento de baja calidad y alimento control. Mientras que se utilizó la cepa *E. coli* HT115 como alimento de alta calidad. El cambio de dieta fue realizado desde el comienzo del protocolo de estrés térmico, como se muestra en la Figura M3. Se agregó una gota de cultivo líquido de la cepa bacteriana HT115 a la placa con huevos sincronizados, en lugar de las bacterias estandarizadas OP50. Luego se utilizó la misma cepa para alimentar a los gusanos hasta realizar los ensayos conductuales.



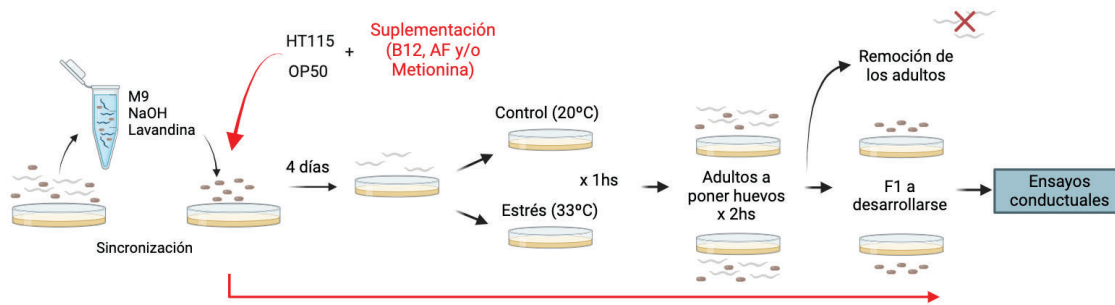
**Figura M3: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado**, mostrando el cambio de cepa bacteriana para el alimentado de los gusanos. Imagen creada en Biorender.

### Suplementación dietaria

Los gusanos fueron crecidos en placas conteniendo mezclas de alimento (cultivo bacteriano) y vitaminas. Las vitaminas fueron B12 (cobalamina) (Glentham) 1 mg/ml, ácido fólico (vitamina B9) (Glentham) 4,4 mg/ml y L-metionina (Sigma) 0,5 mg/ml. La suplementación con vitaminas fue realizada durante todo el tratamiento de estrés, desde la sincronización de los parentales hasta el análisis conductual. Las mezclas fueron diferentes según el protocolo de medición realizado:

- Medición de frecuencia de bombeo: Se utilizó vitamina B12 y ácido fólico. Se realizaron 3 mezclas: una con B12 y cultivo de bacterias, otra con ácido fólico y cultivo de bacterias, y la última con B12, ácido fólico y cultivo de bacterias.
- Medición de intensidad de fluorescencia intestinal: Se utilizó vitamina B12, ácido fólico y metionina. Se realizó una única mezcla con B12, ácido fólico, metionina y cultivo de bacterias.

En ambos casos, se sembraron 60  $\mu$ l de la mezcla respectiva (bacterias más suplemento) en las placas. Además, el control negativo fue el uso de cultivo de bacterias sin vitaminas. El cambio de dieta fue realizado desde el comienzo del protocolo de estrés térmico, como se muestra en la Figura M4. Se agregó una gota de las respectivas mezclas a la placa con huevos sincronizados, en lugar de las bacterias estandarizadas OP50. Luego se utilizó la misma mezcla para alimentar a los gusanos hasta realizar los ensayos conductuales.



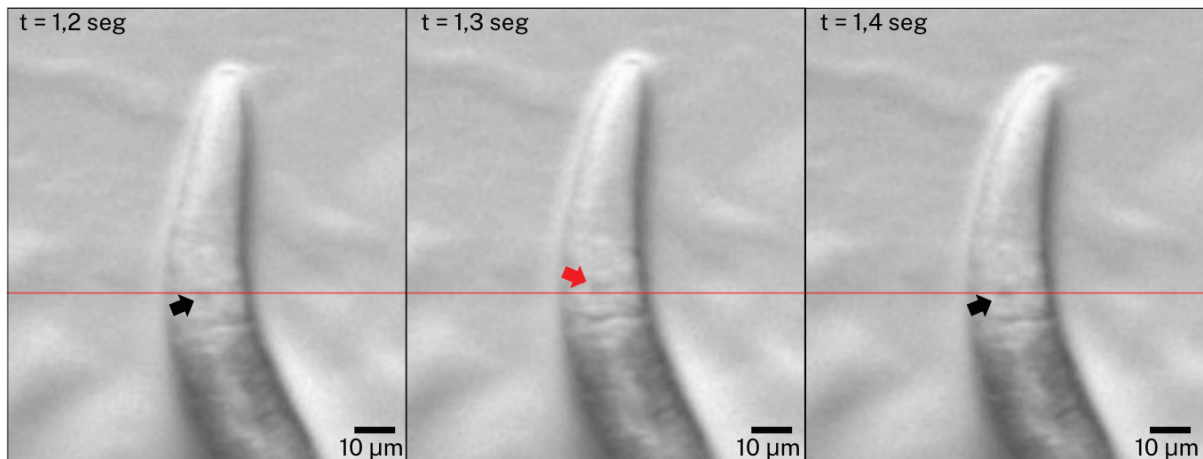
**Figura M4: Protocolo de tratamiento de estrés térmico esquematizado**, mostrando el agregado de suplementación al alimento de los gusanos. Imagen creada en Biorender.

### ***Evaluación de ingesta***

Se realizó mediante las siguientes aproximaciones:

#### **a. Medición de frecuencia de bombeo faríngeo**

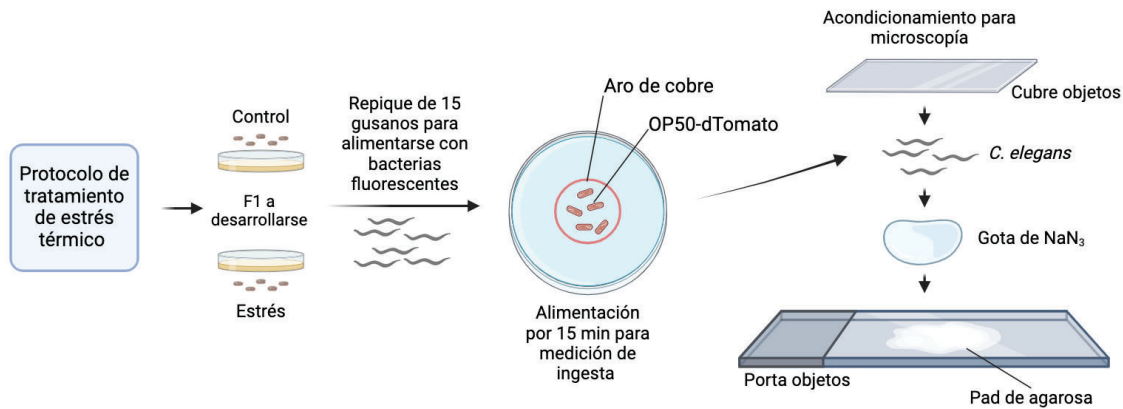
Gusanos adultos de la cepa silvestre N2 provenientes del grupo control o de estrés térmico fueron depositados en placas frescas con NGM-ágar y césped bacteriano (cepa y suplementación dependiente del experimento) y se permitió que se alimentaran por 30 minutos. Pasado ese tiempo, fueron filmados usando una cámara FlyCap (Media Cybernetics) para adquirir una serie de imágenes TIFF con magnificación 40X y 30 fps por 15 segundos (ver video suplementario). Un mínimo de 10 gusanos fueron filmados por condición. La obtención de imágenes fue realizada por la Dra. Eliana Fernandez. El bombeo faríngeo se midió utilizando el software ImageJ y utilizando el movimiento del triturador faríngeo como indicador visual (véase Figura M5). Se contó la frecuencia de bombeo faríngeo para 15 individuos de cada placa, con 3 placas por condición. A partir de los videos, se cuantificó cuantas veces por segundo se desplazó el triturador para obtener la frecuencia de bombeo de cada individuo. La faringe actúa como una bomba muscular que mueve los alimentos hacia el intestino, donde se lleva a cabo la digestión y la absorción de nutrientes. Por lo tanto, a medida que aumenta la frecuencia de bombeo, aumenta la ingesta de alimento de los gusanos.



