

338896



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EL EFECTO DEL MEDIO AMBIENTE
SOBRE LA APOPTOSIS EN LA LÍNEA
GERMINAL DEL NEMÁTODO
Caenorhabditis elegans”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ANA CECILIA VÁZQUEZ CAMACHO



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR
2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
GUATEMALA

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "El efecto del medio ambiente sobre la apoptosis en la línea germinal del nemátodo Caenorhabditis elegans".

realizado por Ana Cecilia Vázquez Camacho

con número de cuenta 9518603-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
 Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Rosa Estela Navarro González

Rosa Navarro

Propietario

Dr. Ernesto Maldonado Olvera

[Firma]

Propietario

Dra. Luisa Alba Lois

Luisa Alba

Suplente

Biól. Lenin David Ochoa de la Paz

[Firma]

Suplente

Biól. Carlos Leonardo Peraza Reyes

[Firma]

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

[Firma]
 M.C. Juan Manuel Rodríguez Chavez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
 DE BIOLOGÍA

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Agradecemos al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), donativo IN217102 por su apoyo para la realización de este trabajo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Ana Cecilia
Vizquez Camacho
FECHA: 22. de Noviembre 2019
FIRMA: [Firma]

Dedicatorias

A mis padres,

...por ser mi fuente de inspiración y fortaleza. Así como por su gran pasión por la vida que admiro y amo. Gracias por dejarme volar sin perderme de vista.

A mis hermanos,

...Guillermo, Marisol (q.e.p.d) y Paula por su amor incondicional en todo momento de mi loca vida. Especialmente con mucho cariño a Marisol por ser el sol que ilumina nuestro universo.

A Luis,

...por su apoyo incondicional y amor que me dio fortaleza y confianza para seguir adelante. Gracias por ser parte de mi vida.

A todos mis amigos,

...por todos los buenos momentos que disfrutamos juntos, por las carcajadas y el entusiasmo que me han brindado.

Agradecimientos

...A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología Celular por permitirme aprender en estas grandes instituciones.

...A la Dra. Rosa Navarro por aceptar dirigir este proyecto, por su apoyo así como por todas sus valiosas aportaciones y todo el tiempo dedicado a éste trabajo.

...Al Dr. Ernesto Maldonado por la revisión de éste trabajo, todas las sugerencias y comentarios durante la realización del mismo.

...A la Dra. Luisa Alba, al Biól. Lenin Ochoa y al Biól. Carlos Leonardo Peraza por aceptar ser parte del jurado y por el tiempo dedicado a la revisión de éste trabajo.

La importancia del arte es cinco por ciento de inspiración y noventa y cinco por ciento de esfuerzo.

Pablo Picasso.

Í N D I C E

RESUMEN	1
1.INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.El nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> como un modelo de estudio.....	2
1.2. Células germinales	4
1.3. Línea germinal en <i>C.elegans</i>	4
1.3.1. Anatomía y desarrollo de la línea germinal	4
1.4. Apoptosis en <i>C.elegans</i>	7
1.5. Apoptosis en la línea germinal de <i>C.elegans</i>	9
1.6. Apoptosis en la línea germinal de <i>C.elegans</i> inducida por el daño al ADN.	11
1.7. Apoptosis en la línea germinal de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1.8. La línea germinal de <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.9. Apoptosis en la línea germinal de los mamíferos.....	15
2.HIPÓTESIS	17
3.OBJETIVO GENERAL	17
3.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
4.MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1. Mantenimiento de los nemátodos y cepas empleadas.....	18
4.2. Sincronización de los cultivos de <i>C.elegans</i>	19
4.3. Tratamiento de nemátodos en diferentes condiciones de tensión.....	19
4.3.1. Choque de calor.....	19

4.3.2. Tensión por metales.....	20
4.3.3. Tensión osmótica.....	20
4.3.4. Tensión oxidativa.....	20
4.3.5. Restricción nutricional	21
4.4. Ensayo de muerte celular.....	21
4.5. Nuevas condiciones.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
5.1. Tensión oxidativa.....	23
5.2. Tensión osmótica.....	27
5.3. Choque de calor.....	28
5.4. Tensión por metales.....	30
5.5. Restricción nutricional.....	31
5.6. La tensión oxidativa produce apoptosis.....	35
6. CONCLUSIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

RESUMEN

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de muerte celular que elimina células como parte de la vida normal de un organismo multicelular por medio de una maquinaria específica. La apoptosis se inicia por una variedad de estímulos entre los que se encuentran la privación de factores de crecimiento esenciales, tratamientos con glucocorticoides, radiación de rayos gamma y activación de ciertos receptores.

La apoptosis de las células germinales en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* es necesaria para mantener la homeostásis de la línea germinal. Sin embargo, agentes genotóxicos parecen provocar la inducción de la apoptosis en células germinales. Con el fin de conocer si los estímulos externos o el medio ambiente afecta la apoptosis de la línea germinal de *C. elegans* se probaron *in vivo* distintas condiciones de tensión tales como: tensión oxidativa, osmótica, choque de calor, restricción nutricional y metales. Después del estímulo de tensión se utilizó el colorante vital, anaranjado de acridina, que se intercala en los ácidos nucleicos y que nos permite identificar células en apoptosis.

Durante la realización de este trabajo, encontramos que la tensión oxidativa inducida por el compuesto químico paraquat induce muerte celular de las células germinales. Sin embargo, fue imposible visualizar un incremento en la apoptosis debido a choque de calor, tensión osmótica, metales o restricción nutricional.

El precisar si los estímulos externos o el medio ambiente afectan la muerte celular programada nos adentra en un campo de investigación que nos permite, mediante estudios específicos, determinar el efecto en la viabilidad de las células germinales expuestas a compuestos químicos como el paraquat que es utilizado como fertilizante o los metales que pueden tener un efecto tóxico.

I. I N T R O D U C C I Ó N

1.1. EL NEMÁTODO *Caenorhabditis elegans* COMO UN MODELO DE ESTUDIO

En 1963, Sydney Brenner decidió darle un giro a su línea de investigación. Esto fue en consecuencia a que diez años antes se había descubierto la estructura del ADN, con lo cual, supuso, estaban o serían contestados muchos problemas "clásicos" de la biología molecular. Brenner decidió estudiar otros campos de la biología y eligió la biología del desarrollo y el sistema nervioso. Parte del éxito de los biólogos moleculares de esa época fue debido al uso de organismos simples que pudieron manipular en gran número, como las bacterias y los virus. Brenner decidió seguir el mismo patrón y eligió un organismo de fácil manipulación en el que se pueden llevar a cabo análisis genéticos. El organismo que escogió como modelo de estudio fue el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, el cual es un organismo multicelular de tan solo 1 mm de largo, con un ciclo de vida corto (tres días a 20° C), transparente y que puede cultivarse en grandes cantidades. El nemátodo *C. elegans* puede ser hermafrodita, que se reproduce por autofertilización, o ser fertilizado por algún macho. Aunque solo tiene 959 células, el organismo posee sistema digestivo, excretor, nervioso, muscular y reproductor. Una de sus mayores ventajas es que el nemátodo es transparente [1].

Algunos científicos de la época fueron persuadidos por Brenner para utilizar como modelo de estudio a *C. elegans*. Entre los que destacan John Sulston y Robert Horvitz. Sulston comenzó por determinar el contenido nuclear del nemátodo e identificar el destino de cada célula. De esta manera se definió el linaje de todas y cada una de las células que conforman este organismo. Esto fue logrado por la transparencia del embrión y por la corta duración del desarrollo embrionario que es de tan solo 14 horas. Con estas observaciones en 1983 Sulston y sus colaboradores publicaron el patrón completo de divisiones celulares que dan origen al nemátodo (Fig. 1).

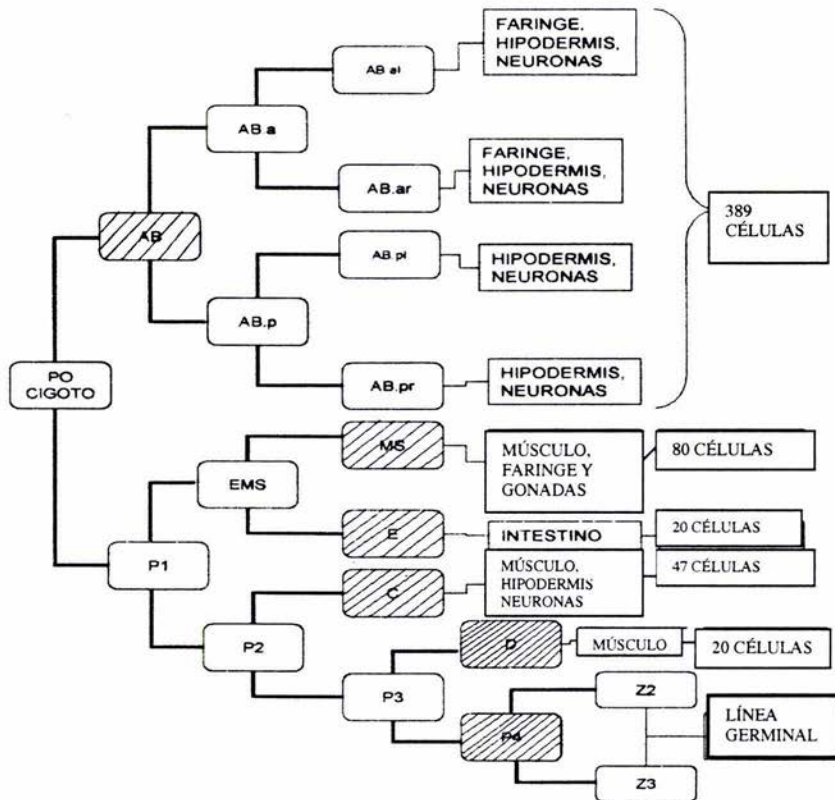


FIG. 1 LINAJE CELULAR. C. ELEGANS

FIGURA 1. Células fundadoras del nemátodo *C. elegans*. Durante las primeras divisiones del cigoto se producen las células fundadoras (AB, MS, E, C, D y P4) que dan origen a los tejidos indicados. Las casillas sombreadas indican las células fundadoras. Modificado de Gilbert, 2003 [2].

Durante su investigación observaron que siempre las mismas células morían durante la embriogénesis y adoptaron el término de muerte celular programada o apoptosis. Sulston y Horvitz utilizaron la genética para aislar una serie de mutantes que afectaran el proceso de la apoptosis. Para nuestra sorpresa ellos identificaron los genes involucrados en la apoptosis de todos los seres vivos [3]. Esto demuestra que resolver una pregunta compleja utilizando a un organismo

simple, nos puede llevar al descubrimiento de vías conservadas en todos los organismos y ayudarnos a entender como es que las células funcionan.

1.2. CÉLULAS GERMINALES

La función de la línea germinal es la de producir espermatozoides y ovocitos, quienes al unirse generan un nuevo individuo. Las células germinales difieren fundamentalmente de las células somáticas pues experimentan un ciclo celular especializado, la meiosis, en la cual los gametos haploides se forman a partir de células diploides. Por otra parte, son células madre ya que a partir de ellas se puede formar cada tejido del individuo y son inmortales al poder dar origen a una nueva generación de individuos, esto asegura la propagación de la información genética [1].

