



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

APOPTOSIS EN LA LÍNEA GERMINAL
DEL NEMATODO *Caenorhabditis elegans*

T E S I S
QUE PARA PRESENTAR EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
VALERIA HANSBERG PASTOR



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Hansberg
Pastor
Valeria
53 39 51 73
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302500220

2. Datos del tutor

Dra.
Rosa Estela
Navarro
González

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Diana María
Escalante
Alcalde

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Jesús
Chimal
Monroy

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Luisa Alvarina
Alba
Lois

7. Datos del trabajo escrito

Apoptosis en la línea germinal del nematodo *Caenorhabditis elegans*
110 p.
2009



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

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

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Apoptosis en la línea germinal del nematodo *Caenorhabditis elegans*

realizado por **Hansberg Pastor Valeria** con número de cuenta **3-0250022-0** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

Propietario Dra. Diana María Escalante Alcalde

Propietario Dra. Rosa Estela Navarro González
Tutora

Suplente Dr. Jesús Chimal Monroy

Suplente Dra. Luisa Alvarina Alba Lois

Atentamente,

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 26 de febrero de 2009

EL COORDINADOR DEL COMITÉ ACADÉMICO DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

DR. PEDRO GARCÍA BARRERA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Este trabajo se realizó bajo la tutoría 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 PAPIIT-UNAM, donativo IN220306, por haber brindado el apoyo para la realización de este trabajo.

Agradecemos a la M. en C. B. Laura Silvia Salinas Velázquez y al biólogo Carlos Giovanni Silva García por la asesoría y apoyo durante la elaboración de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil agradecer a todas las personas que de manera directa o indirecta influyeron durante la realización de este trabajo, por lo que espero no quedarme corta y expresar en pocas líneas todo lo que siento.

Primero que nada quiero darle las gracias a mi familia que siempre me ha apoyado emocional, académica y económicamente; que siempre me ha empujado a apreciar lo bello, como son la ciencia, el arte o la música; que me enseñaron a ser apasionada, a ser crítica y a ser yo misma. Gracias, especialmente a mi mamá por su apoyo incondicional, a mi papá por ayudarme a ver la biología como algo hermoso y a mis hermanos, que me han soportado en las buenas y en las malas. Quiero agradecer especialmente a mi abuela Olga por presionarme cada domingo familiar para que me titulara. Los amo a todos.

Asimismo, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Fisiología Celular que me han ofrecido la oportunidad de desarrollarme, de aprender, de conocer personas admirables y que me han albergado durante tantos años.

Quiero agradecer a los miembros de mi laboratorio, especialmente a mi asesora la Dra. Rosa Navarro por brindarme la posibilidad de hacer mi tesis de licenciatura en su laboratorio y a mis compañeros Ari Franco, Aydé Oliva, Daniel Paz, Silvia Salinas y Giovanni Silva, por ofrecerme su ayuda y su conocimiento.

A mis grandes amigos con los que he disfrutado de muchos buenos momentos a lo largo de todos estos años: Adriana, Andresiño, Blanca, Carlinski, Fernando, Marcia, Marel, María, Mario, Marisol, Miguelón, Rodrigo, Sandino, el Vampiro y especialmente a mi gran amigo Juan Manuel. A Pacorro por hacerme la vida bella, por su amor y apoyo, por escucharme y entenderme, gracias por todo. Te quiero princeso!

ÍNDICE GENERAL

- Índice de figuras
- Índice de abreviaturas
- Resumen

1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio.....	3
1.2 Ciclo de vida, anatomía y desarrollo.....	4
1.3 Gónada del hermafrodita adulto y desarrollo de la línea germinal.....	8
1.4 Muerte celular.....	12
1.5 Mecanismos de apoptosis en <i>C. elegans</i>	14
1.6 Apoptosis en la línea germinal.....	19
1.7 Apoptosis en la línea germinal de <i>C. elegans</i>	21
2. OBJETIVOS.....	29
3. HIPÓTESIS.....	29
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	30
4.1 Medios para el crecimiento de los animales.....	30
4.2 Crecimiento de bacterias.....	31
4.3 RNA de interferencia.....	32
4.4 Ayuno como condición de estrés y apoptosis fisiológica.....	34
4.5 Determinación de la apoptosis.....	34
4.6 Selección y secuenciación de genes.....	35
4.7 Estudios de fertilidad.....	36
4.8 Tinción con DAPI e inmunotinción para la histona H3 fosforilada.....	37
4.9 Análisis estadístico.....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41

5.1 El silenciamiento de algunos genes provoca un aumento en la apoptosis fisiológica.....	42
5.2 Algunos genes participan en la apoptosis inducida por ayuno.....	51
5.3 Efecto del silenciamiento de ciertos genes en la descendencia de los animales	59
5.4 Los animales D1046.2 (RNAi) presentan problemas durante la meiosis.....	62
5.5 Los animales T05F1.2 (RNAi) tienen la apoptosis fisiológica aumentada.....	68
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	72
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	74
• Referencias	
• Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

1. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	5
2. Linaje celular durante la embriogénesis de <i>C. elegans</i>	7
3. Gónada de <i>C. elegans</i>	10
4. Gonadogénesis.....	11
5. Apoptosis durante el desarrollo de <i>C. elegans</i>	15
6. Apoptosis en <i>C. elegans</i>	16
7. Modelo molecular de la activación de la vía apoptótica en <i>C. elegans</i>	17
8. Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos en <i>C. elegans</i>	18
9. Diferentes vías que inducen la apoptosis en <i>C. elegans</i>	27

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10. Animales <i>elb-1</i> (RNAi) que carecen de gónada y tienen una vulva protuberante.....	42
11. Estudio de la apoptosis fisiológica en animales RNAi para genes que en ayuno tienen una menor expresión.....	43
12. Estudio de la apoptosis fisiológica en animales RNAi para genes que en ayuno tienen una mayor expresión.....	44
13. Animales control (PV).....	45
14. Animales <i>vps-39</i> (RNAi) que muestran una acumulación de cuerpos apoptóticos.....	46
15. Animales T05F1.2 (RNAi) que en ayuno presentan el citoplasma concentrado hacia el núcleo y ovocitos granulosos.....	49
16. Animales T02C12.3 (RNAi) que presentan cuerpos apoptóticos en la región más proximal, ovocitos pequeños y huecos en el citoplasma.....	50
17. Estudio de la apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para genes que se expresan menos en ausencia de comida.....	52

18.	Estudio de la apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para genes que se expresan más en ausencia de comida.....	53
19.	Animales <i>dsh-2</i> (RNAi) con anomalías en la cabeza y en la cola además de una gónada pequeña.....	55
20.	Animales <i>adm-4</i> (RNAi) que en condiciones de ayuno los ovocitos presentan huecos en el citoplasma.....	56
21.	Animales D1046.2 (RNAi) que muestran ovocitos granulosos y pequeños en condiciones de ayuno.....	57
22.	Fertilidad de los animales RNAi en los genes indicados.....	61
23.	Animales D1046.2 (RNAi) que no tienen defectos en el número de ovocitos ni de espermatozoides.....	63
24.	Los animales RNAi en el gen D1046.2 tienen más células germinales en la zona de transición (ZT) sugiriendo un defecto en la mitosis o en la meiosis.....	64
25.	Animales D1046.2 (RNAi) que tienen una zona de transición más larga y presentan núcleos en transición en la región más proximal.....	65
26.	Las gónadas de los animales D1046.2 (RNAi) no presentan problemas evidentes durante la mitosis debido a que las células positivas para la histona H3 se localizan en la región distal.....	66
27.	Morfología de la gónada de animales T05F1.2 (RNAi) mantenidos en condiciones normales de crecimiento.....	69
28.	Animales T05F1.2 (RNAi) que muestran una leve diferencia en el número de ovocitos.....	70
29.	Los animales T05F1.2 (RNAi) no tienen diferencias significativas en las tres regiones de la gónada.....	71
30.	Tabla que resume los resultados obtenidos.....	76

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AB	Célula fundadora somática que da lugar a la faringe, a la hipodermis y a neuronas.
ABL-1	Proteína tirosina cinasa citoplásmica y nuclear que es antagonista de p53.
AC	Célula ancla.
ADAM	Familia de desintegrinas y metaloproteasas a la cual pertenece la proteína ADM-4. Esta proteína participa en la vía de señalización de LIN-12/Notch.
APAF-1	Factor activador de la proteasa apoptótica, forma parte del apoptosoma.
APC/C	Complejo promotor de la anafase que tiene la función de una ligasa de ubiquitina.
Bcl-2	Linfoma de la célula B, familia de proteínas pro o anti-apoptóticas.
BH3	Dominio característico de proteínas de la familia Bcl-2.
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> . Herramienta para alinear secuencias.
C	Célula fundadora que da lugar a células musculares, de la hipodermis y a 2 neuronas.
C2H2	Dominio que interactúa con residuos de cisteína y de histidina.
CAR-1	Proteína asociada a RNA que participa en la citocinesis y en la apoptosis.
Cdc20	Proteína reguladora durante el ciclo celular que interactúa con diversas proteínas entre las cuales se encuentra el complejo APC/C.
CED	Muerte celular anormal.
CED-1	Receptor transmembranal.
CED-12	Pequeña GTPasa del tipo Rac.