**Figura M5: Demostración de como se observa un bombeo en imágenes.** Las imágenes son frames con diferencia de 0,1 segundo entre cada una. La línea roja está fijada a la misma altura en todas las imágenes. Las flechas negras indican el triturador en su composición relajada, mientras que la flecha roja indica el triturador en su composición contraída.

#### **b. Medición de intensidad de fluorescencia intestinal**

Gusanos de la cepa silvestre N2 provenientes del grupo control o de estrés térmico fueron transferidos a placas con medio NGM-agar fresco conteniendo 200 µl de cultivo de bacterias (cepa y suplementación dependiente del experimento), rodeado por un aro de cobre (el cobre repele a los gusanos e impide que se alejen de la comida). Se permitió que los gusanos se alimentaran durante 15 minutos. Para su observación al microscopio, se sembró una gota de agarosa 1 % sobre un portaobjetos. Luego, se transfirieron los gusanos sobre el pad de agarosa utilizando un ansa. Debido a que el movimiento de los gusanos impide su visualización, se utilizó  $\text{NaN}_3$  0,2M para inmovilizarlos. Se cubrió cada preparado con un cubreobjetos. Los preparados se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia Nikon E600 con objetivo 10X, aumento final de 40X. Se tomaron imágenes de epifluorescencia y contraste de fase de cada gusano. Un mínimo de 10 gusanos fueron fotografiados por condición. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia intestinal con el programa ImageJ (ver más abajo). Se obtuvo la intensidad de fluorescencia intestinal para 15 individuos de cada placa, con 3 placas por condición. El protocolo completo se esquematiza en la Figura M6. A medida que aumenta la fluorescencia intestinal en *C. elegans*, indica un mayor nivel de ingesta de bacterias fluorescentes, estableciendo una relación donde la intensidad de la fluorescencia está directamente relacionada con la cantidad de alimento consumido.



**Figura M6: Protocolo para medición de intensidad de fluorescencia intestinal.** Imagen creada en Biorender.

### c. Medición de contenido lipídico

Pusimos a punto dos protocolos de medición de contenido lipídico total. En períodos de escasez de nutrientes, los organismos dejan de depender de la glucosa dietética y utilizan los lípidos y aminoácidos almacenados para satisfacer sus demandas energéticas. Los lípidos son liberados como fuente de energía a través de procesos de lipólisis y oxidación de ácidos grasos. Durante la escasez de nutrientes, la ingesta de los organismos se ve alterada, estableciendo así una relación directa entre el contenido lipídico total y la ingesta, de modo que un mayor contenido lipídico implica una mayor ingesta del organismo.

#### Tinción con Nile Red:

Nile red es utilizado para teñir lípidos neutros como triglicéridos o ésteres de colesterol.

Se tomó una placa de NGM conteniendo todos los estadios de gusanos de la cepa silvestre N2 y se colectaron los huevos haciendo uso del método de sincronización de la población. Los huevos se depositaron en una placa fresca de NGM conteniendo OP50 como alimento mezclado con el colorante Nile Red (Invitrogen) 41 ng/mL y se permitió su desarrollo durante 4 días. Luego, se tomó los gusanos hermafroditas adultos y se los dividió en tres grupos: un grupo control; un grupo al que se lo expuso a estrés térmico: una hora de exposición a 33 °C; un grupo al que se privó de alimento por 6 horas, para provocarles hambruna. Además, se colectaron gusanos adultos jóvenes progenie de los gusanos control. De esta manera, todos los gusanos resultantes fueron teñidos haciendo uso del colorante Nile Red, con el cual están en contacto. Al utilizar el colorante mezclado con el alimento, los gusanos lo ingieren y se tiñen las estructuras celulares esféricas del mayor órgano almacenador de lípidos en *C. elegans*, el intestino<sup>189</sup>. Este colorante emite luz fluorescente roja que es utilizada para la observación y cuantificación de lípidos bajo el microscopio de epifluorescencia<sup>190</sup>. Se tomaron imágenes de campo

claro y fluorescencia de cada gusano teñido con esta técnica. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia intestinal con el programa ImageJ (ver más abajo). Se obtuvo la intensidad de fluorescencia intestinal para 3-7 individuos de cada placa, con 1 placa por condición. Se utilizó el protocolo adaptado de O'Rourke<sup>189</sup>.

#### Tinción con Oil Red O:

El Oil Red O es un tinte graso soluble utilizado para colorear triglicéridos y lipoproteínas.

Gusanos de la cepa silvestre N2 provenientes del grupo control o de estrés térmico fueron transferidos de sus cultivos a tubos con 1 ml de PBS-Tween. Se centrifugó a 560 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante dejando 100 µl de pellet. De la misma forma, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween. Se añadió 1 ml de PBS-Paraformaldehído 1% y se lo incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el paraformaldehído. Se añadió 1 ml de PBS y se realizaron 3 rondas de congelado (en nitrógeno líquido) por 10 minutos y descongelado (en termobloque a 37 °C) por 10 minutos. Se descartó el PBS y se añadió isopropanol 60% y se lo incubó por 10 minutos en agitación. Se descartó el isopropanol y se añadieron 600 µl de solución de trabajo de Oil Red O (Glentham) 60% (en isopropanol) y se lo incubó ON en agitación. Se centrifugó a 560 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante dejando 100 µl de pellet. Se añadió 1 ml de PBS y se centrifugó a 560 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante dejando 100 µl de pellet, al cual se le añadió glicerol 100%, para obtener una solución de montado PBS-glicerol 30%. De esta manera, se obtuvieron gusanos teñidos con el colorante Oil Red O. Este tiñe el contenido lipídico de color rojo, permitiendo que sea observado bajo el microscopio de campo claro. Se depositó 1 gota de 20 µl de la solución conteniendo gusanos sobre un portaobjetos y se lo cubrió con un cubreobjetos para ser observado bajo microscopio de campo claro. Se obtuvieron imágenes de campo claro para cada gusano. Un mínimo de 10 gusanos fueron fotografiados por condición, para obtener un protocolo final de tinción. Se utilizó el protocolo adaptado de Escorcía *et al.*<sup>178</sup>.