En muchas especies de animales, la línea germinal está predeterminada por proteínas y mensajeros de ARN específicos localizados en el citoplasma (los mamíferos son la excepción a la regla aunque las proteínas que componen este citoplasma están conservadas) [1].

1.3. LÍNEA GERMINAL EN *C. elegans*

1.3.1. ANATOMÍA Y DESARROLLO DE LA LÍNEA GERMINAL

El sistema reproductor del hermafrodita consiste de una gónada bilobulada dispuesta simétricamente, un lóbulo se extiende anteriormente y el otro posteriormente y se encuentran unidos en el centro por el útero (Fig. 2.A). La gónada es un sincicio en donde los núcleos están rodeados por membranas parciales, por convención a estos núcleos y sus membranas parciales se les denomina células germinales. La parte distal (la más alejada al útero) contiene células en mitosis, conforme las células se alejan de la punta distal entran en

meiosis. Las primeras 40 células que entran en meiosis forman 160 espermatozoides, los cuales son almacenados en la espermateca.

Una vez que se formaron los espermatozoides, la producción de ovocitos se inicia en la curva de cada brazo de la gónada [1]. Los ovocitos se acumulan en la parte proximal de la gónada, en donde se detienen en la primera fase de la meiosis. Señales provenientes de los espermatozoides hacen madurar a los ovocitos, los cuales se desplazan por contracciones de las células somáticas que rodean a las células germinales hacia la espermateca. Aquí son fertilizados e inmediatamente después se completa la meiosis. La espermateca de cada brazo se conecta a un útero común, en donde los embriones son depositados (Fig. 3.A). El útero se conecta al exterior a través de la vulva, la cual sobresale visiblemente de la superficie ventral del adulto [1].

La gónada del macho consiste de un solo brazo, y a diferencia del hermafrodita, la parte distal tiene dos células distales dirigiendo la mitosis (Fig. 3.B). La meiosis se completa a lo largo del tubo de la línea germinal. Los espermatozoides se acumulan en la vesícula seminal y se liberan durante la copulación a través del vaso deferente a la cloaca (Fig. 2.B) [1].

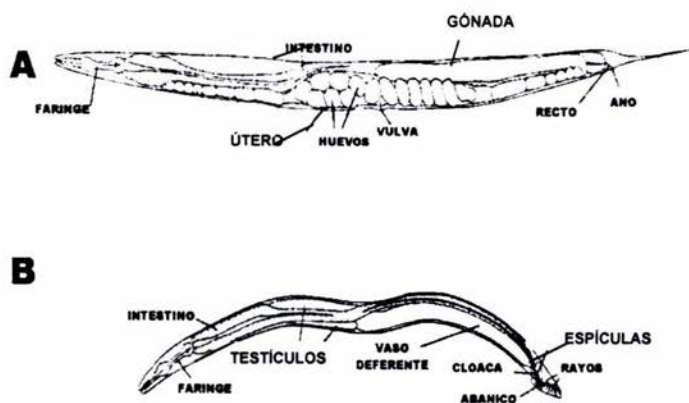


FIGURA 2. Representación esquemática de las estructuras anatómicas de *C. elegans* en el hermafrodita adulto (A) y macho adulto (B). Modificado de Wood, 1988 [1].

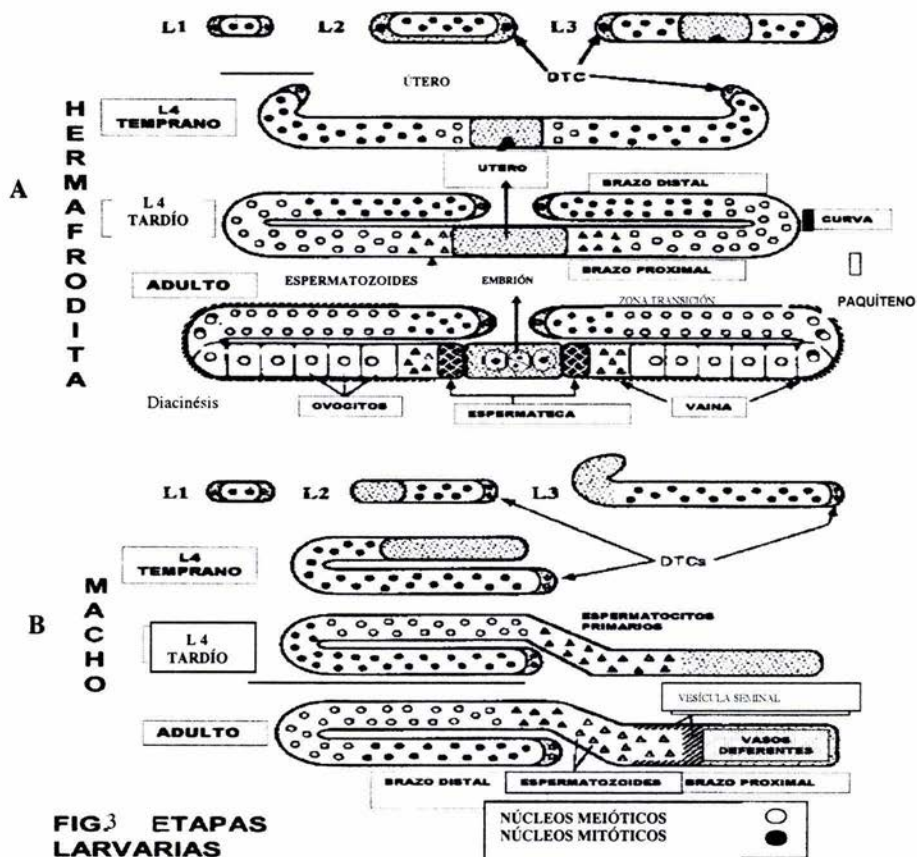


FIG.3 ETAPAS LARVIARIAS

FIGURA 3. Gonadogénesis en las diferentes etapas larvarias del *C.elegans* hermafrodita (A) y del macho (B). (A) Se observa la secuencia de eventos que ocurren durante la ovogénesis. En la gónada del hermafrodita adulto las células germinales en mitosis, llamadas "núcleos mitóticos" (círculos cerrados), se localizan en el brazo distal y al moverse pasan por la "zona de transición", en la cual entran a la profase I de la meiosis (círculos abiertos); enseguida, en la curva de la gónada se encuentran células en la fase de paquíteno. En el brazo proximal, las células germinales entran a la etapa de diacinesis y posteriormente serán celularizadas e iniciaran el crecimiento del ovocito. Por otro lado, en la gónada del macho adulto (B) se localizan los "núcleos mitóticos" en el brazo distal y a continuación están los "núcleos en profase meiótica" que posteriormente formarán los espermatoцитos primarios (triángulos cerrados). En el brazo proximal se encuentran los espermatozoides (triángulos abiertos). Modificado de Wood, 1988 [1].

1.4. APOPTOSIS EN *C. elegans*

La apoptosis es una forma de eliminación de células que implica un programa de muerte celular intrínseco. La apoptosis fue observada por primera vez durante la metamorfosis de un anfibio en 1842 [4]. Esto fue posteriormente visto en muchos tejidos en el desarrollo de los invertebrados y los vertebrados. En 1972, Kerr y sus colegas [4] introducen el término apoptosis para distinguir la muerte celular programada de la muerte celular patológica y la necrosis, las cuales ocurren en lesiones traumáticas agudas. La necrosis es un tipo de muerte celular que ocurre en respuesta a procesos patológicos iniciados fuera de la célula. Esto usualmente ocurre en el centro de una lesión. La célula tiende a hincharse, romperse y como resultado ocurre una reacción inflamatoria. Esta forma de muerte celular no implica la activación de procesos celulares intrínsecos y muchas veces daña a las células vecinas. En contraste, durante la apoptosis la célula disminuye su tamaño, condensa el ADN y las macromoléculas se degradan por proteasas específicas llamadas caspasas (por proteasas de aspartil cisteinas) y nucleasas específicas. Como resultado, los desechos celulares son fagocitados rápidamente por sus células vecinas o macrófagos y esto previene una respuesta inflamatoria así como la muerte de más células [4].

La apoptosis fue originalmente definida por sus alteraciones morfológicas durante la muerte celular. La secuencia de eventos que fueron distinguidos son los siguientes:

- 1) Condensación de la cromatina y fragmentación del ADN.
- 2) Ruptura del núcleo.
- 3) La formación de los cuerpos apoptóticos que son estructuras refráctiles a la luz.
- 4) Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o células vecinas.

La muerte celular programada puede ser disparada por una variedad de estímulos entre los que se encuentran la privación de factores de crecimiento

esenciales, tratamientos con glucocorticoides, radiación de rayos gamma y activación de ciertos receptores [5].

La apoptosis ha sido conservada en los organismos multicelulares a través de la evolución. Debido a que es un importante regulador homeostático de los tejidos del desarrollo embrionario y del adulto, así como un mecanismo de defensa para el control de la estabilidad genómica en respuesta a daños patológicos [4].

Durante el desarrollo de *C. elegans*, 131 células mueren por apoptosis para dejar un total de 959 células en el adulto. Mediante estudios genéticos en *C. elegans* se han identificado algunos genes que controlan aspectos fundamentales en el proceso y ejecución de la muerte celular programada en todos los organismos. A la serie de mutantes deficientes en el proceso de apoptosis se les denominó *ced* por "cell death" y entre ellas destacan mutantes en la única caspasa presente en *C. elegans* (*ced-3*), el gen activador de la caspasa (*ced-4*), el homólogo de la proteína antiapoptótica Bcl2 (*ced-9*), la proteína pro-apoptótica con dominio BH3 (*egl-1*) y la proteína que degrada el ADN (*nuc-1*). También se encontraron siete genes involucrados en la degradación de los cuerpos apoptóticos (*ced-1*, *ced-2*, *ced-5*, *ced-6*, *ced-7*, *ced-10*, *ced-12*) que cuales participan en dos vías independientes de apoptosis: una que envía la señal de degradación y otra que organiza el citoesqueleto para favorecer la apoptosis [6]. La actividad de la caspasa CED-3 es indispensable para la apoptosis clásica de *C. elegans*. La proteína antiapoptótica CED-9 (homóloga de Bcl-2) mantiene unida a la proteasa CED-4 de manera que evita la maduración de CED-3. Para que se inicie la apoptosis, la proteína pro-apoptótica EGL-1 debe secuestrar a CED-9, liberando así a CED-4 que proteolisa al zimógeno pro-CED-3 y lo convierte en su forma madura CED-3. Lo anterior se explica en el esquema de la figura 4.

El desarrollo embrionario en *C. elegans*, incluyendo el destino de las células que mueren por apoptosis, es muy consistente: la identidad de las células apoptóticas y el tiempo en el cual estas células mueren son invariantes entre individuos. Este rasgo hace al nemátodo un sistema ideal para el estudio de la muerte celular programada [1].