CED-3	Caspasa.
CED-4	Proteína adaptadora que interactúa con CED-3 formando el apoptosoma.
CED-9	Proteína anti-apoptótica que forma parte de la familia Bcl-2.
CEP-1	Proteína tipo p53 en <i>C. elegans</i> .
CGH-1	Helicasa conservada de RNA de la línea germinal.
CPB-3	Miembro de la familia de CPEB de unión a la cola de poliA.
CPEB	Proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplásmica.
CPS-6	Endonucleasa mitocondrial.
Cyp	Familia de citocromos.
Cys	Abreviatura para el residuo del aminoácido cisteína.
D	Célula fundadora que da lugar a células musculares.
DAD-1	Proteína protectora de la muerte por apoptosis.
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol, molécula fluorescente que une DNA.
DAZ-1	Azoospermia suprimida.
DEP	Dominio que reconoce de manera específica a receptores acoplados a proteínas G.
DIX	Dominio necesario para la transducción de señales.
DNA	Ácido desoxiribonucléico.
DP	Familia de proteínas que forman parte del heterodímero E2F/DP en mamíferos.
DPL-1	Factor de transcripción similar al gen DP de vertebrados.
DSH-2	Proteína Dishevelled que participa en la vía de factores Wnt.
DSL-1	Proteína con dominio de unión al ligando LAG-2.
DTC	Célula del extremo distal de la gónada.
DU	Célula precursora del útero dorsal.
E	Célula fundadora descendiente de EMS que da lugar al intestino.
E2F	Familia de factores de transcripción que participan en la regulación del ciclo celular.

EFL-1	Proteína de <i>C. elegans</i> homóloga a los miembros de la familia de E2F/DP.
EGL-1	Puesta de embriones defectuosa. EGL-1 es una proteína con un dominio BH3 que activa la vía canónica de la apoptosis.
EGL-38	Proteína de <i>C. elegans</i> de la familia de PAX.
EGTA	Compuesto químico utilizado como agente quelante de iones de calcio.
eIF4A, eIF4GI y II, eIF2 α	Factores de inicio de la traducción.
ELB-1	Elongina B.
Emb	Embriones.
EMS	Célula que da origen al mesodermo y al endodermo.
Esp	Espermateca.
F1	Primera generación filial.
GC	Células germinales.
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
GFP	Proteína verde fluorescente.
GLA-3	Apoptosis de la línea germinal.
GLP-1	Proliferación anormal de la línea germinal, receptor que participa en la vía LIN-12/Notch.
GSK	Familia de las cinasas sintasas de glucógeno.
H3	Histona H3 que forma parte de los nucleosomas.
HEPES	Compuesto orgánico utilizado como agente amortiguador.
His	Abreviatura del residuo del aminoácido histidina.
HOPS	Complejo homotípico de fusión y de clasificación de proteínas vacuolares.
ICD-1	Proteína mitocondrial inhibitoria de la apoptosis.
IMA-3	Proteína de la familia de importinas alfa.
IPTG	Isopropinol β -D-1-tiogalactopiranosido, inductor de la transcripción para la formación del RNA de doble cadena.

JNK	Miembro de la superfamilia de las MAPK que participa en la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por estrés.
L1, L2, L3 y L4	Estados larvarios del nematodo <i>C. elegans</i> .
LAG-2	Proteína transmembranal de la familia DSL, ligando señal que interactúa con los receptores GLP-1 y LIN-12.
LB	Medio Luria-Bertani.
LIN-12	Linaje celular anormal. LIN-12 es un receptor transmembranal.
LIN-12/Notch	Vía canónica fundamental para establecer el destino celular durante el desarrollo.
LIN-35	Ortólogo del gen de retinoblastoma Rb.
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos.
MCD-1	Modificador del fenotipo de muerte celular.
MEK-1	MAP cinasa cinasa o cinasa ERK, participa en la cascada de JNK.
MIG	Migración celular anormal. MIG-2 es una pequeña GTPasa del tipo Rho.
MOM-2	Miembro de la familia de factores Wnt.
mRNA	RNA mensajero.
MS	Célula fundadora descendiente de EMS que da lugar a células musculares, de la faringe y la gónada somática.
N2	Cepa silvestre de <i>C. elegans</i> .
NGM	Medio para crecer nematodos.
NGS	Suero normal de cabra.
NHR-49	Receptor hormonal nuclear.
NPC	Complejo del poro nuclear.
O	Ovocitos.
OP50-1	Cepa de la bacteria <i>E. coli</i> .
P	Generación parental.
P0	Cigoto.
P1	Célula descendiente de la primera división asimétrica de P0.

p38	Miembro de la superfamilia de las MAPK que participa en la vía de señalización de proteínas cinasas activadas por estrés.
P4	Célula fundadora que da origen a la línea germinal.
p53	Factor de transcripción que regula el ciclo celular y que se considera un gen supresor de tumores.
PAX	Familia de factores de transcripción de caja pareada. PAX-2 es una proteína en <i>C. elegans</i> que participa en la apoptosis de la línea germinal.
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos.
PBT	PBS con el detergente Tween 20.
PCH-2	Proteína de <i>C. elegans</i> requerida para el control del proceso sináptico entre los cromosomas homólogos. Induce la apoptosis de las células germinales.
PDZ	Dominio requerido para la interacción tipo proteína-proteína.
PMK-3	MAP cinasa de la familia de p38.
PQ	Región de células en paquíteno en la gónada, inicio de la meiosis.
PS	Fosfatidilserina.
PV	Plásmido vacío, que carece de inserto.
RACK-1	Receptor de la proteína cinasa C (PKC) activa.
Ras/MAPK	Vía canónica de activación de las cinasas dependientes de mitógenos.
RD	Región distal de la gónada, células en mitosis.
RFP-1	Proteína con dominios de anillo.
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por el RNA de doble cadena.
RNA	Ácido ribonucléico.
RNAasa III	Endoribonucleasa que procesa RNA exógeno.
RNA _{dc}	RNA de doble cadena.
RNAi	RNA de interferencia.
RNP	Complejos ribonucleoprotéicos.

RRF-1	RNA polimerasa dirigida por RNA. <i>rrf-1</i> (ok589) es una cepa mutante de <i>C. elegans</i> que permite hacer RNAi únicamente en la gónada.
SEK-1	MAP cinasa cinasa perteneciente a la cascada de p38.
SG	Gránulos de estrés.
siRNA	Pequeños RNA de interferencia.
SPh	Primordio gonadal somático del hermafrodita.
SS	Célula precursora que da origen a la vaina y a la espermateca.
SUP-17	Proteína supresora de la familia ADAM.
T7	Promotor de inicio de la transcripción.
TIA-1	Proteína de unión a la cola de poliA y asociada a gránulos de estrés.
U	Útero.
UNC	No coordinado. UNC-73 es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina.
VPS-39	Proteína relacionada al factor de clasificación de proteínas vacuolares de levadura.
VU	Célula precursora del útero ventral.
WD40	Dominio con repetidos de residuos de triptofano (W) y de ácido aspártico (D) que participan en la interacción tipo proteína-proteína.
Wnt	Vía canónica de factores, fundamental en el desarrollo embrionario y en la vida adulta del animal.
Z2, Z3	Células descendientes de la célula fundadora P4 que dan origen a la línea germinal.
ZT	Zona de transición entre mitosis y meiosis en la gónada.

RESUMEN

En varios organismos, incluidos los mamíferos, cientos de células germinales son eliminadas por apoptosis mediante un mecanismo aún desconocido. En el *C. elegans*, a este tipo de muerte celular se le conoce como apoptosis fisiológica. La apoptosis de las células germinales también se puede inducir por otro tipo de factores como son el daño al DNA, la infección por patógenos y el estrés ambiental. En el nematodo, la apoptosis fisiológica y la inducida por ayuno tienen en común que son independientes de los genes *egl-1*, *cep-1*, *mek-1* y *sek-1*, los cuales se requieren para inducir otras formas de apoptosis. Con el propósito de aislar nuevos genes que regulen estos dos tipos de apoptosis y comprender su relación, se realizó un estudio de genes que se expresan diferencialmente en condiciones de ayuno. Para ello se utilizó la técnica del RNA de interferencia con el fin de ver si el silenciamiento de estos genes provoca variaciones en la apoptosis de los ovocitos, tanto en condiciones normales de crecimiento como de ayuno. En total se estudiaron 25 genes de los cuales, el silenciamiento de once de ellos provoca un aumento en la apoptosis fisiológica y cinco participan en la apoptosis inducida por ayuno. De estos genes se seleccionaron dos, D1046.2 y T05F1.2, con el propósito de hacer una exploración más a fondo de su fenotipo. El gen D1046.2 codifica para una proteína con un dominio de dedo de zinc. Los animales D1046.2 (RNAi) tienen la apoptosis fisiológica aumentada y son incapaces de inducir apoptosis en respuesta al ayuno, por lo que este gen podría participar en ambos tipos de apoptosis. Además, estos animales tienen una descendencia disminuida y defectos en la meiosis. El gen T05F1.2 codifica para una proteína que se expresa en la región media de la gónada y los animales RNAi tienen la apoptosis fisiológica aumentada. Además de este fenotipo, los animales no muestran ningún otro defecto en la morfología de la gónada ni en su fertilidad, lo que sugiere que el gen podría participar de manera específica en la apoptosis fisiológica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

Los nematodos son blastocelomados vermiformes y representan uno de los grupos más abundantes entre los Metazoa con cerca de 25 000 especies descritas. Los nematodos de vida libre se encuentran en diferentes habitats terrestres y acuáticos, mientras que los que son parásitos pueden atacar a casi todos los grupos de plantas y animales (Brusca y Brusca, 2002).