#### **Análisis de imágenes de microscopía para medición de fluorescencia intestinal**

Para medir intensidad de fluorescencia se seleccionaron regiones de interés (*region of interest*, ROI; por sus siglas en inglés). Sobre la imagen de cada gusano, se trazó una línea que recorre todo el intestino desde la faringe (a partir de la unión faringe-intestino) hasta el ano (ROI 1) y se seleccionó la totalidad del gusano (ROI 1). La ROI 1 se utilizó para la medición de fluorescencia intestinal con OP50-dTomato y la ROI 2 se utilizó para el análisis del contenido lipídico con Nile Red. En cada imagen, se midió la intensidad de fluorescencia total sobre la selección. Luego, se movió la selección hacia el fondo, donde no se encontraba el gusano, y se midió la intensidad de fluorescencia del *background*. Se



normalizó cada medición realizando en cociente, mediante el siguiente cálculo: Intensidad de fluorescencia en el ROI / Intensidad de fluorescencia en el fondo.

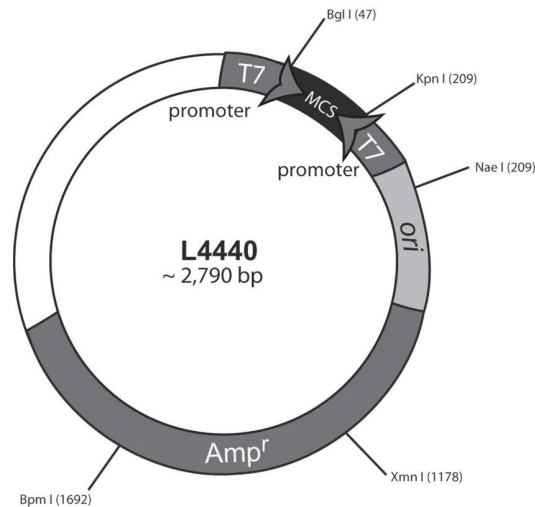
### ***Ovipuesta***

Gusanos de la cepa silvestre N2 hermafroditas adultos, provenientes de un grupo tratado con estrés térmico y un grupo control, fueron depositados en pocillos con medio M9 o con serotonina a una concentración de 35 mM. Los pocillos tenían una forma redondeada que permitió visualizar la cantidad de huevos depositados, ya que estos decantaron hacia el fondo de los mismos. La serotonina activa las neuronas encargadas de controlar los músculos responsables de la postura de los huevos. Después de 60 y 120 minutos, se contaron los huevos bajo la lupa. Se comparó el número de huevos depositados entre el grupo tratado y el de control en presencia o ausencia de serotonina. Cada placa fue evaluada por triplicado en 4 experimentos independientes. Se colocaron 8 gusanos hermafroditas de cada condición por pocillo.

### ***Silenciamiento génico por interferencia de ARN (ARNi)***

Para este ensayo, se utilizó la cepa *rrf-3*, que es *knock-out* para mediadores negativos del ARNi. Un esquema simplificado del protocolo se observa en la Figura M7.

La cepa de bacterias utilizadas es *E. coli* HT115 que contiene el plásmido L4440 (Figura M7). El plásmido en cuestión es un vector de expresión que permite que las bacterias expresen el ARN doble cadena (ARNdc) de interés. Las secuencias codificantes se incluyen en el plásmido sin las regiones 5' y 3' no codificantes (UTR) y bajo el promotor de la polimerasa viral T7. El gen de la polimerasa se encuentra insertado en el genoma bacteriano y es inducible por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, la cepa HT115 no expresa la ARNasa III, lo que evita la degradación del transcripto. En este caso el plásmido se encontraba vacío, para ser utilizado como control. Al momento de realizar la técnica de ARNi se utilizaron cepas de *E. coli* HT115 conteniendo plásmidos que expresaban el ARNdc para el silenciamiento de los genes: *elt-2*, *eat-2*, *nhr-64*, *nhr-35*, *nhr-69*, *ser-1*, *dop-3* y *npr-39*.

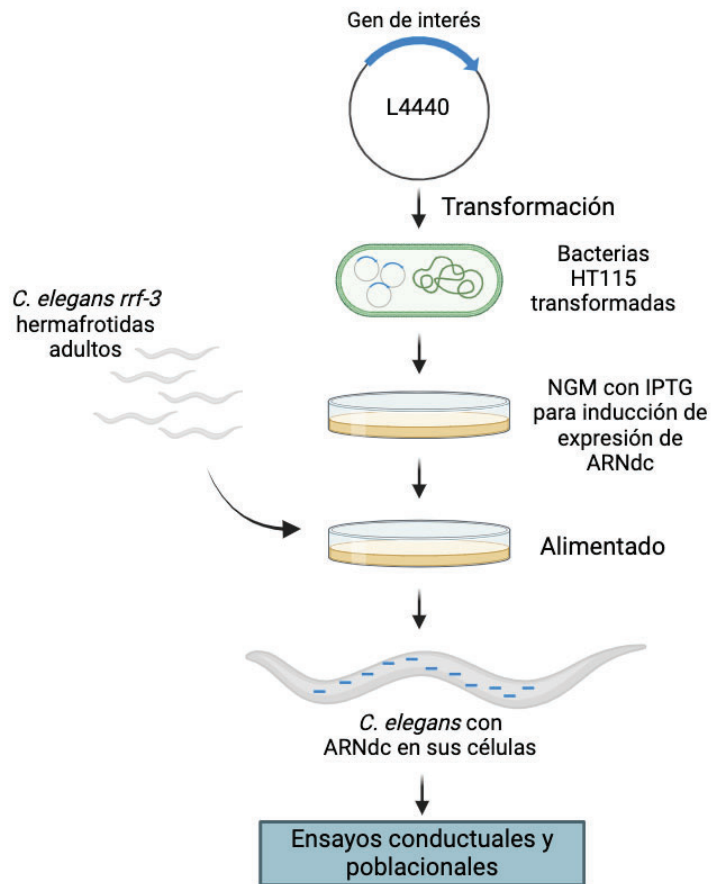


**Figura M7: Vector L4440.** Este vector contiene un sitio de clonación múltiple, donde se insertan las secuencias de los genes que se desea silenciar por esta técnica. La expresión de dichos genes se encuentra regulada por un promotor del virus T7. Tiene resistencia a ampicilina para permitir la selección de las bacterias y la mantención del plásmido.

De esta manera, se realizaron cultivos líquidos de LB-ampicilina-tetraciclina que se inocularon con los diferentes clones de HT115 con los plásmidos de interés. Los cultivos se incubaron *over-night* en agitación a 37°C. Luego, se utilizaron estos cultivos para sembrar placas frescas de NGM con IPTG, para la inducción *over-night* a temperatura ambiente de la expresión de ARNdc. Además se utilizó un cultivo de *E. coli* HT115 con el plásmido L4440 vacío como control negativo y un cultivo de *E. coli* HT115 con el plásmido para expresión del gen *elt-2* como control positivo. Al tercer día, las placas de NGM con bacterias HT115 se utilizaron para realizar el silenciamiento génico en los gusanos. En cada placa se depositaron de 5 a 8 gusanos hermafroditas adultos jóvenes de la cepa *rrf-3*. Se permitió que los mismos se alimentaran durante 4 días. Pasado ese tiempo se realizaron los análisis conductuales y poblacionales.