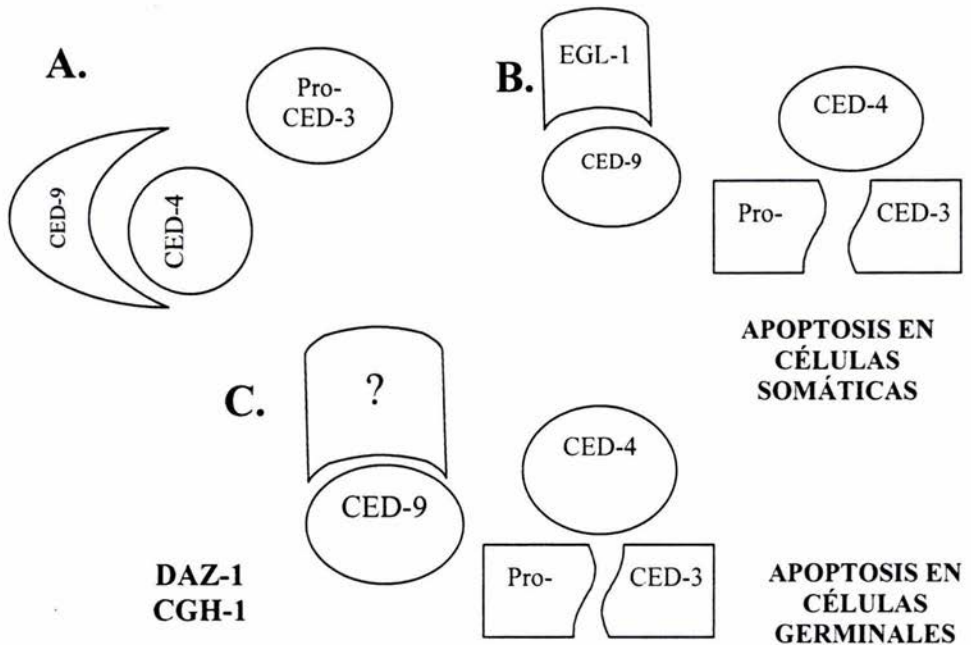


FIGURA 4. Genes involucrados en la apoptosis de *C.elegans*. A) La proteína CED-9 (homóloga de BCL-2) mantiene unida a la proteasa CED-4 evitando la maduración de CED-3. B) Para que se inicie la apoptosis de las células somáticas. La proteína proapoptótica EGL-1 secuestra a CED-9 liberando a CED-4 que proteoliza al zimógeno pro-CED-3 convirtiéndolo en su forma madura CED-3. C) En las células germinales, no se sabe quien secuestra a CED-9 pero se conoce que esta involucrado DAZ-1 y CGH-1.

1.5. APOPTOSIS EN LA LINEA GERMINAL DE *C. elegans*

La muerte celular programada forma parte del proceso de ovogénesis en *C. elegans* y se le conoce como muerte celular fisiológica. La cinética de la muerte es muy similar a la que ocurre en las células somáticas, en donde los cuerpos apoptóticos de las células germinales son rápidamente reconocidos y fagocitados, en este caso, por las células de la vaina (de origen somático). Los cuerpos apoptóticos desaparecen rápidamente (en una hora) desde el momento en que

son detectados por primera vez y se estima que más de la mitad de las células germinales del *C. elegans* mueren durante la ovogénesis [7].

Poco se sabe del mecanismo que regula la muerte celular fisiológica; sin embargo, sabemos que utiliza la misma maquinaria que la muerte en las células somáticas, por ejemplo; requiere a la caspasa CED-3 y su proteína activadora CED-4 (Fig.4), la degradación de los cuerpos apoptóticos se basa en los mismos genes y se previene por CED-9 (el homólogo de BCL-2). La diferencia más importante es que la muerte celular fisiológica se activa por un mecanismo independiente de la proteína EGL-1. En las mutaciones de pérdida de función en *egl-1* (*n1084 n3082*), no puede ocurrir apoptosis durante el desarrollo embrionario y el gusano se forma con un mayor número de células; sin embargo, la apoptosis sigue ocurriendo en la gónada. Este resultado sugiere que existe otra proteína capaz de desactivar a la proteína antiapoptótica BCL-2 (Fig.4C) [7].

Para que se lleve a cabo la apoptosis en la línea germinal se requiere que las células germinales completen la fase de meiosis conocida como paquíteno. Mutantes en cualquiera de los componentes de la vía ras/MAPK (LET-60 Ras, LIN-45 Raf y MPK MAPK/ERK) provocan que las células germinales se detengan en paquíteno y no ocurra la muerte celular fisiológica. No se sabe a ciencia cierta si estas mutaciones participan en la vía de señalización de la muerte celular fisiológica o simplemente detienen el progreso de las células germinales en su paso por la meiosis y como consecuencia bloquean la apoptosis [7].

El gen *cgh-1* de *C.elegans*, que codifica para una helicasa de ARN, es expresado específicamente en la línea germinal del nemátodo y protege a las células germinales de morir por apoptosis. Una mutación en *cgh-1* provoca esterilidad en hermafroditas debido a que todos los ovocitos mueran por apoptosis [8]. Se sabe que CGH-1 interacciona con la maquinaria de regulación de la traducción de los mensajeros (Navarro y Blackwell, datos no publicados). Otro gen involucrado en la muerte celular fisiológica es *daz-1* (del inglés deleted in azoospermia), el cual también es específico a la línea germinal y se expresa durante la meiosis. La pérdida de la función de *daz-1* causa la esterilidad en

hermafroditas ya que bloquea la ovogénesis en la fase de paquíteno en donde todas las células se mueren por apoptosis [9].

Una posible razón para el incremento de los cuerpos apoptóticos en nemátodos mutantes en *daz-1* es que las células germinales que son incapaces de salir de la fase de paquíteno en cierto periodo de tiempo sean destinadas a la muerte celular [9].

En los mutantes de los genes *ced-3* y *ced-4*, en donde no hay muerte celular, las células germinales destinadas a morir forman más ovocitos de menor tamaño, lo que sugiere que la muerte celular fisiológica es una manera de eliminar el exceso de células germinales, donando el contenido de su citoplasma a los ovocitos que sobreviven o actuando como células nodrizas durante la ovogénesis [7]. La muerte de células germinales es particularmente abundante en nemátodos viejos sugiriendo que la apoptosis en células germinales también puede desarrollarse como un mecanismo de control de la calidad de los ovocitos o como una respuesta a condiciones ambientales no favorables.

1.6. APOPTOSIS EN LA LÍNEA GERMINAL DE *C. elegans* INDUCIDA POR EL DAÑO AL ADN.

La muerte de las células germinales es independiente de estímulos externos y es necesaria para mantener la homeostasis de la línea germinal [7]. Sin embargo, agentes genotóxicos parecen provocar la inducción de la apoptosis en células germinales y la paralización del ciclo mitótico de éstas [10]. En los mamíferos, una pieza necesaria para regular la respuesta a agentes genotóxicos (rayos gamma, ultravioleta, etc.) es el gen p53, que con gran frecuencia se encuentra mutado en el cáncer de los humanos. El gen *cep-1* es homólogo de p53, el cual es requerido para inducir la apoptosis por el daño al ADN en la línea germinal de *C. elegans*. Sin embargo, la inhibición de la expresión de *cep-1* por ARN de interferencia (ARNi) no afecta la muerte celular programada que ocurre

durante el desarrollo del nemátodo, ni de la muerte celular fisiológica de la línea germinal [11,12].

Otro gen involucrado es el gen *ape-1* (de sus siglas en inglés apoptotic enhancer 1) que codifica para la proteína Ce-iASPP, homóloga a la familia inhibitoria de ASPP la cual es activadora de p53 en mamíferos. Se ha demostrado que la inhibición de *ape-1* por ARNi incrementa el número de células germinales apoptóticas [13]. El principal papel de Ce-iASPP es el de inhibir la actividad proapoptótica de *cep-1*, normalmente estimulado en respuesta a agentes genotóxicos [11].

La apoptosis inducida por el daño al ADN y por los agentes genotóxicos, parece ser regulada por una vía distinta a la “muerte fisiológica de células germinales” [7].

En forma similar, las mutaciones en los genes *rad-5*, *him-7* y *mrt-2* que son punto de vigilancia durante el ciclo celular, previenen la apoptosis inducida por el daño al ADN pero no la muerte fisiológica [10].

Estos datos son consistentes con la hipótesis de que la muerte fisiológica de las células germinales no es el resultado de un extenso daño a las células germinales, más bien de un programa encargado de eliminar el exceso de células germinales [7]. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que una pequeña fracción de las células germinales mueran debido a la activación de genes de vigilancia que responden a los daños al ADN [10].

1.7. APOPTOSIS EN LA LÍNEA GERMINAL DE *Drosophila melanogaster*.

En la ovogénesis de *Drosophila*, las células troncales de la línea germinal se dividen asimétricamente, una célula continúa como célula troncal y otra llega a ser cistoblasto. En cada cistoblasto ocurren cuatro divisiones mitóticas dando lugar a un racimo de 16 células rodeadas por un epitelio folicular de origen mesodermal, formando la cámara del huevo [14]. Estas divisiones son incompletas y dan como resultado que las 16 células germinales queden interconectadas por una serie de

puentes citoplasmáticos, por los cuales el citoplasma puede fluir libremente y formando un sincicio. De las 16 células una (la mejor conectada por puentes citoplasmáticos) se desarrolla como ovocito y las otras 15 funcionan como células nodrizas. Durante la ovogénesis la mayoría de las células foliculares se reacomodan para formar un epitelio columnar alrededor del ovocito en crecimiento, algunas células foliculares llegan a tener una forma escamosa y quedan sobre las células nodrizas. Las células nodrizas continúan la síntesis de ADN, por lo que se vuelven poliploides. Este evento juega un papel importante en el desarrollo de los ovocitos pues existe una mayor producción de componentes citoplasmáticos que se requieren para el desarrollo embrionario temprano y la preservación de la línea germinal. Una red de filamentos de actina y miosina permite la transferencia del citoplasma de las células nodrizas al ovocito. La ovogénesis se puede dividir en 14 etapas (Fig. 5), durante las etapas 1 a 10, el flujo del citoplasma es continuo y durante la etapa 10 B/11, todo el citoplasma de las células nodrizas se transporta al ovocito en un periodo de 30 minutos. En las etapas 12 y 13, las células nodrizas se mueren por apoptosis y el ovocito prosigue su maduración [14].