Uno de los nematodos más conocidos es el gusano de tierra *C. elegans*, el cual tiene la siguiente clasificación de acuerdo con Brusca y Brusca (2002):

Reino: Animalia

Phylum: Nematoda

Clase: Secernentea (Phasmida)

Subclase: Rhabditia

Orden: Rhabditida

Familia: Rhabditidae

Género: *Caenorhabditis*

Especie: *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans fue propuesto como modelo de estudio por Sydney Brenner en 1974 (Brenner, 1974). Este organismo de vida libre se ha convertido en una herramienta fundamental para la investigación debido a su rápido ciclo de vida (3 días), su tamaño pequeño (1.3 mm el adulto) y su fácil manejo y manutención en el laboratorio (Kourtis y Tavernarakis, 2007; Riddle et al., 1997). Se alimenta de bacterias y tiene una gran adecuación por lo que es fácil obtener grandes cantidades de animales (Riddle et al., 1997).

El *C. elegans* tiene la ventaja de ser un organismo translúcido, lo que facilita su observación bajo microscopía tipo Nomarski. El número de células no varía y la posición es constante entre los distintos individuos (Lettre y Hengartner, 2006; Yochem, 2006), además de que se conoce como se dividen y migran cada una de las células. El nematodo tiene un genoma pequeño y gracias a los métodos de clonación y mapeo se cuenta actualmente con una base de datos esencial para el estudio de este organismo (Riddle et al., 1997), la cual se encuentra disponible en la página web <http://www.wormbase.org/>.

1.2 Ciclo de vida, anatomía y desarrollo

El organismo pasa por cuatro estados larvarios (L1, L2, L3 y L4) para llegar a ser adulto. Existe una variante en el ciclo de vida en la que se detiene el desarrollo como respuesta a un estrés ambiental. Este fenómeno ocurre cuando la reproducción se ve comprometida al haber, ya sea una alta densidad poblacional, una carencia de alimento o un cambio drástico en la temperatura. A este estado, que puede ocurrir entre el primer y segundo estado larvario (Hu, 2007; Kourtis y Tavernarakis, 2007), se le conoce como larva *dauer*, término que viene del alemán y que significa durar o duradero. La larva *dauer* muestra características morfológicas y de comportamiento distintas a las larvas normales pues no se alimenta, se interrumpe la proliferación de las células germinales y puede sobrevivir hasta dos meses, mientras que en condiciones normales el *C. elegans* vive hasta 20 días. Cuando las condiciones son nuevamente favorables, esta larva vuelve a su ciclo normal resumiendo su crecimiento en el estado L4 hasta alcanzar el estado adulto (Figura 1) (Hu, 2007).

C. elegans es un organismo diploide (Schierenberg, 2006) en el que existen dos sexos, hermafroditas (XX) y machos (XO). Los hermafroditas son básicamente hembras que producen espermatozoides por un corto periodo de tiempo los cuales son suficientes para fertilizar sus propios ovocitos, aunque también se pueden cruzar con los machos y así aumentar la fertilidad y la variabilidad genética. Los machos son más pequeños y únicamente producen esperma. El plan corporal y muchas de sus estructuras son prácticamente iguales en ambos sexos pues hay 650 células que son idénticas de un total de 959 células en el hermafrodita y 1031 en el macho. Las principales diferencias entre ambos sexos radican en la gónada y en muchas de las neuronas y músculos que controlan las estructuras reproductivas (Herman, 2006).

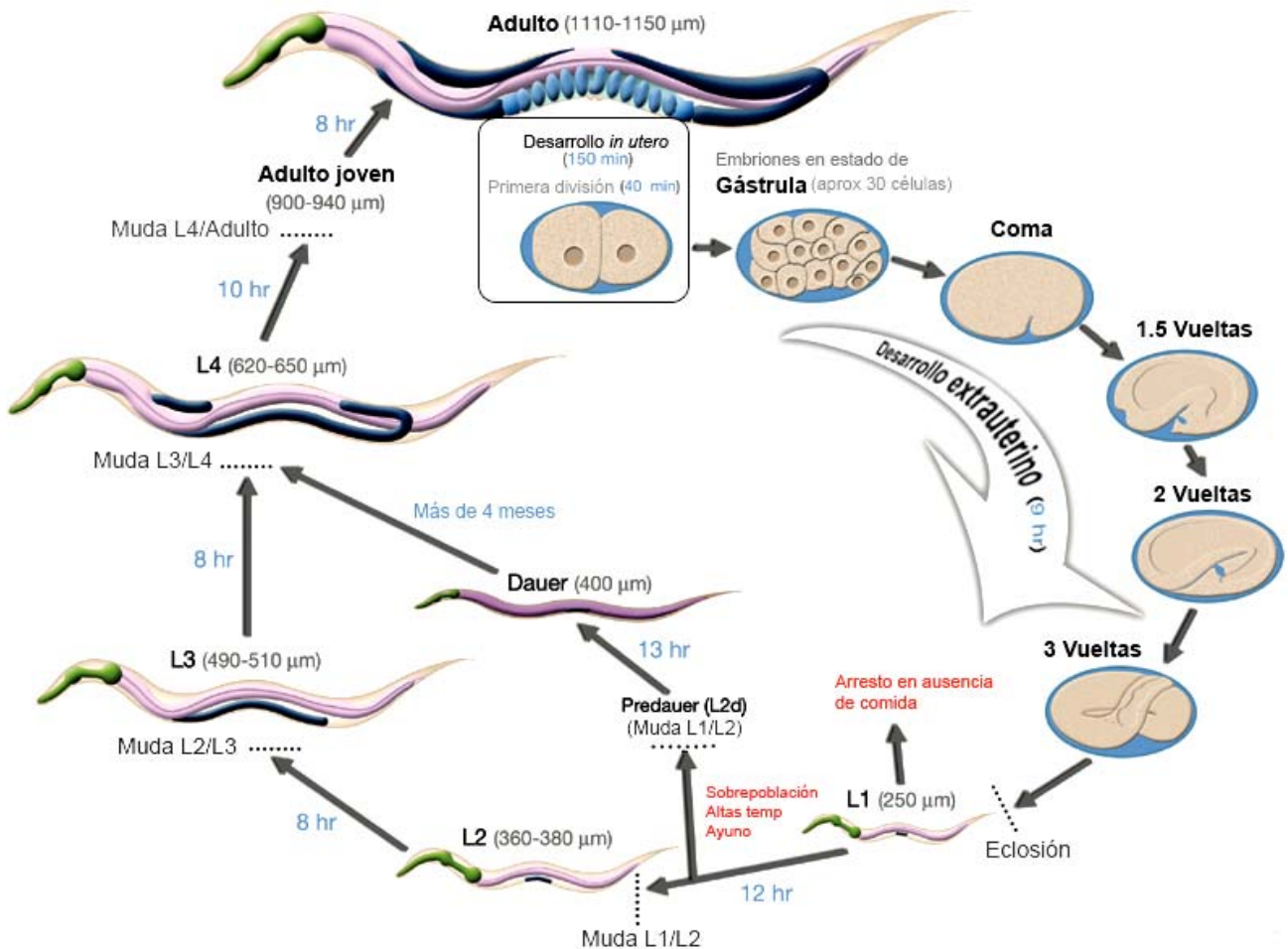


Figura 1: Ciclo de vida de *C. elegans*. El ciclo se divide en el desarrollo embrionario inicial que ocurre dentro del útero, el desarrollo embrionario extrauterino, los cuatro estados larvarios L1, L2, L3 y L4 y el adulto. Asimismo, está esquematizado el estado denominado *dauer* que ocurre entre los estados L2 y L3 ante un estrés ambiental. En el esquema se pueden observar los tamaños aproximados de cada estado y el tiempo que tarda en pasar de un estado a otro (tomada y modificada de Altun y Hall, 2006, <http://www.wormatlas.org/>, noviembre 2008).

El animal hermafrodita adulto tiene un cuerpo cilíndrico no segmentado que mantiene su forma gracias a la presión hidrostática interior. Está compuesto por una cutícula de colágena que es secretada por la hipodermis y que se renueva con cada estado larvario (Altun y Hall, 2006; Riddle et al., 1997). El nematodo presenta un sistema excretor, uno nervioso y uno muscular, los cuales se encuentran separados de la faringe, del intestino y de la gónada por el espacio pseudocelómico. El sistema nervioso está compuesto por ganglios que se encuentran distribuidos en la cabeza y la cola y, al igual que la hipodermis, están separados de la musculatura por una lámina basal. El sistema muscular está formado por dos músculos ventrales y dos dorsales que corren a lo largo del cuerpo del animal y otros pequeños músculos localizados

en la faringe, la vulva, el intestino y el recto. El sistema reproductivo consiste de una gónada somática, la línea germinal y el aparato ovopositor (Altun y Hall, 2006).