Bacterias *E. coli* HT115 que expresaban el ARNdc de interés o control fueron cultivadas en placas conteniendo LB-agar con ampicilina 100 mg/ml y tetraciclina 12.5 µg/ml a 37 °C ON. Luego se realizó un cultivo líquido a partir de una única colonia, se usó medio LB conteniendo ampicilina 100 mg/ml y se lo creció a 37 °C ON. Se sembraron 150 µL del cultivo en placas de NGM-agar para ARNi, suplementado con ampicilina 100 mg/ml e IPTG (Glentham) 1M (el IPTG induce la expresión del ARNdc). Las placas fueron secadas ON a temperatura ambiente para permitir la inducción de la expresión del ARNdc. Luego, gusanos L4 y hermafroditas adultos jóvenes sincronizados se transfirieron a las placas de NGM sembrado con bacterias para ARNi. Se los incubó a 20 °C y se esperó a que los gusanos pusieran huevos y estos maduraran hasta el estadio L4. En este punto se realizaron

los análisis conductuales y poblacionales. Para todos los experimentos se utilizó una cepa *E. coli* HT115 conteniendo el vector L4440 sin inserto como control negativo.



**Figura M8: Esquema simplificado de la técnica de silenciamiento génico por ARN por alimentado.**

*Imagen creada en Biorender.*

### ***Análisis estadístico de los datos***

Los gráficos se generaron con el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, California, USA). Se utilizó un intervalo de confianza de 5%. Los test estadísticos utilizados para cada figura se indican en el epígrafe de la misma, junto con el valor *p*.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Brenner, S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 : 71-94 May 1974.
2. Klapper, M., Findeis, D., Koefeler, H. & Döring, F. Methyl group donors abrogate adaptive responses to dietary restriction in *C. elegans*. *Genes Nutr.* **11**, 4 (2016).
3. Monteleone, M. C. *et al.* Prenatal stress changes the glycoprotein GPM6A gene expression and induces epigenetic changes in rat offspring brain. *Epigenetics* **9**, 152–160 (2014).
4. Alfonso, J. *et al.* Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 659–666 (2004).
5. De Kloet, E. R., Joëls, M. & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 463–475 (2005).
6. Kim, J. J. & Diamond, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 453–462 (2002).
7. Li, S. *et al.* Chronic mild stress impairs cognition in mice: From brain homeostasis to behavior. *Life Sci.* **82**, 934–942 (2008).
8. McEwen, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biol. Psychiatry* **48**, 721–731 (2000).
9. McEwen, B. S. & Magarinos, A. M. Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* **16**, S7–S19 (2001).
10. Brunson, K. L., Chen, Y., Avishai-Eliner, S. & Baram, T. Z. Stress and the Developing Hippocampus: A Double-Edged Sword? *Mol. Neurobiol.* **27**, 121–136 (2003).
11. Alfonso, J. *et al.* Regulation of Hippocampal Gene Expression Is Conserved in Two Species Subjected to Different Stressors and Antidepressant Treatments. *Biol. Psychiatry* **59**, 244–251 (2006).
12. Aparicio, G. I., Formoso, K., León, A., Frasnch, A. C. & Scorticati, C. Identification of Potential Interacting Proteins With the Extracellular Loops of the Neuronal Glycoprotein M6a by TMT/MS. *Front. Synaptic Neurosci.* **12**, 28 (2020).
13. León, A., Aparicio, G. I. & Scorticati, C. Neuronal Glycoprotein M6a: An Emerging Molecule in Chemical Synapse Formation and Dysfunction. *Front. Synaptic Neurosci.* **13**, 661681 (2021).
14. Alfonso, J., Fernández, M. E., Cooper, B., Flugge, G. & Frasnch, A. C. The stress-regulated protein M6a is a key modulator for neurite outgrowth and filopodium/spine formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 17196–17201 (2005).
15. Formoso, K., García, M. D., Frasnch, A. C. & Scorticati, C. Evidence for a role of glycoprotein M6a in dendritic spine formation and synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* **77**, 95–104 (2016).
16. Formoso, K., García, M. D., Frasnch, A. C. & Scorticati, C. Filopodia formation driven by membrane glycoprotein M6a depends on the interaction of its transmembrane domains. *J. Neurochem.* **134**, 499–512 (2015).
17. Brocco, M. A., Fernández, M. E. & Frasnch, A. C. C. Filopodial protrusions induced by glycoprotein M6a exhibit high motility and aids synapse formation. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 195–202 (2010).
18. Schweitzer, J., Becker, T., Schachner, M., Nave, K.-A. & Werner, H. Evolution of myelin proteolipid proteins: Gene duplication in teleosts and expression pattern divergence. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 161–177 (2006).
19. Fuchsova, B., Alvarez Juliá, A., Rizavi, H. S., Frasnch, A. C. & Pandey, G. N. Altered expression of neuroplasticity-related genes in the brain of depressed suicides. *Neuroscience* **299**, 1–17 (2015).
20. Monteleone, M. C., Billi, S. C., Brocco, M. A. & Frasnch, A. C. Neural glycoprotein M6a is released in extracellular vesicles and modulated by chronic stressors in blood. *Sci. Rep.* **7**, 9788 (2017).
21. Monteleone, M. C. *et al.* Search of brain-enriched proteins in salivary extracellular vesicles for their use as mental disease biomarkers: A pilot study of the neuronal glycoprotein M6a. *J. Affect. Disord. Rep.* **1**, 100003 (2020).
22. Gregor, A. *et al.* Altered *GPM6A/M6* Dosage Impairs Cognition and Causes Phenotypes Responsive to Cholesterol in Human and *Drosophila*. *Hum. Mutat.* **35**, 1495–1505 (2014).
23. Zappia, M. P., Brocco, M. A., Billi, S. C., Frasnch, A. C. & Ceriani, M. F. M6 Membrane Protein Plays an Essential Role in *Drosophila* Oogenesis. *PLoS ONE* **6**, e19715 (2011).
24. Zappia, M. P. *et al.* A role for the membrane protein M6 in the *Drosophila* visual system. *BMC Neurosci.* **13**, 78 (2012).
25. Fernández, E. M. *et al.* Neuronal membrane glycoprotein (*nmgp-1*) gene deficiency affects chemosensation-related