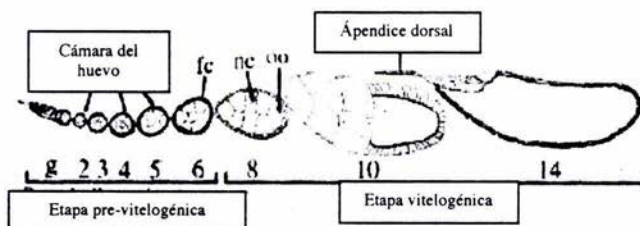


FIGURA. 5 Etapas de la ovogénesis en el ovario de *Drosophila melanogaster*. Las células troncales se encuentran dentro del germarium (g), una estructura localizada en la parte anterior del ovario, su progenie se mueve hacia la parte posterior del mismo donde pasarán por catorce etapas. Algunas células se convertirán en células foliculares (fc) mientras que otras serán células nodrizas (nc) que proveerán componentes citoplasmáticos necesarios para el desarrollo del ovocito (oo). Modificado de Drummond-Barbosa y cols. 2001 [16].

La falta de la caspasa DCP-1 en *Drosophila* produce esterilidad en las hembras ya que las células nodrizas no se mueren y en consecuencia el ovocito no completa su formación. Las células nodrizas de las mutantes de *dcp-1* tienen defectos en la reorganización del citoesqueleto y de la ruptura del núcleo que normalmente acompaña el proceso de apoptosis. El fenotipo de la mutante *dcp-1* sugiere que el citoesqueleto y los eventos nucleares en las células nodrizas participan en la apoptosis, que es un evento necesario para el desarrollo del ovocito [16].

1.8. LA LÍNEA GERMINAL DE *Drosophila melanogaster* RESPONDE A CAMBIOS NUTRICIONALES

En *Drosophila melanogaster* se ha identificado un nuevo punto de control en la región 2a/2b (región donde las células foliculares comienzan a desarrollarse en cistos de la línea germinal) (Fig.6) que puede servir para inducir o detener la apoptosis dependiendo de las condiciones nutricionales. Los cistos pueden ser programados para morir en la región 2a/2b si son insuficientes las células foliculares alrededor de éste, si su lámina folicular es anormal o si su progresión se detiene. Este "punto de control" balancea la producción de cistos en la línea germinal y en las células foliculares. Cuando los nutrientes son limitados, el "punto de control" puede ser activado más frecuentemente debido al alto índice de células germinales comparado con la producción de células somáticas. La producción de huevos por el ovario en *Drosophila* depende de varias cosas, como son; la disponibilidad de proteínas, péptidos sexuales, hormonas juveniles y hormonas esteroideas [15]. La reducción de la proliferación de las células germinales en condiciones de alimentación pobre o deficiente en proteínas puede ser explicado por altos niveles de apoptosis. Esto se ha corroborado ya que se han observado con frecuencia grupos de células apoptóticas cerca de las regiones 2a/2b en las condiciones de alimentación limitada [15].

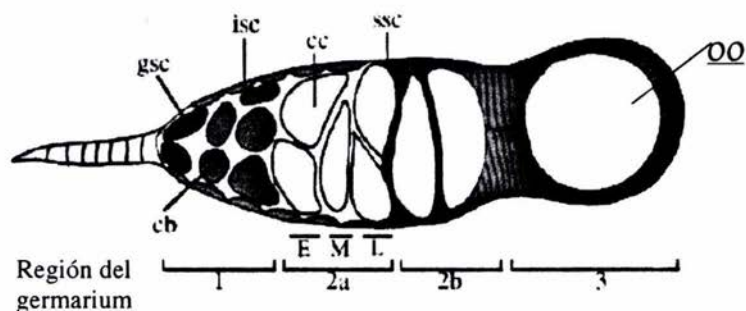


FIGURA 6. Región del gerarium de *Drosophila melanogaster* donde se ubican los cistoblastos (cb) derivados de las células troncales germinales (gsc) las cuales se dividen 4 veces para formar los 16 cistos de la línea germinal (cc) que se ubican en la región 2a temprana (E) del gerarium. En la región 1 se encuentran las células de la vaina (isc) que adquieren una monocapa de células foliculares derivadas de las células troncales somáticas (ssc). La parte más posterior de la línea germinal se convertirá en los ovocitos (oo), mientras que 15 células serán células nodrizas. Modificado de Drummond-Barbosa y cols. 2001 [16].

1.9. APOPTOSIS EN LA LINEA GERMINAL DE LOS MAMÍFEROS

En todos los vertebrados conocidos, las hembras nacen con menos ovocitos que el número máximo presente durante la ovogénesis temprana. El hecho es que se ha estimado que $2/3$ de la reserva de las células germinales se pierden después del nacimiento en las ratas, los ratones y los humanos, dando como resultado una disminución de ovogonias y ovocitos. Usando una amplia variedad de técnicas, incluyendo valoraciones morfológicas, ensayos de fragmentación del ADN; varios laboratorios independientemente confirmaron que la apoptosis está involucrada en la muerte celular en la línea germinal [17].

El primer gen involucrado en la apoptosis de los ovocitos es *bcl-2*, que es miembro de una familia de genes anti-apoptóticos y pro-apoptóticos. Los miembros de la familia de Bcl-2 juegan un papel importante en la determinación del destino de las células germinales ya que están encargados de enviar un estímulo de sobrevivencia o de muerte a la mitocondria para continuar o reprimir la ejecución de la apoptosis. Si la apoptosis es elegida, el citocromo c es liberado de

la mitocondria y se dispara la cascada de caspasas a través de la oligomeración de Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas) [17].

En las hembras del ratón con una mutación en el gen *bcl-2* se ha encontrado una reducción significativa del número de ovocitos contenidos en sus folículos primordiales en comparación con los de hembras silvestres. Esto sugiere que *bcl-2* contribuye en la muerte de las células germinales en los mamíferos [17].

La caracterización de Bcl-2 como una proteína que funciona en mayor parte para prevenir la apoptosis, provee el primer enlace del ahora bien conocido programa de muerte celular conservado entre los invertebrados y los vertebrados. Uno de los organismos más estudiados como un modelo de muerte celular en los invertebrados es *C.elegans*. La mutación del gen *ced-9* (*bcl-2*) de este nemátodo trae consigo la muerte celular masiva y la muerte embrionaria, sugiriendo la importancia de este gen [18].

2. HIPÓTESIS:

Las células germinales en *C. elegans* experimentarán un cambio en la muerte celular programada al exponerlas a condiciones de tensión tales como: restricción nutricional, tensión oxidativa, osmótica, por metales y por choque de calor.

3. OBJETIVO GENERAL:

*Se ha visto que las condiciones de tensión que pueden provocar daño al ADN generan dos tipos de respuesta en las células de los animales: la primera es detener el ciclo celular para que las células dañadas no proliferen y, en el caso de que las células ya estén comprometidas a dividirse, se activa un mecanismo de eliminación de la célula por medio de apoptosis. En este trabajo queremos determinar el efecto de diversos tipos de tensión oxidativa, osmótica, nutricional, por metales y por choque de calor sobre la apoptosis de las células germinales en *C. elegans*.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES:

*Determinar el tiempo de exposición requerido para provocar apoptosis por tensión oxidativa, osmótica, por metales y por choque de calor sobre las células germinales.

*Evaluar si al alimentar a los nemátodos con bacterias que carecen de la coenzima Q₈ existe un efecto en el desarrollo de la línea germinal de *C. elegans*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Mantenimiento de los nemátodos y cepas empleadas

La cepa silvestre empleada para este trabajo es denominada N2 Bristol y fue obtenida del Centro de Genética de *C. elegans*. Los nemátodos se crecieron en medio NGM (ver Tabla 1) a 20° C y fueron alimentados con bacterias *Escherichia coli* de la cepa OP50-1 que presenta resistencia a estreptomicina [19]. A partir de una colonia aislada OP50-1, se crecieron cultivos líquidos en medio LB con 12.5 µg/ml de estreptomicina (ver Tabla 1) toda la noche a 37° C. Una gota del cultivo líquido de las bacterias se depositó en cajas de Petri con medio NGM y se incubó una noche a temperatura ambiente de manera que las bacterias crecieron moderadamente en el fondo del medio. Al otro día las cajas con NGM y las bacterias se guardaron a 4° C hasta su uso. Para cultivar los nemátodos se colocaron 5 animales hermafroditas adultos en una caja de NGM con bacterias y se incubaron a 20° C por cuatro días. Ya que cada hermafrodita es capaz de tener cerca de 100 hijos por día, en un período de cuatro días la caja presenta una gran cantidad de animales principalmente adultos con una población moderada de animales en otros estadios. Para mantener a los animales creciendo y poder realizar experimentos se debe poner una caja nueva cada tercer día.

Tabla 1. Medios empleados

MEDIO	INGREDIENTES*	CANTIDAD
NGM (<i>Nematodo Growth Medium</i>)	NaCl Bactotripton KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ Colesterol Agar	2 g. 4 g. 3 g. 0.5 g. 8.0 mg. 20 g.
LB	Tripton Extracto de levadura NaCl	10 g. 5 g. 5 g.
M9	Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ NaCl MgSO ₄	6 g. 3 g. 5 g. 0.25 g.

4.2. Sincronización de los cultivos de *C. elegans*

Para sincronizar a los nemátodos se utilizaron cajas con los hermafroditas adultos grávidos que crecieron por cuatro días a 20° C. Los nemátodos se colectaron de la caja con un mililitro de agua desionizada que fue depositado en un tubo tipo Eppendorf. Los animales fueron recuperados en un volumen de 800 µl y se les agregó 200 µl de hidróxido de sodio 5 N y 400 µl de cloro comercial para lisarlos. Se incubaron en esta solución por 5 minutos, agitándose frecuentemente en un vortex para favorecer la ruptura de los animales y la liberación de los embriones. Durante este proceso se destruyen todos los tejidos de la madre pero no los embriones. Al término de los cinco minutos, los animales se centrifugaron a 3000 RPM por 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de medio M9 (ver Tabla I) a la pastilla de embriones. Se repitió la centrifugación y el lavado con M9. Al término del último lavado se agregó 1 ml de M9 a la pastilla de los animales y se depositaron en una caja de Petri de vidrio de 3 cm. Los animales se incubaron toda la noche a 20° C en M9 y sin comida con el fin de terminar la embriogénesis, liberar los embriones de sus cascarones y se detener su desarrollo en la primera etapa larvaria. Al otro día, los animales necesarios para realizar el experimento se depositaron en una caja de Petri con medio NGM y comida y se incubaron por 3 días a 20° C hasta llegar a ser adultos [19].

4.3. Tratamiento de los nemátodos en las diferentes condiciones de tensión.

4.3.1. Choque de calor.

Para conocer si un cambio en la temperatura ambiental aumenta la apoptosis en las células germinales, las cajas de Petri que contenían a los nemátodos fueron colocadas en agua a 30° C y 33° C durante dos tiempos: 15 minutos y 30 minutos. Después se esperó una hora de recuperación y se realizó el ensayo de muerte celular.

4.3.2. Tensión por metales.

También se probó el efecto del cobre (sulfato de cobre, CuSO_4) en la apoptosis de *C. elegans*. Para ello los nemátodos fueron colocados en una caja de Petri con M9 adicionado con cobre $32 \mu\text{M}$ por 1 hora. Después se esperó una hora de recuperación y se realizó el ensayo de muerte celular.