En *C. elegans* los ovocitos son fecundados al pasar por la espermateca en la región más proximal (Schierenberg, 2006) lo que lleva a la formación del cigoto. Éste muestra una división holoblástica rotacional en la que ocurren cinco divisiones asimétricas que producen a las seis células fundadoras: AB, MS, E, C, D y P4. Con la primera división se forman las células fundadoras AB y P1. La células AB sufren una segunda división ecuatorial y la P1 se divide meridionalmente formando las células EMS y P1. Las divisiones continúan dando lugar a los distintos linajes celulares (Figura 2) (Gilbert, 2006).

Durante estas primeras divisiones se establecen los ejes del plan corporal (Gönczy y Rose, 2005), formándose primero el eje antero-posterior definido por el lugar por donde entra el espermatozoide (Gilbert, 2006; Schierenberg, 2006). Cuando el pronúcleo espermático entra, a través de los movimientos del centriolo, éste es empujado hacia el extremo más próximo del ovocito dando lugar al polo posterior del embrión. El eje dorsoventral está definido por la célula AB, que se ubica dorsalmente, y la EMS que se localiza ventralmente. Por último, el eje derecho-izquierdo se define cuando la célula MS hace contacto con las descendientes de la célula AB en el estado embrionario de 12 células (Gilbert, 2006).

Una vez definidos los ejes comienza la gastrulación, proceso en el cual se ordenan las capas embrionarias gracias a una serie de movimientos de internalización de las células (Nance et al., 2005). En el *C. elegans* la gastrulación comienza en el estado embrionario de 24-26 células y es el endodermo el primer tejido en ser internalizado (Gilbert, 2006; Nance et al., 2005). Las dos células hijas de la célula E, Ea y Ep, migran desde la región ventral hacia el centro del embrión en donde se dividen para formar un primordio intestinal de 20 células (Gilbert, 2006). Previo a este proceso se forma un blastocele rudimentario y transitorio (Gilbert, 2006; Schierenberg, 2006) que se convierte en un blastoporo tras esta primera migración. A través de este blastoporo migra la célula precursora de la línea germinal P4 que se sitúa cerca del primordio intestinal. A continuación se desplazan las células mesodérmicas MS y sus células descendientes migran por la parte anterior del

blastoporo. Las células C y D, derivadas de células precursoras musculares, entran por el lado posterior. Estas células se organizan flanqueando el

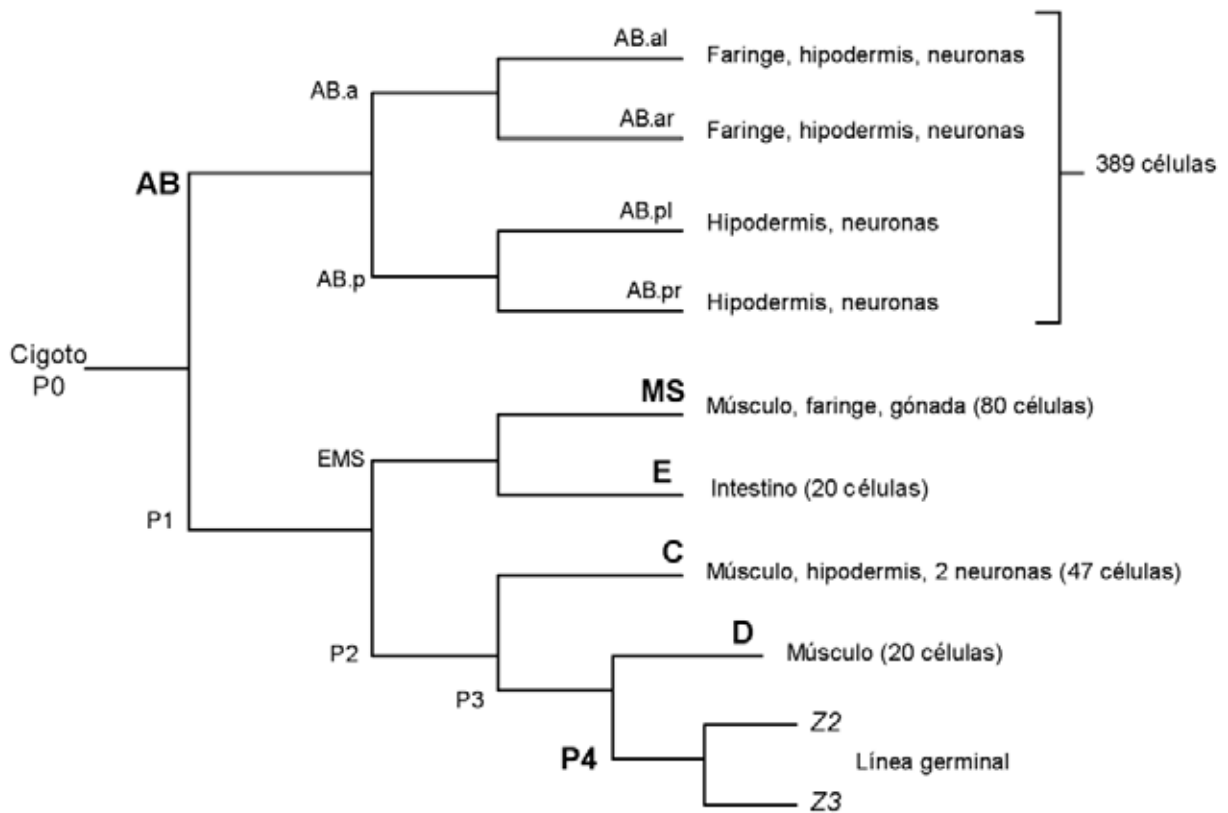


Figura 2: Linaje celular durante la embriogénesis del *C. elegans*. El esquema muestra en letras negritas las células fundadoras y en cursivas aquellas que dan lugar a la línea germinal. Se muestran los tejidos originados por cada célula fundadora y entre paréntesis aparece el número de células descendientes que conforman la larva eclosionada con un total de 558 células (tomada de Gilbert, 2006 y modificada).

tubo intestinal por ambos lados. Por último, seis horas después de la fertilización, entran las células derivadas de la célula fundadora AB. Al mismo tiempo, las células del hipoblasto se desplazan por el centro con movimientos epibólicos cerrando el blastoporo. Durante las siguientes seis horas las células que migraron se dividen y se organizan para dar lugar a los órganos y formar la larva con un total de 558 células (Gilbert, 2006).

1.3 Gónada del hermafrodita adulto y desarrollo de la línea germinal

El aparato reproductivo del hermafrodita adulto se puede dividir en tres partes: la gónada somática, la línea germinal y el aparato ovopositor. La gónada somática está conformada por la célula del extremo distal (DTC), la vaina, la espermateca y el útero que junto con la línea germinal forman dos tubos

simétricos en forma de U conectados con el útero en la región ventral (Figura 3 A). En el hermafrodita adulto, la línea germinal está organizada en una dirección distal a proximal, definiendo proximal como la zona más cercana al útero. Las células germinales en la región más distal se encuentran en mitosis y al irse desplazando hacia el útero entran a meiosis alcanzando el estado de paquíteno cerca del asa de la gónada, para acabar de madurar en la región más proximal (Altun y Hall, 2006). Durante el estado larvario L4 producen primero una cantidad específica de espermatozoides en ambos tubos gonadales, pues las primeras 40 células se convierten en cerca de 160 espermatozoides que son almacenados en la espermateca. Una vez formados, el resto de las células se vuelven ovocitos al entrar al estado adulto (Ellis y Schedl, 2007). En cambio, en el macho la gónada es un solo tubo que únicamente produce espermatozoides durante toda su vida reproductiva (Altun y Hall, 2006).

En la gónada del hermafrodita el número de células germinales aumenta exponencialmente durante los primeros dos estados larvarios y, en el estado L3, el núcleo germinal más proximal entra a meiosis, lo que establece la polaridad de la línea germinal. A partir de ese momento la región distal se encuentra restringida a divisiones mitóticas. Cada tubo gonadal tiene la célula somática del extremo distal (DTC), la cual controla la proliferación de las células germinales durante todo el desarrollo y mantiene la mitosis en la línea germinal del adulto. Las células germinales localizadas en la región mitótica de la gónada del adulto se autorenewan y continuamente generan nuevos gametos, por lo que se les considera células troncales. La célula distal mantiene el nicho para estas células y controla su proliferación. Dicha proliferación es regulada por una señalización tipo Notch que controla la localización distal de la mitosis y se mantiene gracias a la expresión del ligando señal LAG-2 producido por la célula distal. El ligando interactúa con el receptor GLP-1 de las células promoviendo la mitosis. Por lo tanto, esta célula es fundamental para mantener la proliferación mitótica de las células germinales en la región más distal (Kimble y Crittenden, 2005; Kimble y Crittenden, 2007).