- behaviors, dauer exit and egg-laying in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurochem.* **160**, 234–255 (2022).
26. Sinha, R. Role of addiction and stress neurobiology on food intake and obesity. *Biol. Psychol.* **131**, 5–13 (2018).
  27. Anorexia Nervosa Genetics Initiative *et al.* Genome-wide association study identifies eight risk loci and implicates metabo-psychiatric origins for anorexia nervosa. *Nat. Genet.* **51**, 1207–1214 (2019).
  28. Johnson, J. S. *et al.* Mapping anorexia nervosa genes to clinical phenotypes. *Psychol. Med.* **53**, 2619–2633 (2023).
  29. Paolacci, S. *et al.* Genetic contributions to the etiology of anorexia nervosa: New perspectives in molecular diagnosis and treatment. *Mol. Genet. Genomic Med.* **8**, e1244 (2020).
  30. Cao-Lei, L. *et al.* DNA methylation mediates the impact of exposure to prenatal maternal stress on BMI and central adiposity in children at age 13½ years: Project Ice Storm. *Epigenetics* **10**, 749–761 (2015).
  31. Schroeder, M. *et al.* LAT1-dependent placental methionine uptake is a key player in fetal programming of metabolic disease. *Metabolism* **153**, 155793 (2024).
  32. Hemberger, M., Dean, W. & Reik, W. Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 526–537 (2009).
  33. Jin, B., Li, Y. & Robertson, K. D. DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? *Genes Cancer* **2**, 607–617 (2011).
  34. Anderson, O. S., Sant, K. E. & Dolinoy, D. C. Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 853–859 (2012).
  35. Clare, C. E., Brassington, A. H., Kwong, W. Y. & Sinclair, K. D. One-Carbon Metabolism: Linking Nutritional Biochemistry to Epigenetic Programming of Long-Term Development. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **7**, 263–287 (2019).
  36. Qadota, H. *et al.* Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* **400**, 166–173 (2007).
  37. Introduction | Department of Molecular Life Sciences | UZH.  
<https://www.mls.uzh.ch/en/research/hajnal/research/introduction.html>.
  38. Avery, L. & Shtonda, B. B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J. Exp. Biol.* **206**, 2441–2457 (2003).
  39. Mango, S. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook* (2007) doi:10.1895/wormbook.1.129.1.
  40. Tattersall, G. J. *et al.* Coping with Thermal Challenges: Physiological Adaptations to Environmental Temperatures. in *Comprehensive Physiology* (ed. Prakash, Y. S.) 2151–2202 (Wiley, 2012). doi:10.1002/cphy.c110055.
  41. Anderson, J. L., Albergotti, L., Ellebracht, B., Huey, R. B. & Phillips, P. C. Does thermoregulatory behavior maximize reproductive fitness of natural isolates of *Caenorhabditis elegans*? *BMC Evol. Biol.* **11**, 157 (2011).
  42. Schulenburg, H. & Félix, M.-A. The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **206**, 55–86 (2017).
  43. Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **200**, 387–407 (2015).
  44. Altun, ZF and Hall, D.H. Introduction. in *WormAtlas* (2009).
  45. Cao, J. *et al.* Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism. *Science* **357**, 661–667 (2017).
  46. Hammarlund, M., Hobert, O., Miller, D. M. & Sestan, N. The CeNGEN Project: The Complete Gene Expression Map of an Entire Nervous System. *Neuron* **99**, 430–433 (2018).
  47. Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. & Thomson, J. N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **100**, 64–119 (1983).
  48. Sulston, J. E. & Horvitz, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**, 110–156 (1977).
  49. Horvitz, H. R., Chalfie, M., Trent, C., Sulston, J. E. & Evans, P. D. Serotonin and Octopamine in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science* **216**, 1012–1014 (1982).
  50. Trent, C. Genetic and behavioral studies of the egg-laying system in *Caenorhabditis elegans*. *Massachusetts Institute of Technology* (1983).
  51. Cassada, R. C. & Russell, R. L. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **46**, 326–342 (1975).
  52. Leon Avery. *C. elegans* feeding. in *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* (Pasadena (CA), 2005).
  53. Shtonda, B. B. & Avery, L. Dietary choice behavior in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Biol.* **209**, 89–102 (2006).
  54. Mango, S.E. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis (January 22, 2007), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.129.1, <http://www.wormbook.org>.

55. Harris, J. E. & Crofton, H. D. Structure and Function in the Nematodes: Internal Pressure and Cuticular Structure in *Ascaris*. *J. Exp. Biol.* **34**, 116–130 (1957).
56. Avery, L. & Horvitz, H. R. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron* **3**, 473–485 (1989).
57. Avery, L. & Horvitz, H. R. A cell that dies during wild-type *C. elegans* development can function as a neuron in a *ced-3* mutant. *Cell* **51**, 1071–1078 (1987).
58. Girard LR, *et al.* WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. Epub 2006 Nov 11. PMID: 17099225; PMCID: PMC1669767.
59. Xiao, R. *et al.* RNAi Interrogation of Dietary Modulation of Development, Metabolism, Behavior, and Aging in *C. elegans*. *Cell Rep.* **11**, 1123–1133 (2015).
60. Urrutia, A. *et al.* Bacterially produced metabolites protect *C. elegans* neurons from degeneration. *PLoS Biol.* **18**, e3000638 (2020).
61. Brooks, K. K., Liang, B. & Watts, J. L. The Influence of Bacterial Diet on Fat Storage in *C. elegans*. *PLoS ONE* **4**, e7545 (2009).
62. Lai, C.-H., Chou, C.-Y., Ch'ang, L.-Y., Liu, C.-S. & Lin, W. Identification of Novel Human Genes Evolutionarily Conserved in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Proteomics. *Genome Res.* **10**, 703–713 (2000).
63. Harris, T. W. WormBase: a multi-species resource for nematode biology and genomics. *Nucleic Acids Res.* **32**, 411D – 417 (2004).
64. White, J. G. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, Vol. 314, No. 1165, (Nov. 12, 1986), pp. 1-340
65. Witting, M. & Schmitt-Kopplin, P. The *Caenorhabditis elegans* lipidome. *Arch. Biochem. Biophys.* **589**, 27–37 (2016).
66. Hulme, S. E. *et al.* Lifespan-on-a-chip: microfluidic chambers for performing lifelong observation of *C. elegans*. *Lab Chip* **10**, 589–597 (2010).
67. Samara, C. *et al.* Large-scale in vivo femtosecond laser neurosurgery screen reveals small-molecule enhancer of regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18342–18347 (2010).
68. Stoeckius, M. *et al.* Large-scale sorting of *C. elegans* embryos reveals the dynamics of small RNA expression. *Nat. Methods* **6**, 745–751 (2009).
69. Kamath, R. S. *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231–237 (2003).
70. Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science*. 1998 Oct 16;282(5388):430-1. doi: 10.1126/science.282.5388.430. PMID: 9841401.
71. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in. **391**, (1998).
72. Timmons, L., Court, D. L. & Fire, A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. (2001).
73. Rual, J.-F. *et al.* Toward Improving *Caenorhabditis elegans* Phenome Mapping With an ORFeome-Based RNAi Library. *Genome Res.* **14**, 2162–2168 (2004).
74. Mendel, J. E. *et al.* Participation of the Protein G<sub>o</sub> in Multiple Aspects of Behavior in *C. elegans*. *Science* **267**, 1652–1655 (1995).
75. Tesis Doctoral Fernandez Eliana: “Estudio de la función del gen *nmgp-1* de *Caenorhabditis elegans*: análisis de la respuesta al estrés y su utilidad para modelar enfermedades neuropsiquiátricas”.
76. McEwan, D. L., Weisman, A. S. & Hunter, C. P. Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. *Mol. Cell* **47**, 746–754 (2012).
77. Kennedy, S., Wang, D. & Ruvkun, G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* **427**, 645–649 (2004).
78. Simmer, F. *et al.* Loss of the Putative RNA-Directed RNA Polymerase RRF-3 Makes *C. elegans* Hypersensitive to RNAi. *Curr. Biol.* **12**, 1317–1319 (2002).
79. Davis, K. C. & Raizen, D. M. A mechanism for sickness sleep: lessons from invertebrates. *J. Physiol.* **595**, 5415–5424 (2017).
80. Jorgensen EM. GABA. in *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* (Pasadena (CA), 2005).
81. Rand JB. Acetylcholine. in *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* (Pasadena (CA), 2007).