4.3.3. Tensión osmótica.

Otra condición empleada fue provocar tensión osmótica en los nemátodos utilizando NaCl, en dos concentraciones al 1% y 2% (171 y $342 \mu\text{M}$, respectivamente) en $200 \mu\text{l}$ de M9 por una hora. Después se esperó una hora de recuperación y de igual manera se realizó el ensayo de muerte celular.

4.3.4. Tensión oxidativa.

Para provocar tensión oxidativa se utilizó paraquat (metil viológeno), un compuesto químico utilizado como herbicida, el cual interfiere el sistema de transferencia de electrones inhibiendo la conversión de NADP a NADPH y originando iones superóxido. Estos iones son habitualmente inactivados por la enzima superóxido dismutasa pero en presencia de paraquat la producción de iones superóxido supera la capacidad de eliminación de la enzima, por lo que se acumula superóxido libre. El superóxido produce peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y oxidación de las enzimas celulares de forma que eventualmente puede causar daño celular [20].

En la primera exploración se colocó a los nemátodos en paraquat a $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ toda la noche al día siguiente se efectuó el ensayo de muerte celular.

Las siguientes exploraciones fueron por 15 minutos con paraquat al $1 \mu\text{M}$ y 30 minutos con paraquat al $1 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$. Las últimas exploraciones fueron con paraquat al $1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ y $100 \mu\text{M}$ por una hora.

4.3.5. Restricción nutricional

Otra condición empleada fue provocar restricción calórica a los nemátodos utilizando la cepa de *Escherichia coli* Δ ubiCA, que tiene una doble deleción de los genes ubiC y ubiA responsables de codificar las enzimas involucradas en la síntesis de la coenzima Q₈.

Los nemátodos fueron transferidos en la etapa larvaria L4 a cajas con bacterias Δ ubiCA y OP50-1 (control) donde su progenie se desarrolló. Cuando la progenie cumplió un día de ser adultos se realizó el ensayo de muerte celular.

Por otro lado nemátodos L4 se movieron a cajas con la cepa OP50-1 y Δ ubiCA donde se dejó que su progenie se desarrollara. Posteriormente, la generación F1 se movió en la etapa larvaria L4 a la comida indicada en donde se contó el número de embriones.

4.4. Ensayo de muerte celular

Para teñir los cuerpos apoptóticos los nemátodos se incubaron en 200 μ l de M9 con 100 μ M de anaranjado de acridina por 2 horas en la oscuridad. Este colorante es un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos tiñendo a las células apoptóticas que pueden ser determinadas por microscopia de fluorescencia. Posteriormente se colocaron en comida por 1 hora para disminuir la fluorescencia de fondo. Los cuerpos apoptóticos fueron contados en los nemátodos que previamente fueron anestesiados con 10 μ l de M9 adicionado con 30 μ M de azida de sodio. La gónada se localizó en iluminación tipo Nomarski. Los resultados fueron analizados con el programa Excel (Microsoft).

4.5. Nuevas condiciones:

Con nuevas condiciones se modificó la metodología de ensayo de muerte celular y las concentraciones de los tratamientos de tensión. De esta forma los nemátodos se incubaron en anaranjado de acridina y el estímulo de tensión al mismo tiempo (1 hora), solo se recuperarán los animales por media hora para

posteriormente localizar la gónada en iluminación tipo Nomarski. En la condición de estrés oxidativo se aumentó la cantidad de paraquat de 1-10 μM a 10 mM, en el choque osmótico se disminuyó el NaCl de 171-342 mM a 70 mM, el choque de calor se manejo a 33 °C y por ultimo se incrementó casi al doble la cantidad de cobre a 70 μM .

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el desarrollo normal cerca de la mitad de las células germinales que se producen durante la ovogénesis son susceptibles a muerte por apoptosis. A esto se le conoce como muerte celular fisiológica y se piensa que es necesaria para mantener la homeostasis de la gónada [7]. Por otro lado, el único linaje celular capaz de responder a agentes externos en el *C. elegans* es la línea germinal, esto se debe a que está en constante producción de células. Por ejemplo, daños al ADN provocados por radiación ionizante inducen apoptosis de las células germinales y detención del ciclo celular [10]. Con el objetivo de estudiar si agentes que causan tensión celular tienen un efecto en el desarrollo de las células germinales se decidió monitorear la muerte de éstas.

Las condiciones que se probaron fueron tensión oxidativa (paraquat), osmótica (NaCl), choque de calor y tensión por exposición a metales. Para detectar la apoptosis se usó el colorante vital anaranjado de acridina, el cual se intercala en el ADN y debido a que las células apoptóticas condensan su ADN resaltan del resto de las células. Se sabe que este colorante es un buen indicador de apoptosis y ha sido extensamente utilizado [7, 21]. Cabe señalar que los animales ingieren el colorante el cual viaja por difusión del intestino al resto del cuerpo. Sin embargo para facilitar la observación en el microscopio los animales fueron alimentados con bacterias por una hora para reducir el colorante en el intestino.

5.1. Tensión oxidativa

Las especies de oxígeno reactivas dañan macromoléculas biológicas como los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas que al oxidarse alteran su estructura y función. Los daños por oxidación al ADN y a las proteínas han sido implicadas en una variedad de enfermedades degenerativas [22]. Así como la acumulación de

defectos genómicos causados por especies de oxígeno reactivas a través de la vida de un organismo puede incrementar el riesgo a padecer cáncer [22].

Al conocer los daños que pueden generar las especies de oxígeno reactivas a la célula decidimos provocar tensión oxidativa a las células germinales y determinar el efecto sobre la apoptosis.

Para provocar tensión oxidativa se utilizó paraquat, este compuesto interfiere en el sistema de transporte de electrones inhibiendo la conversión de NADP a NADPH y originando iones superóxido. Estos iones son habitualmente inactivados por la enzima superóxido dismutasa pero en presencia de paraquat la producción de iones superóxido supera la capacidad de eliminación de la enzima, por lo que se produce una situación de tensión oxidativa.

Animales incubados en presencia de paraquat 1 y 10 μM toda la noche no mostraron diferencias significativas en cuanto al número de células apoptóticas con el control (Figura 7A); sin embargo, observamos que los animales bajaron su producción de embriones (datos observados en microscopio).

Como observamos que la producción de embriones disminuía decidimos incubar a los animales por menos tiempo en este compuesto, ya que esto nos indica que las células germinales disminuyeron su proliferación. Los animales se expusieron por 15, 30 y 60 minutos a paraquat y observamos una disminución en el número de células apoptóticas durante los primeros 30 minutos pero a los 60 minutos los animales parecían reponerse (Figura 7B, C y D).

La disminución en la apoptosis durante los primeros 15-30 minutos podría deberse a que las células germinales dejan de proliferar o se detienen en diferentes etapas de la meiosis para inducir sus sistemas de defensa.

Una de las respuestas de las células al daño a ADN es la detención del ciclo celular y la meiosis. Uno de los genes involucrados en esta respuesta es p53 en mamíferos; sin embargo, en *C. elegans* p53 no es requerido para la detención del ciclo celular [21, 22]. En los vertebrados p53 es el supresor de tumores más frecuentemente mutado en cáncer, además juega un papel crítico en el mantenimiento de la estabilidad genómica por regular la progresión del ciclo celular y la apoptosis en respuesta a daños al ADN [21, 22].

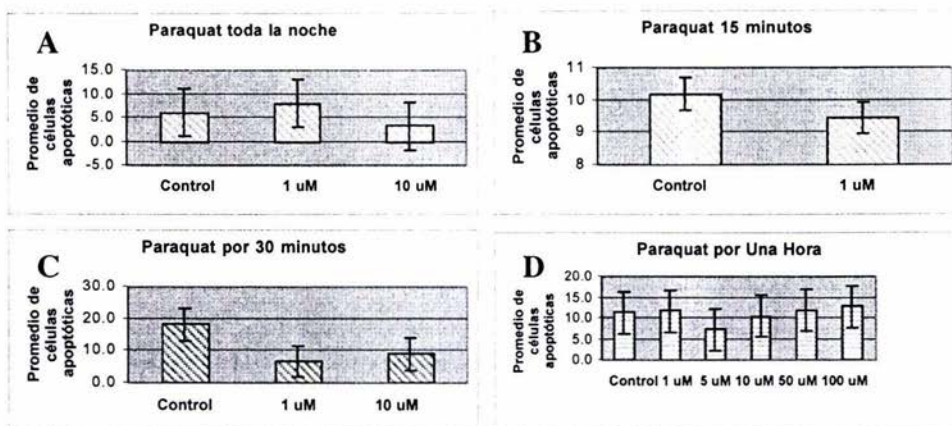


Figura 7. Efecto de la tensión oxidativa por exposición a paraquat en las células de la gónada. El paraquat en las concentraciones indicadas no incrementó el número de células apoptóticas. A) Los animales se incubaron en cajas con comida y las concentraciones indicadas de paraquat por 12 h. B, C y D). Para incubaciones cortas los animales se movieron a una caja de Petri con 200 μ l de medio M9 como control o medio M9 más las concentraciones indicadas de paraquat por los tiempos que se señalan. Posteriormente se tiñeron con anaranjado de acridina, se dejaron recuperar por una hora en comida y se contó el número de células apoptóticas.

Se ha observado en vertebrados que este gen es activado por diversas señales de estrés incluyendo la hipoxia. En *C. elegans* la mutante del homólogo de p53, *cep-1*, es requerida para inducir apoptosis por daño al ADN en células germinales [25]; sin embargo, no es capaz de inducir muerte celular en respuesta al daño al ADN en células somáticas, por lo que las mutaciones provocadas son transferidas a las siguientes generaciones. Asimismo estas mutantes también son sensibles a la hipoxia y al ayuno [11, 23].

Por otro lado, en los tratamientos más prolongados, no se observe un efecto del paraquat debido a que los animales tuvieron tiempo suficiente para inducir una respuesta antioxidante y estar protegidos. En *Drosophila melanogaster* se ha demostrado que la ruta de señalización de la JNK (la cinasa c-jun n-terminal de la familia de las MAPK) funciona como un centro de trasducción de señales que coordina la inducción de genes protectores en respuesta a cambios oxidativos. La

actividad de JNK mitigan los efectos tóxicos de especies de oxígeno reactivas producidos por paraquat [22].