Las células que se encuentran más alejadas de la DTC y que pierden la influencia de LAG-2 entran a meiosis. El inicio de la meiosis ocurre en el estado larvario L3 y continúa en el estado L4 durante la elongación de la gónada y la

producción de espermatozoides. En el adulto, el paso de mitosis a meiosis se da cuando las células se desplazan de la región mitótica a la zona de transición donde las células comienzan la profase I de la meiosis (Kimble y Crittenden, 2005; Kimble y Crittenden, 2007). Los núcleos de las células mitóticas y las meióticas tempranas localizadas en la región distal se encuentran parcialmente encerradas por una membrana plasmática formando un sincicio (Figura 3 B) y completan su celularización pasando el asa de la gónada previo a la maduración del ovocito (Wolke et al., 2007).

En la zona de transición los núcleos se encuentran generalmente en los estados de leptoteno y cigoteno y alcanzan la fase de paquíteno muy cerca del asa de la gónada. En respuesta a la activación de la vía de Ras/MAPK, las células germinales salen de la fase de paquíteno y continúan hasta la fase de diacinesis, fase en la cual permanecen los ovocitos antes de madurar y ser ovulados. Finalmente, el ovocito más proximal madura ante una señal proveniente de los espermatozoides y durante la ovulación las células somáticas de la vaina se contraen para que el ovocito se desplace hacia la espermateca, en donde es fecundado, para luego ser depositado en el útero (Hubbard y Greenstein, 2000).

La línea germinal es el conjunto de células que dan lugar a los espermatozoides y a los ovocitos (Schierenberg, 2006; Strome, 2005) la cual, durante la embriogénesis temprana, se separa de los linajes celulares somáticos (Hubbard y Greenstein, 2000). Una vez que se forma el cigoto P0, la determinación del linaje celular de P1 es autónoma, es decir, el destino celular es establecido por factores citoplásmicos internos y no por la interacción con las células vecinas (Gilbert, 2006). La línea germinal también se establece y diferencia gracias a la presencia de unos gránulos de RNA y proteínas conocidos como gránulos P, los cuales se reparten de manera asimétrica en los blastómeros germinales. Estos gránulos se pueden observar en los blastómeros germinales P2 y P3 y se caracterizan por estar asociados al núcleo en etapas posteriores. A partir de P1 y tras una serie de divisiones celulares asimétricas se forma la célula germinal primordial P4 de la cual derivan todas las células germinales (Figura 4 A). P4 entra

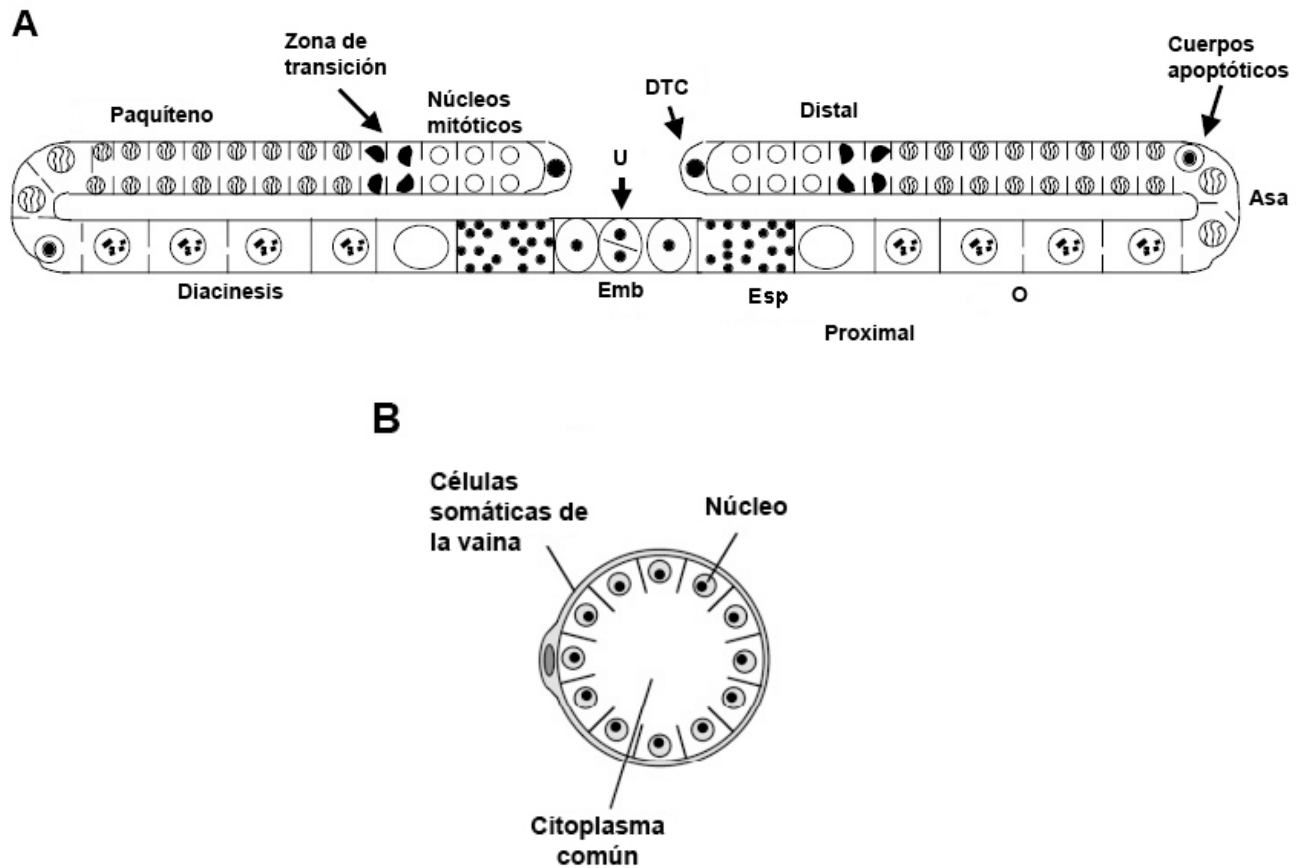


Figura 3: Gónada de *C. elegans*. **A:** Esquema que muestra la región distal con la célula del extremo distal (DTC) y los núcleos mitóticos, la zona de transición, la región de paquíteno, el asa y la parte proximal con ovocitos (O) en diacinesis. Se aprecia también la espermateca (Esp) y los embriones (Emb) depositados en el útero (U) (tomada de Salinas *et al.*, 2006 y modificada). **B:** Corte transversal de la región distal de la gónada que muestra los núcleos compartiendo citoplasma y formando un sincicio (tomada y modificada de Gumienny *et al.*, 1999).

al interior del embrión durante la gastrulación y se divide simétricamente al alcanzar el estado embrionario de 100 células dando origen a las dos células precursoras de la línea germinal, Z2 y Z3. Es importante decir que tanto a la célula P4 como a sus dos células hijas se les denomina células germinales primordiales o PGC por sus siglas en inglés.