82. Loer, CM§ & Rand, JB. The Evidence for Classical Neurotransmitters in *Caenorhabditis elegans*. in *WormAtlas* (2022).
83. Altun, Z.F. and Hall, D.H. Nervous system, general description. in *WormAtlas* (2011).
84. Bargmann, C.I. Chemosensation in *C. elegans*. in (October 25, 2006).
85. Goodman, M. B. & Sengupta, P. The extraordinary AFD thermosensor of *C. elegans*. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **470**, 839–849 (2018).
86. Lamitina, T., Huang, C. G. & Strange, K. Genome-wide RNAi screening identifies protein damage as a regulator of osmoprotective gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 12173–12178 (2006).
87. Vidal-Gadea, A. *et al.* Magnetosensitive neurons mediate geomagnetic orientation in *Caenorhabditis elegans*. *eLife* **4**, e07493 (2015).
88. Sawin, E. R., Ranganathan, R. & Horvitz, H. R. *C. elegans* Locomotory Rate Is Modulated by the Environment through a Dopaminergic Pathway and by Experience through a Serotonergic Pathway. *Neuron* **26**, 619–631 (2000).
89. Bargmann, C. I. Genetic and Cellular Analysis of Behavior in *C. Elegans*.
90. Hobson, R. J. *et al.* SER-7, a *Caenorhabditis elegans* 5-HT7-like Receptor, Is Essential for the 5-HT Stimulation of Pharyngeal Pumping and Egg Laying. *Genetics* **172**, 159–169 (2006).
91. Raizen, D. M., Lee, R. Y. & Avery, L. Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**, 1365–1382 (1995).
92. Brenner, I. R., Raizen, D. M. & Fang-Yen, C. Pharyngeal timing and particle transport defects in *Caenorhabditis elegans* feeding mutants. *J. Neurophysiol.* **128**, 302–309 (2022).
93. Trojanowski, N. F., Raizen, D. M. & Fang-Yen, C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Sci. Rep.* **6**, 22940 (2016).
94. Essers, M. A. G. *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* **23**, 4802–4812 (2004).
95. Zhang, S. *et al.* FoxO3a Modulates Hypoxia Stress Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *PLoS ONE* **8**, e80342 (2013).
96. Lant, B. & Storey, K. B. An Overview of Stress Response and Hypometabolic Strategies in *Caenorhabditis elegans* : Conserved and Contrasting Signals with the Mammalian System. *Int. J. Biol. Sci.* 9–50 (2010) doi:10.7150/ijbs.6.9.
97. Brunet, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011–2015 (2004).
98. Rodriguez, M., Snoek, L. B., De Bono, M. & Kammenga, J. E. Worms under stress: *C. elegans* stress response and its relevance to complex human disease and aging. *Trends Genet.* **29**, 367–374 (2013).
99. Kyriakou, E., Taouktsi, E. & Syntichaki, P. The Thermal Stress Coping Network of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 14907 (2022).
100. Ashburner, M. & Bonner, J. J. The induction of gene activity in drosophila by heat shock. *Cell* **17**, 241–254 (1979).
101. Feder, M. E. & Hofmann, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 243–282 (1999).
102. Morimoto, R. I. The heat shock response: systems biology of proteotoxic stress in aging and disease. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **76**, 91–99 (2011).
103. Hartl, F.-U., Hlodan, R. & Langer, T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 20–25 (1994).
104. Hobert, O. PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *BioTechniques* **32**, 728–730 (2002).
105. Kourtis, N., Nikolettou, V. & Tavernarakis, N. Small heat-shock proteins protect from heat-stroke-associated neurodegeneration. *Nature* **490**, 213–218 (2012).
106. Murphy, C. T. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: Approaches and discoveries. *Exp. Gerontol.* **41**, 910–921 (2006).
107. Chiang, W.-C., Ching, T.-T., Lee, H. C., Mousigian, C. & Hsu, A.-L. HSF-1 Regulators DDL-1/2 Link Insulin-like Signaling to Heat-Shock Responses and Modulation of Longevity. *Cell* **148**, 322–334 (2012).
108. Chen, L. *et al.* Investigation into the communication between unheated and heat-stressed *Caenorhabditis elegans* via volatile stress signals. *Sci. Rep.* **13**, 3225 (2023).
109. Plagens, R. N., Mossiah, I., Kim Guisbert, K. S. & Guisbert, E. Chronic temperature stress inhibits reproduction and