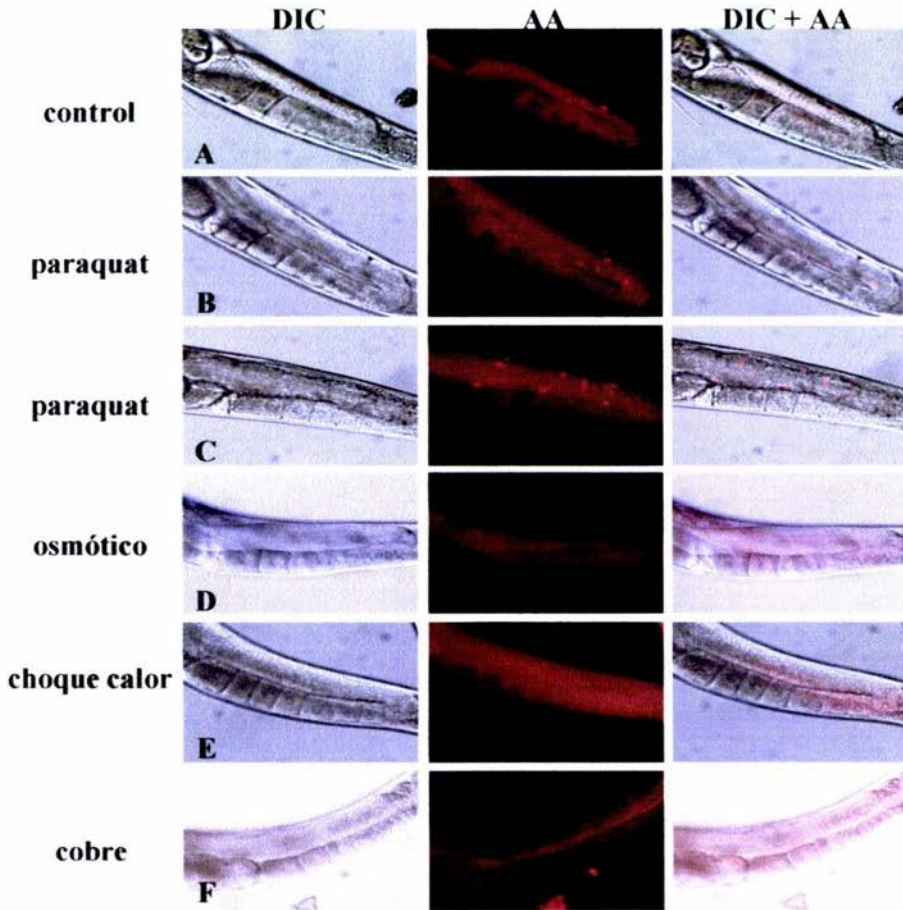


Figura 8 Fotografías tipo Nomarski o DIC y fluorescencia de animales sometidos a diferentes tipos de tratamiento. Los animales se incubaron en los tipos de tensión señalados por una hora y posteriormente se tiñeron con anaranjado de acridina por dos horas, se recuperaron en cajas con comida por una hora y fueron montados para verlos en el microscopio. En los paneles derechos se muestran fotos sobrepuestas de Nomarski y fluorescencia. DIC= iluminación tipo nomarski, A.A= anaranjado de acridina.

Sería interesante probar concentraciones mayores para ver si vemos algún efecto. Un dato interesante es que a pesar de que no vemos cambios significativos en paraquat, en ocasiones si observamos animales con un mayor número de células apoptóticas como se muestra en la Figura 8 B y C.

5.2. Tensión osmótica

La habilidad para controlar el balance osmótico es esencial para la sobrevivencia de la célula. La homeostasis celular es mantenida por la acumulación y pérdida de iones inorgánicos y osmolitos orgánicos [26]. Los osmolitos orgánicos se encuentran típicamente en concentraciones de diez a cien milimolar en el citosol de todos los organismos [26]. Mientras la osmoregulación ha sido estudiada exhaustivamente en muchos tipos celulares, todavía existen muchas cosas por descubrir [26]. Por ejemplo, cómo es que las células sobrellevan la tensión osmótica, las señales y las rutas de señalización por las cuales las células animales detectan perturbaciones del volumen y como se activan los mecanismos regulatorios del volumen se ha definido pobremente [26]. *Caenorhabditis elegans* es un modelo útil en el cual se puede caracterizar las bases genéticas de la osmoregulación celular de las células animales [26]. Los nemátodos normalmente viven en el suelo donde pueden ser expuestos a constantes y extremas tensiones osmóticas a través de desecaciones y rehidrataciones [26].

Para provocar apoptosis por tensión osmótica utilizamos cloruro de sodio al 1 y 2% que equivale a 171 y 342 mM. Los gusanos normalmente crecen en un medio con 86 mM de sal por lo que la concentración fue aumentada 2 y 3 veces respectivamente. El exceso de sal en el medio provoca la salida de agua y de altas concentraciones de iones en las células, de esta manera se generó tensión osmótica.

Al exponer a los nemátodos a 1% y 2% de sal no se observaron diferencias significativas aunque es interesante resaltar que en 2% en la mayoría de los animales se detectaban menos células apoptóticas (Figura 8 y 9).

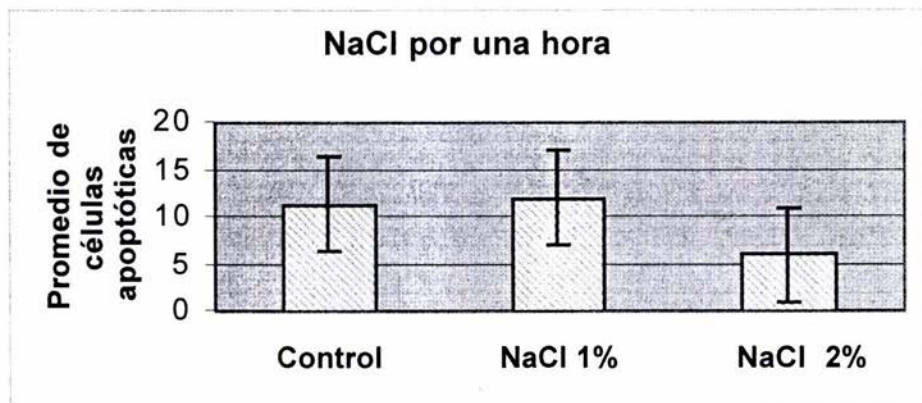


Figura 9. Efecto de la tensión osmótica inducida con cloruro de sodio. El NaCl al 1% y 2% no incrementó el número de células apoptóticas aunque en la concentración de 2% hubo una disminución de estas. Los animales se incubaron en las concentraciones de cloruro de sodio indicadas por una hora, posteriormente se tiñeron por dos horas en anaranjado de acridina, se recuperaron por 1 hora en comida y se analizaron al microscopio.

Es posible que concentraciones elevadas de sal disminuyan la proliferación de las células germinales. Para corroborar esta hipótesis tendríamos que exponer a los animales por más tiempo a estas concentraciones de sal y observar si existe una disminución en el número de ovocitos producidos, lo cual nos indicaría que efectivamente están dejando de producir células germinales.

5.3. Choque de calor

La respuesta al choque de calor o cambio de temperatura es un antiguo mecanismo que permite la adaptación a los cambios medioambientales [27]. El factor de choque de calor (HFS) es requerido para responder a tensión en todos

los organismos, así como para el crecimiento normal y el desarrollo en *C. elegans* en ausencia de tensión [27]. En nemátodos, la falta del gen *hsf* provoca defectos en el desarrollo y la fertilidad en condiciones normales de crecimiento [27]. De igual forma, se ha encontrado que cepas de *Drosophila melanogaster* con mutaciones en el gen *hsf* detienen su desarrollo durante las primeras etapas de crecimiento [27]. Tanto en *C. elegans* como en *Drosophila*, el HSF puede ser necesario para la expresión de genes requeridos para la progresión del desarrollo hacia etapas larvales tempranas [27]. La participación de HSF en la formación de los nemátodos resistentes a condiciones adversas conocidos como “dauer” en inglés se forman en respuesta a poco alimento, superpoblación o por elevada temperatura [27]. Las condiciones normales de crecimiento de *C. elegans* fluctúan entre 15 y 25° C y se sabe que entre más elevada sea la temperatura menos hijos tienen; sin embargo, se desconoce la razón. Esto indica que los nemátodos responden a variaciones sutiles en la temperatura con alteraciones en la expresión de genes que afectan decisiones en el desarrollo [27].

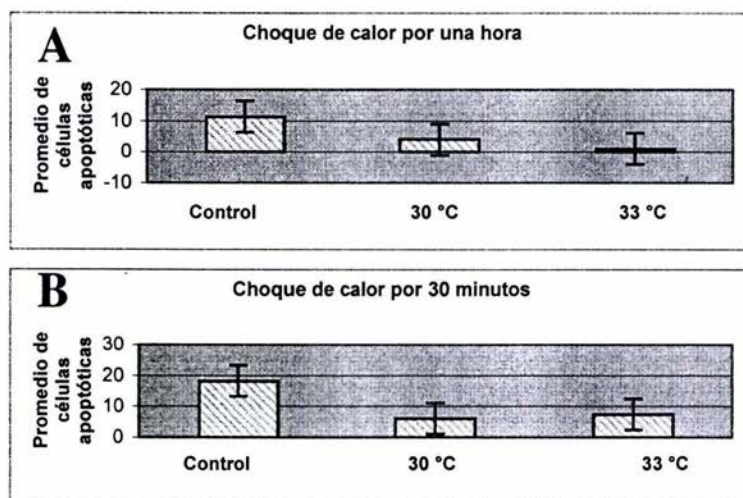


Figura 10. Efecto del choque de calor en las células de la gónada. A temperaturas de 30°C y 33°C no se observó diferencias significativas sin embargo hubo una disminución importante en las células apoptóticas. Los animales fueron sometidos al choque de calor a la temperatura indicada por 30 ó 60 minutos, posteriormente teñidos con anaranjado de acridina como se indica en las figuras anteriores.

Para estudiar si el choque de calor afecta el desarrollo de la gónada se sometieron nemátodos por treinta minutos o una hora a 30 y 33° C.

Sorprendentemente observamos una disminución importante en los números de células apoptóticas (Figura 8 E y 10). Nuevamente esto podría ser indicativo de una disminución en la proliferación de la células germinales .

5.4.Tensión por metales

En *Caenorhabditis elegans*, el gen *mek-1* codifica una proteína homóloga a la proteína MKK7 de los mamíferos, la cual es una activadora de JNK (la cinasa c-jun de la familia de las MAPK)[11]. El gen *mek-1* es expresado más notablemente en la faringe y también en el intestino así como en tejidos que están directamente expuestos al ambiente [28]. Los nemátodos que carecen del gen *mek-1* muestran en el desarrollo hipersensibilidad cuando se crecen en placas con cobre o cadmio, las larvas mutantes en *mek-1* a menudo crecen más lentamente o muestran arresto en el crecimiento [28].

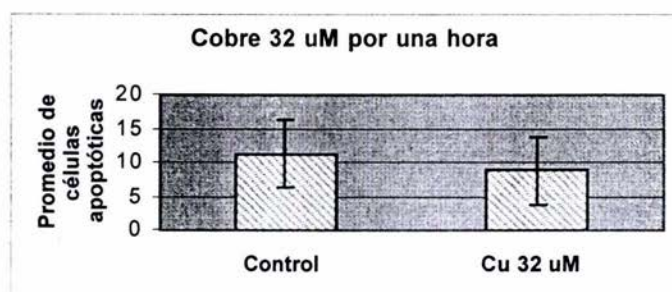


Figura 11. Efecto de la tensión por cobre en la gónada. Con cobre 32 µM no hubo un incremento en las células apoptóticas. Los animales se sometieron a la concentración de cobre indicada por una hora y posteriormente se tificaron como se ha indicado anteriormente.