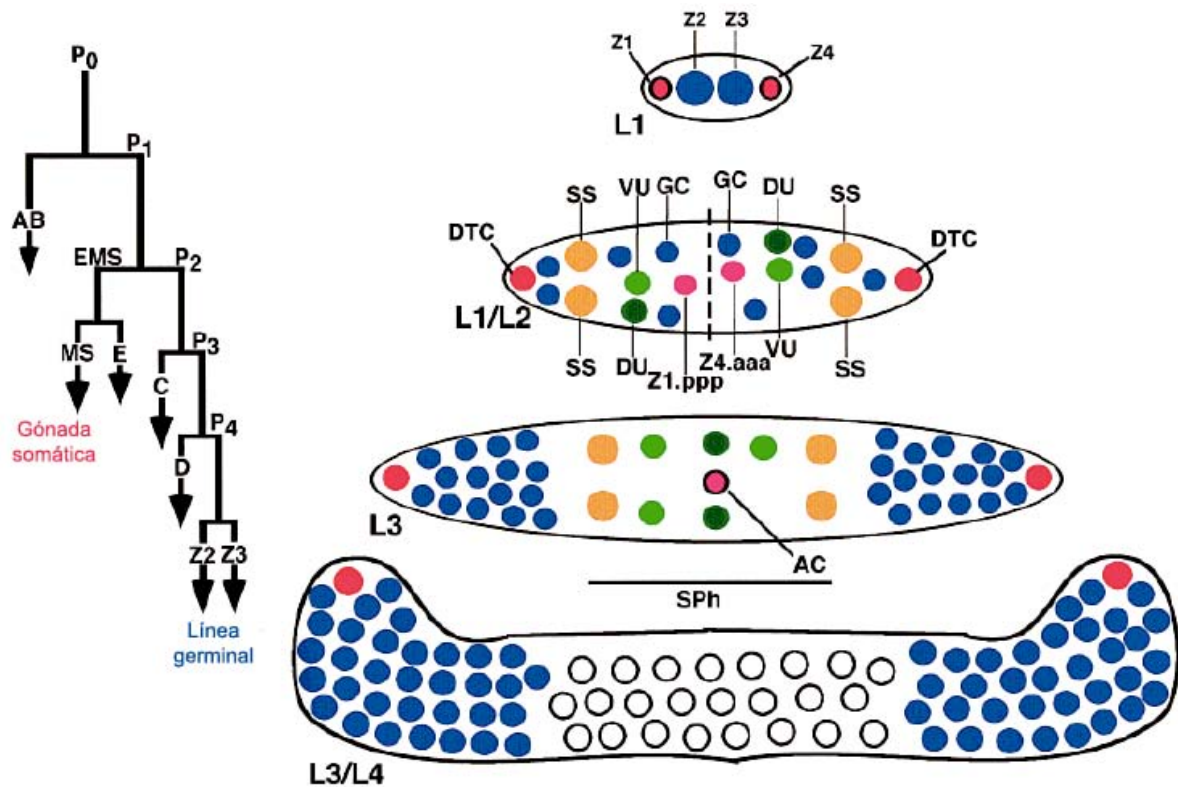


Figura 4: Gonadogénesis. **A:** Linaje celular de la línea germinal. Se muestran las primeras divisiones asimétricas que sufre el cigoto P₀ y que dan lugar a los blastómeros somáticos AB, MS, C, D y a los blastómeros germinales P₁, P₂, P₃ y P₄. Se muestran las células hijas de P₄, Z₂ y Z₃, que dan origen a la línea germinal. **B:** Esquema que representa el desarrollo de la línea germinal durante los distintos estados larvarios. Se muestran las células precursoras Z₁, Z₂, Z₃ y Z₄ durante el estado L1. En la transición L1/L2 se forman las células del extremo distal (DTC) y comienzan a proliferar las células germinales (GC). También se forman las células precursoras que darán lugar a la vaina y a la espermateca (SS), el útero ventral (VU) y el dorsal (DU) (Simms et al.) y las células Z₁.ppp y Z₁.aaa que darán origen a la célula ancla (AC). Todas las células somáticas conforman el primordio gonadal somático (Sph) el cual se define en el estado larvario L3. Durante la transición L3/L4 las células germinales siguen proliferando mientras se van elongando los brazos gonadales (tomada de Hubbard y Greenstein, 2000 y modificada).

Cuando el organismo eclosiona la línea germinal se compone de las células precursoras Z₂ y Z₃, las cuales están separadas por una lámina basal de las células fundadoras de la gónada somática Z₁ y Z₄. Estas últimas son células mesodérmicas que aparecen durante la embriogénesis tardía y migran para asociarse con las células germinales. Z₁ y Z₄ se dividen durante el desarrollo larvario, justo a mediados del estado larvario L1, generando 143 células en el hermafrodita y 56 en el macho. En el hermafrodita las células descendientes forman los dos brazos gonadales, la espermateca y el útero. En el macho se forma sólo un brazo gonadal, la vesícula seminal y el conducto deferente. Las dos células descendientes de Z₁/Z₄, Z₁.aa y Z₄.pp, tienen un

papel fundamental durante el desarrollo de la línea germinal pues son las que dan lugar a las células del extremo distal. Estas células se localizan en el extremo anterior y posterior de la gónada durante el desarrollo del hermafrodita y en machos se ubican en el extremo distal.

Al final del estado larvario L2 la gónada somática del hermafrodita está formada por 12 descendientes de las células Z1/Z4 y la línea germinal ha proliferado hasta tener aproximadamente 30 células. Las células distales se ubican en los extremos de ambos brazos gonadales mientras éstos se van alargando. El resto de las descendientes de Z1/Z4 se desplazan hacia el centro de la gónada durante la muda del estado L2 a L3, con lo cual se forma el primordio gonadal somático del hermafrodita (SPh) que dará lugar a la célula ancla (AC) y las células precursoras uterinas, VU y DU (Figura 4 B). Mientras se va organizado el primordio gonadal somático, las células germinales comienzan a poblar los dos brazos gonadales y en el estado larvario L3 las células más proximales entran a la profase I de la meiosis. Una vez que se formaron los espermatozoides y todas las estructuras somáticas durante el desarrollo larvario, la gónada se vuelve sexualmente madura al entrar al estado adulto (Hubbard y Greenstein, 2000).

1.4 Muerte celular

La muerte celular es un mecanismo utilizado durante el desarrollo o en la vida adulta de un organismo para eliminar la células que ya no son necesarias o que son potencialmente perjudiciales (Riddle et al., 1997). Existen tres principales tipos de muerte celular: la necrosis, la autofagia y la apoptosis. En la necrosis las células mueren en respuesta a un daño mecánico a un tejido. Las células se hinchan y se revientan provocando la liberación del contenido citoplasmático, lo cual puede dañar otras células adyacentes y generar inflamación (Lodish et al., 2004).

La autofagia es un sistema de degradación intracelular que transfiere componentes citoplasmáticos al lisosoma. Existen tres tipos de autofagia, la macroautofagia, la microautofagia y la llevada a cabo por chaperonas (Klionsky, 2005; Mizushima, 2007). El término autofagia se refiere en general al proceso de macroautofagia, un tipo de muerte celular programada que ocurre por medio del autofagosoma (Mizushima, 2007).

Recientemente se ha demostrado que la autofagia tiene distintos papeles fisiológicos en diversos procesos como son: la adaptación al ayuno, la degradación de proteínas intracelulares y de organelos, el desarrollo y la eliminación de microorganismos entre otras. De hecho, la autofagia se dispara comúnmente ante la ausencia de uno o varios nutrientes esenciales.

La dinámica de las membranas durante la autofagia está muy conservada desde las levaduras hasta las plantas y los animales. En un inicio se forma el autofagosoma, un organelo de doble membrana que resulta cuando una membrana llamada fagóforo secuestra los constituyentes citoplásmicos. Una vez formado el autofagosoma, el contenido no es destruido sino hasta que se fusiona con el lisosoma. Después de que las hidrolasas degradan el contenido, algunos componentes como los aminoácidos son exportados al citosol para ser reutilizados (Mizushima, 2007).

Por otro lado, la apoptosis es otro tipo de muerte celular programada que se presenta durante el desarrollo de invertebrados como los nematodos y los insectos y de mamíferos como los humanos (Baum et al., 2005). Este tipo de muerte celular requiere de muchos controles, pues un fallo en este mecanismo puede producir una gran cantidad de patologías tales como el cáncer y algunas enfermedades autoinmunes. De igual manera, la activación aberrante de este programa puede derivar en enfermedades neurodegenerativas (Riddle et al., 1997).

El primer cambio ultraestructural que se puede observar en las células de mamíferos es la condensación y segmentación de la cromatina en masas electrodensas y uniformes. Este proceso es seguido de la condensación del citoplasma y la involución de la membrana nuclear y celular. Al final, la célula se rompe en fragmentos membranosos o cuerpos apoptóticos que contienen todavía organelos y a veces algunos fragmentos nucleares. En los tejidos, los cuerpos apoptóticos son fagocitados rápidamente por las células adyacentes y degradados en los lisosomas. En mamíferos, la ejecución de la apoptosis se lleva a cabo por dos vías principales que activan a las caspasas: la vía intrínseca que requiere de la salida del citocromo c de la mitocondria y la vía extrínseca inducida por la activación de los receptores de muerte. La activación de la caspasa 3 se lleva a cabo por medio del apoptosoma, un complejo protéico compuesto por APAF-1, citocromo c y caspasa 9. También existen

otras proteínas pertenecientes a la familia BCL-2 que pueden tener funciones anti o proapoptóticas (Lossi y Gambino, 2008).

1.5 Mecanismos de apoptosis en *C. elegans*

De las 1090 células que se generan durante el desarrollo del hermafrodita 131 mueren por apoptosis (Kourtis y Tavernarakis, 2007; Lettre y Hengartner, 2006; Riddle et al., 1997; Stergiou y Hengartner, 2004). La apoptosis durante el desarrollo es importante para mantener la homeostasis general o para eliminar células dañadas. Muchas de las células que se mueren durante el desarrollo temprano son principalmente neuronas, pero también mueren células hipodérmicas, musculares o de la faringe (Lettre y Hengartner, 2006). Al parecer dicha muerte ocurre de una manera autónoma y dependen de la actividad de la proteína EGL-1, proteína que forma parte de la familia Bcl-2. En las células destinadas a morir la actividad de esta proteína es muy alta en comparación con las 959 células que están destinadas a sobrevivir (Conradt y Xue, 2005).

En *C. elegans*, la muerte celular ocurre principalmente durante la embriogénesis. La primera etapa de apoptosis empieza alrededor de los 250 a 450 minutos después de la fertilización y en la cual se eliminan alrededor de una quinta parte de las células formadas durante el desarrollo embrionario. La segunda etapa, de menor amplitud, se observa durante el segundo estado larvario (L2), después de la división de varios neuroblastos y en la cual se eliminan algunas de las neuronas recién formadas. Después de este momento ya no se observa la muerte de células somáticas. La tercera etapa se aprecia en la línea germinal del hermafrodita adulto en la que mueren más de la mitad de las células germinales (Figura 5) (Lettre y Hengartner, 2006).