- disrupts endocytosis via chaperone titration in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol.* **19**, 75 (2021).
110. Wan, Q.-L. *et al.* N<sup>6</sup>-methyldeoxyadenine and histone methylation mediate transgenerational survival advantages induced by hormetic heat stress. *Sci. Adv.* **7**, eabc3026 (2021).
  111. Knight, A. L. Characterization of the Responses to Chronic Stress in *Caenorhabditis elegans*.
  112. McCarroll, S. A., Feng, G. & Hyman, S. E. Genome-scale neurogenetics: methodology and meaning. *Nat. Neurosci.* **17**, 756–763 (2014).
  113. Dwyer, D. S. Crossing the Worm-Brain Barrier by Using *Caenorhabditis elegans* to Explore Fundamentals of Human Psychiatric Illness. *Complex Psychiatry* **3**, 170–179 (2017).
  114. Cowan, W. M., Kopnisky, K. L. & Hyman, S. E. The human genome project and its impact on psychiatry. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**, 1–50 (2002).
  115. Gottesman, I. I. & Moldin, S. O. Schizophrenia genetics at the millennium: cautious optimism. *Clin. Genet.* **52**, 404–407 (1997).
  116. Sall, S., Thompson, W., Santos, A. & Dwyer, D. S. Analysis of Major Depression Risk Genes Reveals Evolutionary Conservation, Shared Phenotypes, and Extensive Genetic Interactions. *Front. Psychiatry* **12**, 698029 (2021).
  117. Cooper, J. F. & Van Raamsdonk, J. M. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *J. Park. Dis.* **8**, 17–32 (2018).
  118. Harrington, A. J., Hamamichi, S., Caldwell, G. A. & Caldwell, K. A. *C. elegans* as a model organism to investigate molecular pathways involved with Parkinson's disease. *Dev. Dyn.* **239**, 1282–1295 (2010).
  119. Kyriakakis, E., Markaki, M. & Tavernarakis, N. *Caenorhabditis elegans* as a model for cancer research. *Mol. Cell. Oncol.* **2**, e975027 (2015).
  120. Rea, S. L., Graham, B. H., Nakamaru-Ogiso, E., Kar, A. & Falk, M. J. Bacteria, yeast, worms, and flies: Exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev. Disabil. Res. Rev.* **16**, 200–218 (2010).
  121. Wiese, M., Antebi, A. & Zheng, H. Intracellular Trafficking and Synaptic Function of APL-1 in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **5**, e12790 (2010).
  122. Markaki, M. & Tavernarakis, N. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnol. J.* **5**, 1261–1276 (2010).
  123. Hasler, G., Drevets, W. C., Manji, H. K. & Charney, D. S. Discovering Endophenotypes for Major Depression. *Neuropsychopharmacology* **29**, 1765–1781 (2004).
  124. Padrão, G., Mallorquí, A., Cucurell, D., Marco-Pallares, J. & Rodriguez-Fornells, A. Neurophysiological differences in reward processing in anhedonics. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* **13**, 102–115 (2013).
  125. Dagenhardt, J. *et al.* Insulin Signaling Deficiency Produces Immobility in *Caenorhabditis elegans* That Models Diminished Motivation States in Man and Responds to Antidepressants. *Complex Psychiatry* **3**, 97–107 (2017).
  126. Anderson, R. J., Freedland, K. E., Clouse, R. E. & Lustman, P. J. The Prevalence of Comorbid Depression in Adults With Diabetes. *Diabetes Care* **24**, 1069–1078 (2001).
  127. Gupta, D., Kurhe, Y. & Radhakrishnan, M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiol. Behav.* **129**, 73–78 (2014).
  128. Naß, J., Kampf, C. J. & Efferth, T. Increased Stress Resistance and Lifespan in *Caenorhabditis elegans* Wildtype and Knockout Mutants—Implications for Depression Treatment by Medicinal Herbs. *Molecules* **26**, 1827 (2021).
  129. Aguirre-Chen, C. *et al.* A *Caenorhabditis elegans* Model for Integrating the Functions of Neuropsychiatric Risk Genes Identifies Components Required for Normal Dendritic Morphology. *G3 GenesGenomesGenetics* **10**, 1617–1628 (2020).
  130. Collier, D. A. *et al.* promoter polymorphism and anorexia nervosa.
  131. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1).pdf.
  132. Jimerson, D. C. & Wolfe, B. E. Neuropeptides in Eating Disorders. *CNS Spectr.* **9**, 516–522 (2004).
  133. Yulyaningsih, E., Zhang, L., Herzog, H. & Sainsbury, A. NPY receptors as potential targets for anti-obesity drug development. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 1170–1202 (2011).
  134. Dwyer, D. S., Donohoe, D., Lu, X.-H. & Aamodt, E. J. Mechanistic connections between glucose/lipid disturbances and weight gain induced by antipsychotic drugs. *Int. Rev. Neurobiol.* **65**, 211–247 (2005).
  135. Pawlowski, G. J. Cyproheptadine: weight-gain and appetite stimulation in essential anorexic adults. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* **18**, 673–678 (1975).
  136. Wirshing, D. A. *et al.* Novel antipsychotics: comparison of weight gain liabilities. *J. Clin. Psychiatry* **60**, 358–363 (1999).



137. Elle, I. C., Olsen, L. C. B., Pultz, D., Rødkær, S. V. & Færgeman, N. J. Something worth dyeing for: Molecular tools for the dissection of lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.* **584**, 2183–2193 (2010).
138. Pang, S., Lynn, D. A., Lo, J. Y., Paek, J. & Curran, S. P. SKN-1 and Nrf2 couples proline catabolism with lipid metabolism during nutrient deprivation. *Nat. Commun.* **5**, 5048 (2014).
139. Weinshenker, D., Garriga, G. & Thomas, J. Genetic and pharmacological analysis of neurotransmitters controlling egg laying in *C. elegans*. *J. Neurosci.* **15**, 6975–6985 (1995).
140. Waggoner, L. E., Zhou, G. T., Schafer, R. W. & Schafer, W. R. Control of Alternative Behavioral States by Serotonin in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **21**, 203–214 (1998).
141. Niacaris, T. & Avery, L. Serotonin regulates repolarization of the *C. elegans* pharyngeal muscle. *J. Exp. Biol.* **206**, 223–231 (2003).
142. Chase, D. L. & Koelle, M. R. Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. *Wormbook* 1–15 (2007) doi:10.1895/wormbook.1.132.1.
143. Lam, A. B., Kervin, K. & Tanis, J. E. Vitamin B12 impacts amyloid beta-induced proteotoxicity by regulating the methionine/S-adenosylmethionine cycle. *Cell Rep.* **36**, 109753 (2021).
144. Lynn, D. A. *et al.* Omega-3 and -6 fatty acids allocate somatic and germline lipids to ensure fitness during nutrient and oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 15378–15383 (2015).
145. McKay, J. P., Raizen, D. M., Gottschalk, A., Schafer, W. R. & Avery, L. *eat-2* and *eat-18* Are Required for Nicotinic Neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* Pharynx. *Genetics* **166**, 161–169 (2004).
146. Avery, L. The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **133**, 897–917 (1993).
147. *ser-1* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.  
[https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00004776#0-9f6b7hc1deg84-10-18](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004776#0-9f6b7hc1deg84-10-18).
148. Liang, B., Ferguson, K., Kadyk, L. & Watts, J. L. The Role of Nuclear Receptor NHR-64 in Fat Storage Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **5**, e9869 (2010).
149. *nhr-69* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.  
[https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00003659#0-9f6b7hc1deg84-10-18](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00003659#0-9f6b7hc1deg84-10-18).
150. Hani, E. H. *et al.* A Missense Mutation in Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$ , Resulting in a Reduced Transactivation Activity, in Human Late-onset Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus.
151. *nhr-35* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.  
[https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00003628#0-9f6b7hc1deg84-10-18](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00003628#0-9f6b7hc1deg84-10-18).
152. *dop-3* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.  
[https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00020506#0-9f6b7hc1deg84-10-18](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00020506#0-9f6b7hc1deg84-10-18).
153. González, L. M., Mota-Zamorano, S., García-Herráiz, A., López-Nevado, E. & Gervasini, G. Genetic variants in dopamine pathways affect personality dimensions displayed by patients with eating disorders. *Eat. Weight Disord. - Stud. Anorex. Bulim. Obes.* **26**, 93–101 (2021).
154. Gershkovich, M. M., Groß, V. E., Kaiser, A. & Prömel, S. Pharmacological and functional similarities of the human neuropeptide Y system in *C. elegans* challenges phylogenetic views on the FLP/NPR system. *Cell Commun. Signal.* **17**, 123 (2019).
155. *mod-5* (gene) - WormBase : Nematode Information Resource.  
[https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/WBGene00003387#0-9f6b7hc1deg84-10-18](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00003387#0-9f6b7hc1deg84-10-18).
156. Anorexia Nervosa disease: MalaCards - Research Articles, Drugs, Genes, Clinical Trials.  
[https://www.malacards.org/card/anorexia\\_nervosa?search=anorexia#sources](https://www.malacards.org/card/anorexia_nervosa?search=anorexia#sources).
157. Albert Hubbard, E. J. & Schedl, T. Biology of the *Caenorhabditis elegans* Germline Stem Cell System. *Genetics* **213**, 1145–1188 (2019).
158. S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells - PMC.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3274352/>.
159. Schedl, T. & Kimble, J. *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **119**, 43–61 (1988).
160. Södersten, P., Bergh, C. & Zandian, M. Understanding eating disorders. *Horm. Behav.* **50**, 572–578 (2006).
161. Fukushige, T., Hawkins, M. G. & McGhee, J. D. The GATA-Factor *elt-2* Is Essential for Formation of the *Caenorhabditis elegans* Intestine.
162. Block, D. H. S. *et al.* The Developmental Intestinal Regulator *ELT-2* Controls p38-Dependent Immune Responses in

Adult *C. elegans*. *PLoS Genet.* **11**, e1005265 (2015).