Con la idea de explorar si la tensión por metales afecta la gónada probamos cobre a concentraciones de 32 μM por una hora. No observamos cambios significativos en estas condiciones, sin embargo algunos gusanos presentaban una elevada muerte celular (datos que no se muestran, Figura 8 F y 11).

5.5. Restricción nutricional

Hace más de 50 años se demostró que reducir la ingesta calórica (restricción nutricional) en roedores puede alargar significativamente la duración de su vida. La restricción nutricional ha sido subsecuentemente experimentada en una amplia variedad de animales, incluyendo a *C. elegans* [29]. Se piensa que si se disminuye el metabolismo hay una menor producción de especies de oxígeno reactivas producidas en la mitocondria, a las que se les ha atribuido ser la principal causa de envejecimiento por dañar macromoléculas biológicas como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas [30, 31].

Se ha observado una extensión en la longevidad de nemátodos alimentados con una dieta carente de coenzima Q, así como en nemátodos mutantes en el gen *clk-1*, el cual codifica para la enzima carboxilasa responsable del paso final de hidroxilación en la síntesis de la coenzima Q [32]. La coenzima Q funciona como transportadora de electrones y protones en la cadena respiratoria de la mitocondria y como un antioxidante lipo-soluble [33, 34].

Los nemátodos mutantes en el gen *clk-1* acumulan desmetoxi-Q9 (DMQ9), un intermediario de la biosíntesis de la coenzima Q [35]. Esto sugiere que el incremento de la longevidad del nemátodo y el lento índice de desarrollo reportado para este tipo de mutantes resulta de un decremento en los niveles de la coenzima Q, ya que reduce la generación de especies de oxígeno reactivo que producen daño celular [32]. Recientemente el grupo de Hekimi demostró que el compuesto DMQ9 funciona como un antioxidante muy efectivo, por lo que al someter a mutantes en *clk-1* a niveles de tensión, entre los cuales destacan la

interrupción de las superóxido dismutasas, el fenotipo es rescatado indicando que los animales necesitan algunas especies de oxígeno reactivas para su desarrollo y funcionamiento [36]. En este trabajo particularmente destaca que la gónada requiere de la oxidación de lípidos para su desarrollo a niveles normales.

Por otra parte, se han realizados estudios sobre el efecto de la tensión nutricional en *Drosophila melanogaster* [16]. Se ha comparado la producción de huevos al pasar de una dieta rica en proteínas a una pobre y viceversa, y se observó que en una dieta rica en promedio se ponen 90 huevos por día; sin embargo, al cambiar la dieta a una carente de proteínas sólo se ponen 1.5 huevos por día [16]. En este trabajo, descubrieron que la disminución en la producción de huevos se debe a que las células germinales primordiales mueren por apoptosis en respuesta al ayuno.

De igual manera las células somáticas y las células troncales de *Drosophila* disminuyen su índice de división en respuesta a una limitación de nutrientes. Por otro lado, las células germinales se desarrollan tres veces más rápido en una dieta rica en proteínas que en una pobre [16].

Para estudiar el efecto de la restricción nutricional en el desarrollo de la gónada se decidió cambiar la dieta de los animales. Los nemátodos se alimentan regularmente con la cepa OP50 de *E. coli* la cuál tiene una deficiencia en la producción de uridina, lo cuál hace que las bacterias crezcan más lentamente, no invadan la caja y nos permitan observar a los animales bajo el microscopio. Para probar si la dieta de los animales afecta el desarrollo de la gónada utilizamos una bacteria deficiente en la coenzima Q8 ($\Delta ubiCA$) que tiene una delección de los genes *ubiC* y *ubiA*, estos genes son responsables de codificar las enzimas involucradas en la síntesis de la ubiquinona o coenzima Q en *E.coli*. Debido a que las bacterias acumulan intermediarios de la enzima Q8 que pueden ser antioxidantes o bien, al reducir la cadena respiratoria de las bacterias, esperamos que se generen menos especies de oxígeno reactivas. Con este cambio de alimentación se esperaba que los nemátodos tuvieran un menor índice de tensión oxidativa y por lo tanto un menor número de células germinales en apoptosis o

que la gónada madurase más lentamente debido a la ausencia de las especies de oxígeno reactivas [36].

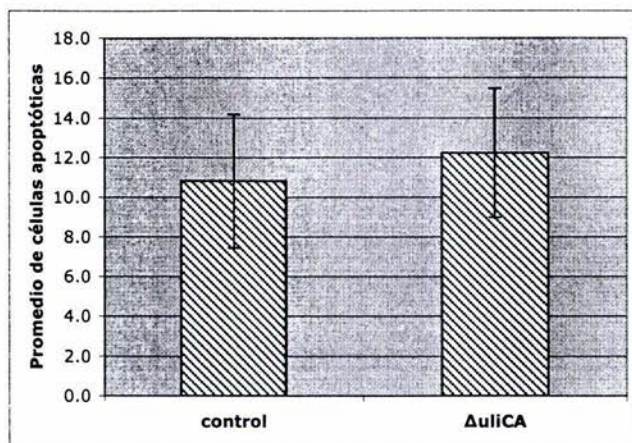


Figura 12. Animales alimentados con las cepas OP50-1 y Δ uliCA de *E. coli*. Los nemátodos alimentados con la cepa Δ uliCA no tuvieron un menor número de células germinales en apoptosis. Los animales fueron transferidos en la etapa larvaria L4 a las comidas señaladas en donde su progenie se desarrolló. Cuando la progenie cumplió un día de ser adultos los animales fueron teñidos con anaranjado de acridina para detectar muerte celular.

Los animales alimentados con la cepa Δ uliCA no presentaron ningún retraso en el desarrollo de la gónada (Figura 12 y 13). Esto se podría deber a que las mutaciones en los genes Δ uliC y Δ uliA probablemente no acumulan ningún intermedio ya que son los primeros genes en la vía de síntesis de ubiquinona. Otra posibilidad es que el nemátodo compense el efecto antioxidante que podría producir esta cepa.

Sería interesante probar si mutantes en los genes Δ uliE, F o G que son los últimos en la vía de producción de ubiquinona si acumulan intermediarios antioxidantes y por lo tanto tienen un efecto en el desarrollo de la gónada. Se podría suponer que al suprimir la coenzima Q8 de la dieta de los nemátodos a través de la cepa Δ uliCA, no se afecta la apoptosis de las células germinales ya

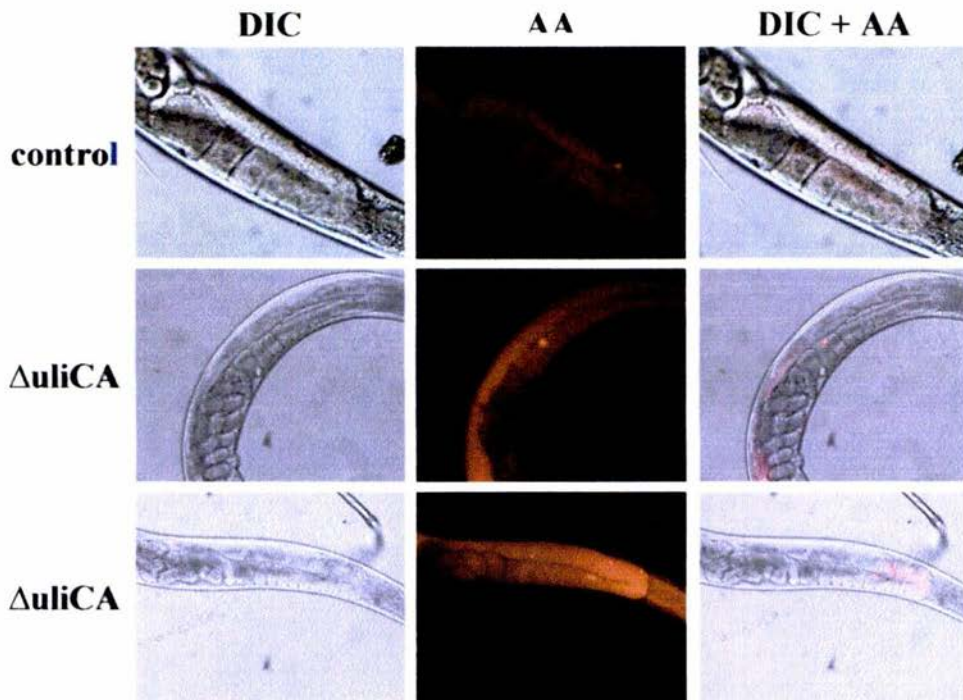


Figura 13. Apoptosis en animales alimentados con las cepas OP50-1 o Δ uliCA. Animales tratados como se describió en la figura anterior fueron montados para analizarse en el microscopio por iluminación tipo Nomarski o DIC y fluorescencia.

que el animal puede obtener la coenzima Q9 a través de la síntesis del propio nemátodo, permitiendo el adecuado suministro de esta a las células germinales no afectándoles la supresión de la coenzima Q8 de la dieta.

Otra manera de monitorear si la tensión oxidativa afecta el desarrollo y funcionamiento de la gónada es estudiando la producción de hijos. Nuestra hipótesis es que la cepa Δ uliCA acumula moléculas antioxidantes y si la tensión oxidativa provoca un aumento en la muerte celular, en presencia de esta cepa un menor número de células germinales muere por lo que tendría mas hijos. Para probar nuestra hipótesis se realizó un conteo de embriones. Aunque no

observamos una disminución en la muerte de las células germinales, si logramos observar que nemátodos alimentados con la cepa Δ uliCA tuvieron 25% más hijos que los alimentados con la cepa OP50-1 (Figura 14). Esto puede ser debido a la acumulación de un intermediario antioxidante que protege a las células germinales de morir por apoptosis.

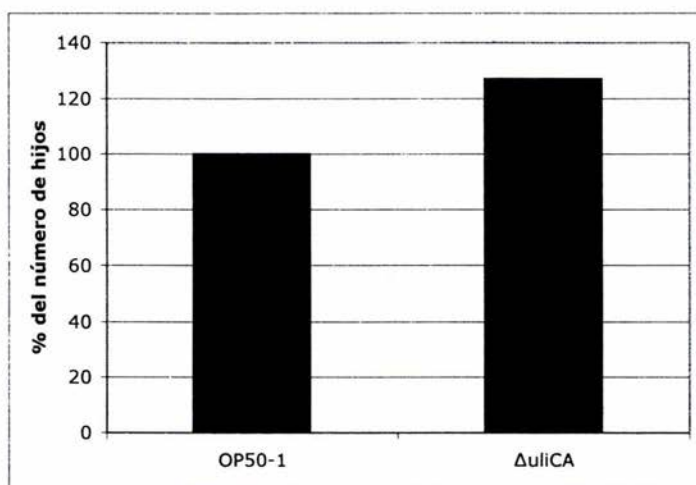


Figura 14. Los animales alimentados con la cepa Δ uliCA presentan un aumento en el número de hijos con respecto a los alimentados con la cepa OP50-1. Animales L4 se movieron a la comida señalada en donde se dejó que su progenie se desarrollara. Posteriormente, la generación F1 se movió en la etapa larvaria L4 a la comida indicada en donde se contó el número de hijos. En la gráfica se muestran porcentajes.