La apoptosis en *C. elegans* presenta una serie de cambios morfológicos que con microscopía tipo Nomarski se observan como un decremento en la refracción del citoplasma, una pérdida en la textura celular y un aumento en la refracción del núcleo. Poco después, tanto el citoplasma como el núcleo se vuelven refractantes y la célula parece un disco aplanado, el cual va desapareciendo al ser digerido por las células vecinas (Riddle et al., 1997). A nivel ultraestructural, las células muestran una condensación de la cromatina y una reducción en el volumen celular, las mitocondrias se fragmentan, los

organelos son degradados y la célula se fracciona formando los cuerpos apoptóticos (Lettre y Hengartner, 2006; Riddle et al., 1997).

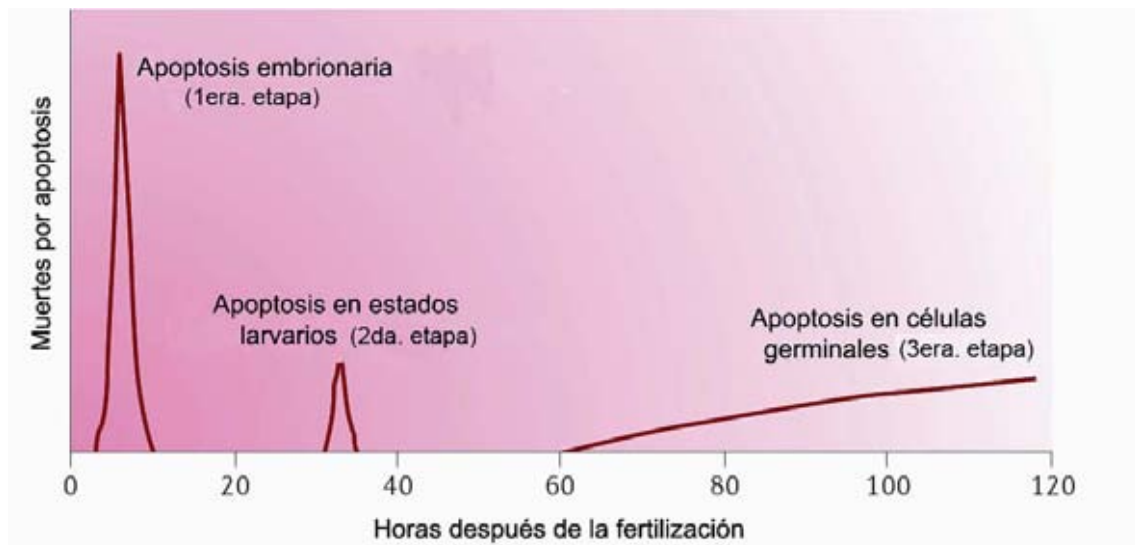


Figura 5: Apoptosis durante el desarrollo de *C. elegans*. Las dos primeras etapas ocurren en células somáticas, la primera durante la embriogénesis y la segunda durante el desarrollo larvario. La tercera etapa de muerte apoptótica ocurre únicamente en las células germinales del hermafrodita adulto y dura hasta que termina el periodo reproductivo (tomada de Lettre y Hengartner, 2006 y modificada).

En el nematodo, la apoptosis se puede dividir en cuatro pasos principales: la decisión de muerte, la ejecución de la muerte, la fagocitosis y la degradación (Lettre y Hengartner, 2006). Los genes *egl-1*, *ced-9*, *ced-4* y *ced-3* (Figura 6) se presentan en todos los tipos celulares por lo que forman parte de una vía central de muerte celular apoptótica (Riddle et al., 1997).

La apoptosis se desata mediante alguna señal durante el desarrollo o por algún estímulo ambiental. Cuando se inicia la cascada apoptótica se encienden una serie de genes que regulan la apoptosis somática y que se denominan *egl-1* (*egg-laying defective*) y *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* (*cell death abnormal*). La pérdida de la función de *ced-3*, *ced-4* y *egl-1* inducen la supervivencia de las células que en condiciones normales estaban destinadas a morir, por lo que los tres tienen funciones pro-apoptóticas. En cambio, *ced-9* tiene la propiedad de un gen antiapoptótico, ya que una mutación que induce su expresión de manera aberrante inhibe la apoptosis. La pérdida de su función provoca la muerte de las células que no estaban destinadas a morir y por tanto la muerte del organismo a una edad temprana del desarrollo. Los análisis epistáticos indican que *egl-1* actúa como un regulador negativo de *ced-9* y éste

a su vez es un regulador negativo de *ced-4* y de *ced-3* (Figura 6) (Conradt y Xue, 2005; Lettre y Hengartner, 2006).

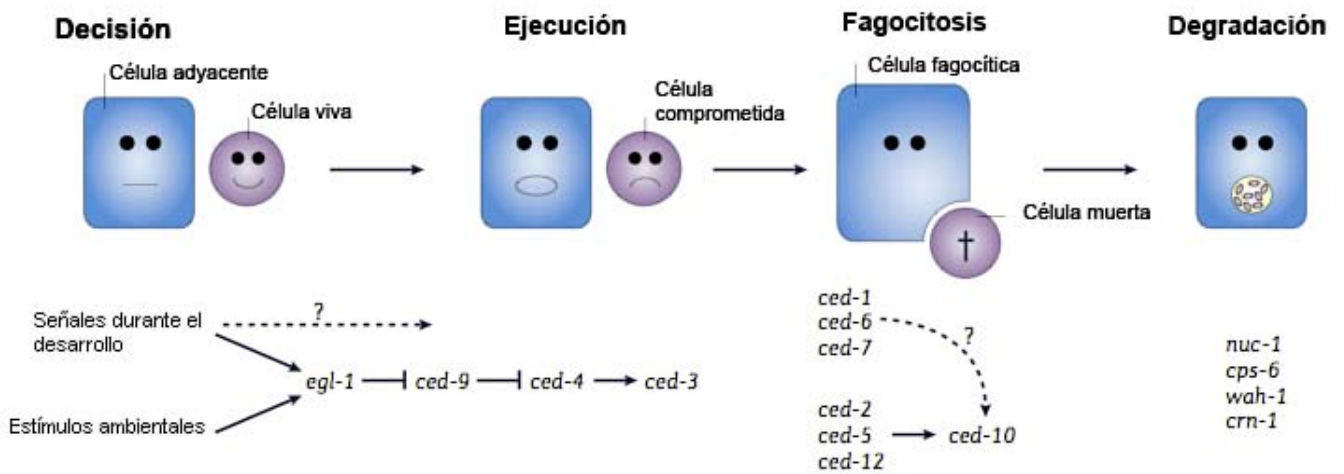


Figura 6: Apoptosis en *C. elegans*. El esquema presenta los cuatro pasos más importantes en la vía de apoptosis: la decisión de morir, la ejecución, la fagocitosis y la degradación del cuerpo apoptótico. También se muestra la cascada génica principal de la apoptosis y los principales genes involucrados en las etapas de fagocitosis y degradación (tomada y modificada de Lettre y Hengartner, 2006).

CED-3 es una proteasa de la familia de las caspasas la cual se sintetiza como un zimógeno inactivo (Stergiou y Hengartner, 2004). CED-3 es activado por auto-proteólisis y su actividad de proteasa es esencial para provocar la apoptosis en *C.elegans*. CED-4 es una proteína adaptadora muy similar a la proteína de mamíferos APAF-1, activadora de la caspasa 9 en humanos. Al igual que con los homólogos de mamíferos, CED-3 y CED-4 se oligomerizan para formar un complejo parecido al apoptosoma, interacción necesaria para la activación de CED-3 (Conradt y Xue, 2005; Lettre y Hengartner, 2006).

Por otro lado, *ced-9*, *egl-1* y *ced-13* forman parte de la familia de Bcl-2. CED-9 es una proteína que tiene cuatro dominios homólogos a Bcl-2 (Lettre y Hengartner, 2006), mientras que EGL-1 y CED-13 son proteínas que tienen un dominio BH3 e interactúan con CED-9 para promover la apoptosis (Lettre y Hengartner, 2006; Schumacher et al., 2005).

La apoptosis en *C. elegans* se regula por una serie de interacciones entre las cuatro principales proteínas mencionadas. No obstante, otros genes que participan tanto en la degradación del DNA como en la fagocitosis también pueden contribuir a la activación de la apoptosis, por lo que la cascada génica no es tan lineal como se muestra en la Figura 6.