163. McGhee, J. D. *et al.* The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. *Dev. Biol.* **302**, 627–645 (2007).
164. Rodríguez-Palero, M. J. *et al.* An automated method for the analysis of food intake behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Rep.* **8**, 3633 (2018).
165. Raizen, D., Song, B.-M., Trojanowski, N. & You, Y.-J. Methods for measuring pharyngeal behaviors. *Wormbook* 1–13 (2012) doi:10.1895/wormbook.1.154.1.
166. Soukas, A. A., Kane, E. A., Carr, C. E., Melo, J. A. & Ruvkun, G. Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **23**, 496–511 (2009).
167. You, Y., Kim, J., Cobb, M. & Avery, L. Starvation activates MAP kinase through the muscarinic acetylcholine pathway in *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Cell Metab.* **3**, 237–245 (2006).
168. Avery, L. & Horvitz, H. R. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* **253**, 263–270 (1990).
169. Franco, A. Y. & Longart, M. Aplicaciones de la proteína verde fluorescente (GFP) en la biología celular y en la visualización del sistema nervioso. **1**, (2009).
170. Zhang, N. *et al.* The *C. elegans* Intestine As a Model for Intercellular Lumen Morphogenesis and In Vivo Polarized Membrane Biogenesis at the Single-cell Level: Labeling by Antibody Staining, RNAi Loss-of-function Analysis and Imaging. *J. Vis. Exp.* 56100 (2017) doi:10.3791/56100.
171. Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M. & Wang, D. Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response. *Chemosphere* **93**, 2289–2296 (2013).
172. Shen, L., Hu, Y., Cai, T., Lin, X. & Wang, D. Regulation of longevity by genes required for the functions of AIY interneuron in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 732–738 (2010).
173. Shen, L.-L., Du, M., Lin, X.-F., Cai, T. & Wang, D.-Y. Genes required for the functions of olfactory AWA neuron regulate the longevity of *Caenorhabditis elegans* in an insulin/IGF signaling-dependent fashion. *Neurosci. Bull.* **26**, 91–103 (2010).
174. Hua, X., Feng, X., Liang, G., Chao, J. & Wang, D. Long-term exposure to tire-derived 6-PPD quinone causes intestinal toxicity by affecting functional state of intestinal barrier in *Caenorhabditis elegans*. *Sci. Total Environ.* **861**, 160591 (2023).
175. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572 (2004).
176. Matz, M. V. *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**, 969–973 (1999).
177. Zhang, Y. *et al.* Comparative genomics and functional study of lipid metabolic genes in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **14**, 164 (2013).
178. Escorcía, W., Ruter, D. L., Nhan, J. & Curran, S. P. Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *J. Vis. Exp.* 57352 (2018) doi:10.3791/57352.
179. Greenspan, P., Mayer, E. P. & Fowler, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J. Cell Biol.* **100**, 965–973 (1985).
180. Kim, K. W. & Jin, Y. Neuronal responses to stress and injury in *C. elegans*. *FEBS Lett.* **589**, 1644–1652 (2015).
181. Keowkase, R., Aboukhatwa, M. & Luo, Y. Fluoxetine protects against amyloid-beta toxicity, in part via daf-16 mediated cell signaling pathway, in *Caenorhabditis elegans*. *Neuropharmacology* **59**, 358–365 (2010).
182. Hazzard, V. M., Loth, K. A., Hooper, L. & Becker, C. B. Food Insecurity and Eating Disorders: a Review of Emerging Evidence. *Curr. Psychiatry Rep.* **22**, 74 (2020).
183. Fisher, J. O. & Birch, L. L. Early experience with food and eating: Implications for the development of eating disorders. in *Body image, eating disorders, and obesity in youth: Assessment, prevention, and treatment* 23–39 (American Psychological Association, Washington, DC, US, 2001). doi:10.1037/10404-001.
184. Stuhr, N. L. & Curran, S. P. Bacterial diets differentially alter lifespan and healthspan trajectories in *C. elegans*. *Commun. Biol.* **3**, 653 (2020).
185. Viri, V., Cornaglia, M., Atakan, H. B., Lehnert, T. & Gijs, M. A. M. An *in vivo* microfluidic study of bacterial transit in *C. elegans* nematodes. *Lab. Chip* **20**, 2696–2708 (2020).

186. Song, B. & Avery, L. Serotonin Activates Overall Feeding by Activating Two Separate Neural Pathways in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **32**, 1920–1931 (2012).
187. Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A. & Cerón, J. Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *J. Vis. Exp.* 4019 (2012) doi:10.3791/4019.
188. De Rosa, M. J. *et al.* The flight response impairs cytoprotective mechanisms by activating the insulin pathway. *Nature* **573**, 135–138 (2019).
189. O'Rourke, E. J., Soukas, A. A., Carr, C. E. & Ruvkun, G. C. *elegans* Major Fats Are Stored in Vesicles Distinct from Lysosome-Related Organelles. *Cell Metab.* **10**, 430–435 (2009).
190. Horobin, R. & Kiernan, J. Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine. in (2002).

## ANEXO

**Tabla Suplementaria 1:** Listado de genes seleccionados, con su respectivo código y el código del clon bacteriano que contiene el plásmido de expresión de dicho gen.

Gen	Código del gen	Código del clon bacteriano
<i>eat-2</i>	Y48B6A.4	II - 9E17
<i>ser-1</i>	F59C12.2	F59C6.2
<i>nhr-64</i>	C45E1.1	I - 1M14
<i>nhr-69</i>	T23H4.2	I - 4N18
<i>nhr-35</i>	C07A12.3	X- 2P13
<i>dop-3</i>	T14E8.3	No existe clon bacteriano
<i>npr-39</i>	F57A8.4	V - 7A13
<i>mod-5</i>	Y54E10BR.7	I - 9A20
<i>rsks-1</i>	Y47D3A.16	III - 8C23
<i>fog-2</i>	Y113G7B.5	No existe clon bacteriano

**Video Suplementario 1:** Video de un gusano *C. elegans* hermafrodita adulto control alimentándose de césped de bacterias *E. coli* OP50. Video representativo de los utilizados para medir la frecuencia de bombeo faríngeo.

[https://drive.google.com/file/d/1cHucz3krifaYbjoe0B91L\\_mOBqMFaGDw/view?usp=sharing](https://drive.google.com/file/d/1cHucz3krifaYbjoe0B91L_mOBqMFaGDw/view?usp=sharing)

Dejo constancia de que esta corresponde a la última versión de la tesis de licenciatura titulada “EL ESTRÉS DURANTE EL DESARROLLO COMO FACTOR DE RIESGO PARA ENFERMEDADES NEUROPSIQUIÁTRICAS: EVALUACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA INGESTA EN EL MODELO DEL GUSANO *C. ELEGANS*” y que incluye las correcciones sugeridas por el jurado.



Firma del Alumno



Marcela A. Brocco

Firma del Director