5.6. La tensión oxidativa produce apoptosis

Durante la escritura de este trabajo una compañera del laboratorio logró detectar un incremento en la apoptosis en varias condiciones de tensión (Salinas, L.S. y Navarro R.E., en preparación) por lo que decidimos estudiar estas nuevas

condiciones. Salinas utilizó una cepa de *C. elegans* que es incapaz de degradar los cuerpos apoptóticos, *ced-1 (e1735)* [6]. Con esta cepa se puede observar la formación de cuerpos apoptóticos que son células refráctiles a la luz, por lo que se puede explorar a los animales directamente sin necesidad de someterlos a tinciones. Una vez formado el cuerpo apoptótico es degradado en un intervalo de una hora en una cepa silvestre, por lo que es muy difícil detectarlos. Usando la cepa *ced-1*, Salinas observó que los cuerpos apoptóticos inducidos se acumulaban por un intervalo de tiempo corto (2-3 horas). Desgraciadamente, en la cepa *ced-1* es imposible teñir los cuerpos apoptóticos con colorantes vitales por lo que tampoco pudimos utilizar esta cepa para nuestro trabajo (este dato ha sido observado por varios grupos y se desconoce la causa). Por esta razón, decidimos modificar la metodología para reducir el tiempo transcurrido entre el estímulo de tensión, la tinción con anaranjado de acridina y la observación en el microscopio.

En el nuevo método se aplicó el estímulo de tensión y el anaranjado de acridina al mismo tiempo, se dejaron recuperar los animales en comida por media hora para disminuir el colorante para posteriormente observar a los animales en el microscopio.

Por otro lado, Salinas probó concentraciones diferentes de paraquat que resultaron más efectivas, las cuales incluimos en nuestro nuevo protocolo. El paraquat se incrementó de 1-10 μM a 10 mM. El choque de calor se manejó a 33 °C, el choque osmótico se disminuyó a 70 mM de NaCl y el cobre se aumentó al doble (70 μM).

En la figura 15 se puede apreciar un incremento de células apoptóticas con tensión oxidativa. Sin embargo, no existió un incremento de apoptosis en choque por calor, tensión osmótica o por metales. De hecho, en el caso de choque de calor se observó una disminución notable en el número de células muertas. Cabe la posibilidad de que al someter a los animales a tensión osmótica, por metales o por choque de calor el transporte de compuestos sea alterado, por lo que el colorante no penetre a las células germinales y nos evite observar la muerte celular.

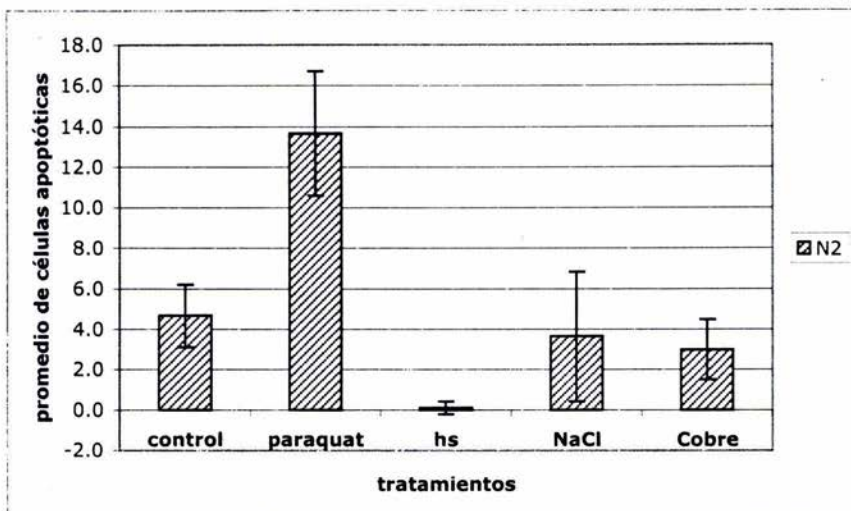


Figura 15. La tensión oxidativa induce apoptosis. Los animales se incubaron en la condiciones indicadas al mismo tiempo que se teñían con anaranjado de acridina (A.A) por una hora, se dejaron recuperar y se observaron por microscopio de fluorescencia.

Desgraciadamente, esta tinción debe realizarse en animales vivos ya que en animales fijados tampoco es posible detectarla. El anaranjado de acridina es un colorante muy utilizado para detectar específicamente apoptosis por lo que es interesante destacar que no funciona en todas las ocasiones.

6. CONCLUSIONES

- El presente trabajo demuestra el efecto oxidativo del compuesto paraquat sobre las células germinales, las cuales incrementan su apoptosis a un poco más del doble. Sin embargo, no existió un incremento en la apoptosis en choque de calor, tensión osmótica o por metales. Cabe la posibilidad de que al someter a los nemátodos a dichas tensiones el transporte de los compuestos sea alterado por lo que el anaranjado de acridina no penetre a las células germinales.
- Por otra parte los nemátodos alimentados con la cepa Δ uliCA tuvieron más hijos que el grupo control. Sugiriendo la posible existencia de un intermediario antioxidante que al acumularse protege a las células germinales de morir por apoptosis
- A pesar de ser el anaranjado de acridina un colorante ampliamente utilizado como marcador apoptótico, en este trabajo encontramos que no necesariamente es un buen marcador en todas las ocasiones.
- Es posible también que los efectos de las diferentes tensiones sean dependientes de concentración y tiempo así como que no sean generalizables para todos los nemátodos, es decir, que sólo sean susceptibles algunos de estos.
- El presente trabajo muestra evidencias de que el medio ambiente puede tener un impacto sobre la línea germinal de *C. elegans*. Al no existir condiciones favorables para la progenie, el nemátodo puede responder produciendo un menor número de embriones y eliminando células germinales por apoptosis.

7. B I B L I O G R A F I A

1. Wood, W.B., *The nematode Caenorhabditis elegans*, ed. w. w.b. 1988, New York: Cold spring harbor laboratory press. 667.
2. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. Seventh edition. 2003, Sunderland: Sinauer Associates Inc. 838.
3. Bargmann, C. and J. Hodgkin, *Accolade for elegans*. Cell, 2002. **111**(6): p. 759-62.
4. Wei-Wang, *Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis*. Anticancer Research, 1999. **19**: p. 4759-4771.
5. Lewin, B., *Genes VII*. Vol. VII. 2000, New York: Oxford University Press. 990.
6. Hedgecock, E.M., J.N. Thompson and J. E Sulston, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-1279.
7. Gumienny, T.L., et al., *Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline*. Development, 1999. **126**(5): p. 1011-22.
8. Navarro, R.E., et al., *cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in C. elegans*. Development, 2001. **128**(17): p. 3221-32.
9. Karashima, T., A. Sugimoto, and M. Yamamoto, *Caenorhabditis elegans homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis*. Development, 2000. **127**(5): p. 1069-79.
10. Gartner, A., et al., *A conserved checkpoint pathway mediates DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest in C. elegans*. Molecular Cell, 2000. **5**(3): p. 435-43.
11. Shumacher, B., *The C.elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis*. Current Biology, 2001. **11**: p. 1722-1727.
12. Derry, W.B., *Caenorhabditis elegans p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance*. Science, 2001. **294**(5542): p. 591-595.
13. Bergamashi, D., *iASSP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human*. Nature Genetics, 2003. **33**: p. 162-167.
14. Cavaliere, V., C. Taddei, and G. Gargiulo, *Apoptosis of nurse cells at the late stages of oogenesis of Drosophila melanogaster*. Development Genes and Evolution, 1998. **208**(2): p. 106-12.
15. McCall, K. and H. Steller, *Requirement for DCP-1 caspase during Drosophila oogenesis*. Science, 1998. **279**(5348): p. 230-4.
16. Drummond-Barbosa, D. and A.C. Spradling, *Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis*. Developmental Biology, 2001. **231**(1): p. 265-78.
17. Morita, Y. and J.L. Tilly, *Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass*. Developmental Biology, 1999. **213**(1): p. 1-17.
18. Hengartner, M.O. and H.R. Horvitz, *C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2*. Cell, 1994. **76**(4): p. 665-76.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

19. Stiernagle, T., *The nematode C.elegans. A practical Approach*. Cap.4 Maintenance of *C.elegans*, ed. E.b.I.A.H.T.p.a. Series. 1999: Oxford University Press.
20. Winchester, J.F., *Poisoning and drug overdose*. Paraquat and diquat herbicides. 1990, Philadelphia: W.B Saunders Corporation.
21. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 323-31.
22. Wang, M. C., D. Bohmann, and H. Jasper, JNK Signaling Confers Tolerance to Oxidative Stress and Extends Lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 2003. **5**(5):p. 811-16.
23. Ko, L.J. and C. Prives, *p53: puzzle and paradigm*. *Genes & Development*, 1996. **10**(9): p. 1054-72.
24. Derry, W.B., *Caenorhabditis elegans p53: Role in Apoptosis, Meiosis, and Stress Resistance*. *Science*, 2001. **294**(5542): p. 591-595.
25. Stergiou, L. and M.O. Hengartner, Death and more: DNA damage response pathway in the nematode *C. elegans*. *Cell Death and Differentiation*, 2004. **11**(1):p.21-28.
26. Lamitina, S.T., et al., *Adaptation of the nematode Caenorhabditis elegans to extreme osmotic stress*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. **286**(4): p. C785-91.
27. Walker, G., *Heat shock factor functions at the convergence of the stress response and developmental pathways in Caenorhabditis elegans*. *FASEBJ*, 2003. **13**: p. 1960-1962.
28. Koga, M., *A Caenorhabditis elegans MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses*. *The EMBO Journal*, 2000. **19**: p. 5148-5156.
29. Lakowski, B. and S. Hekimi, *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans*. *Proceeding of the National Acadademy of Sciences of the United States of America*, 1998. **95**(22): p. 13091-6.
30. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. *Science*, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
31. Yu, B.P., *Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996. **21**(5): p. 651-68.
32. Larsen, C.C.a.P., *Extension of Life-Span in Caenorhabditis elegans by a Diet Lacking Coenzyme Q*. *Science*, 2002.**295**(5562): p. 120-123.
33. Kagan, P.J.Q.a.I.V.E., *Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease*. CRC Press, 2000.
34. Echtay, K.S., E. Winkler, and M. Klingenberg, *Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function*. *Nature*, 2000. **408**(6812): p. 609-13.
35. Miyadera, H., et al., *Quinones in long-lived clk-1 mutants of Caenorhabditis elegans*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2002. **512**(1-3): p. 33-7.
36. Shibata, S.H.a.Y., *Redox Regulation of Germline and Vulval Development in Caenorhabditid elegans*. *Science*, 2003.**302**(5651): p. 1779-1782.