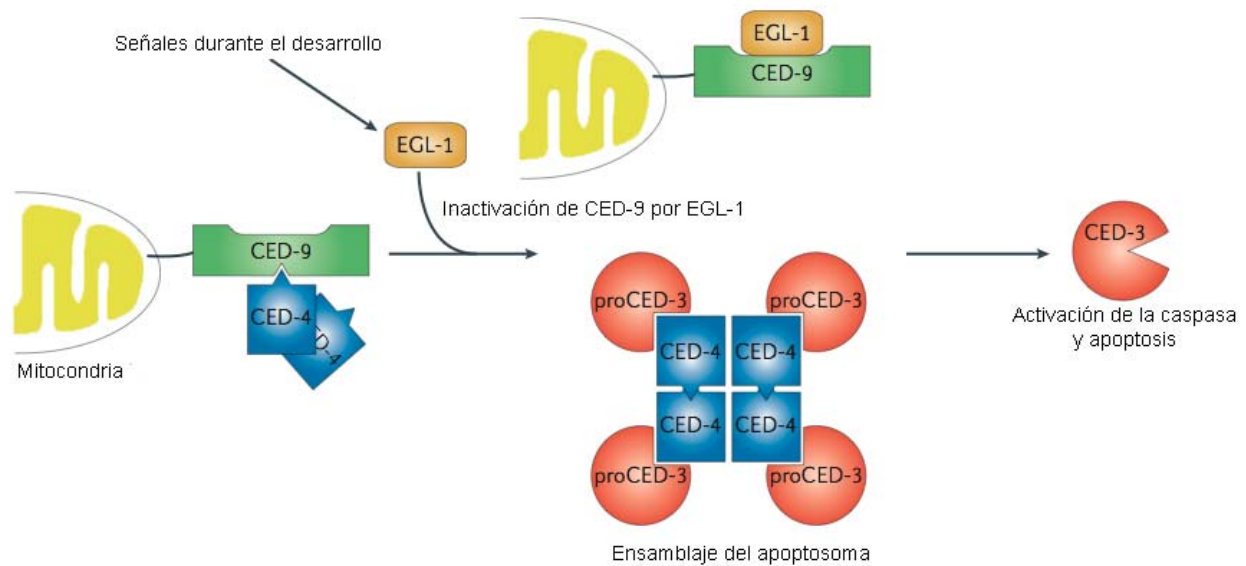


Figura 7: Modelo molecular de la activación de la vía apoptótica en *C. elegans*. La activación de CED-9 por EGL-1 provoca la liberación del dímero CED-4 y la formación del apoptosoma. La unión de CED-3 con CED-4 induce la activación de la caspasa y por tanto la ejecución de la apoptosis (tomada de Lettre y Hengartner, 2006 y modificada).

La causa de la muerte celular es el corte de proCED-3 para formar la caspasa activa CED-3. Previo a su activación, varios proCED-3 se encuentran asociados a un tetrámero de CED-4 y juntos forman el apoptosoma. En ausencia de un estímulo de muerte, CED-4 forma un dímero que se encuentra secuestrado por la proteína CED-9 en la superficie externa de la mitocondria. Este reclutamiento impide que CED-4 se una a CED-3 y la active. Por otro lado, EGL-1 se une a CED-9 a través de su dominio BH3 induciendo un cambio en la conformación que rompe el complejo CED-4:CED-9. Una vez liberado CED-4, éste se traslada de la mitocondria hacia la superficie de la membrana nuclear donde puede activar a CED-3 e iniciar la apoptosis (Figura 7) (Lette y Hengartner, 2006).

Además de los genes ya referidos, existen otros genes implicados en la activación del programa apoptótico durante el desarrollo del nematodo como los genes *dad-1* (*defender against apoptotic death*) e *icd-1* (*inhibitor of cell death*) (Conradt y Xue, 2005). Otros genes involucrados en la muerte apoptótica son aquellos relacionados con la fagocitosis como el gen *ced-1*. También el gen *cps-6* que codifica para una endonucleasa mitocondrial y otros,

como el gen *ced-8* que codifica para un transportador de membrana, están relacionados con la apoptosis (Lette y Hengartner, 2006).

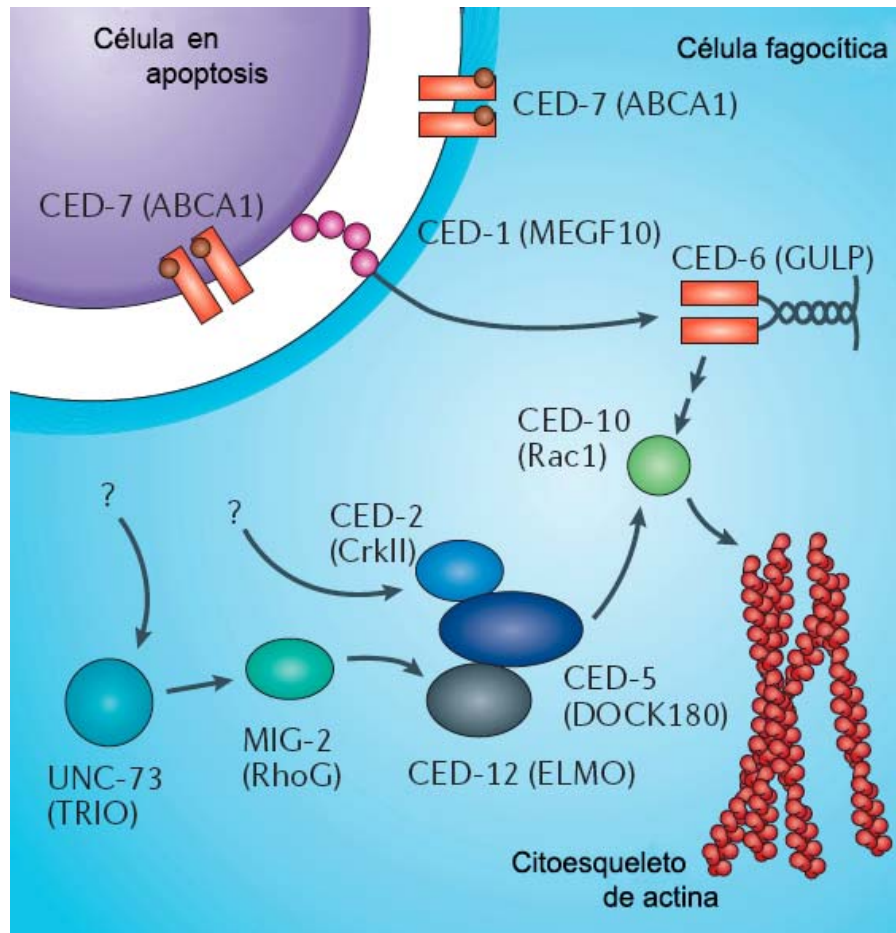


Figura 8: Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos en *C. elegans*. El esquema muestra las dos vías parcialmente redundantes de la fagocitosis: aquella regulada por CED-5, un intercambiador de nucleótidos de guanina, y la vía activada por el receptor transmembranal CED-1. Ambas vías promueven la activación de CED-10 propiciando la reorganización del citoesqueleto (tomada de Lette y Hengartner, 2006 y modificada).

Una vez que se ha activado el programa apoptótico inicia el proceso de fragmentación del DNA, la condensación del citoplasma y la fagocitosis (Conradt y Xue, 2005). La maquinaria necesaria para la fagocitosis está muy conservada evolutivamente. En *C. elegans*, las células que están pasando por un proceso de apoptosis son eliminadas rápidamente por las células vecinas que las fagocitan y las degradan con fagolisosomas. Existen dos vías de transducción paralelas y parcialmente redundantes en las que participan ocho genes diferentes. En primer lugar se encuentra la vía del heterodímero CED-5:CED-12 que es regulado por la proteína adaptadora CED-2, la pequeña GTPasa MIG-2 y el factor intercambiador de nucleótidos de guanina UNC-73. La segunda vía inicia en la superficie celular donde la señal se transmite por

medio de la proteína transmembranal CED-1 y de la proteína adaptadora CED-6 (Lettre y Hengartner, 2006; Reddien y Horvitz, 2004). CED-1 actúa como un receptor de fagocitosis pues reconoce la presencia de fosfatidilserina (PS) en la superficie de las células que están muriendo. Al parecer la proteína transportadora CED-7 es la encargada de promover la exposición de fosfatidilserina para que sean reconocidos por CED-1 (Venegas y Zhou, 2007). Ambas vías confluyen en la activación de CED-10, una GTPasa que promueve la reorganización del citoesqueleto, proceso requerido para fagocitar al cuerpo apoptótico (Figura 8) (Lettre y Hengartner, 2006).

1.6 Apoptosis en la línea germinal

La apoptosis es un proceso muy conservado en los organismos multicelulares, ya que, como se describió anteriormente, se observan características celulares y morfológicas muy similares. La apoptosis en la línea germinal es un mecanismo que se presenta tanto en invertebrados como vertebrados y es fundamental para la formación y el desarrollo adecuado de los ovocitos y de los espermatozoides.

Durante la ovogénesis de invertebrados, la apoptosis se requiere para eliminar células que ya no se necesitan, células anormales o dañadas. Muchos dípteros, como *Drosophila melanogaster*, tienen mecanismos conservados de apoptosis en la línea germinal (Baum et al., 2005). Durante el desarrollo de la línea germinal en *Drosophila* se forman grupos de 16 células germinales conformados por 15 células nodrizas y un ovocito. Dichas células se encuentran interconectadas por canales intercelulares debidos a una citocinesis incompleta y se hallan rodeadas por células somáticas foliculares. Para producir un ovocito maduro las células nodrizas llevan a cabo una transcripción masiva de proteínas y RNA mensajeros y depositan en el ovocito la gran mayoría de los productos maternos (Baum et al., 2005; Semotok y Lipshitz, 2007). Una vez donado todo su citoplasma a la célula germinal en crecimiento, las células nodrizas mueren por apoptosis (Baum et al., 2005; Buszczak y Cooley, 2000). Los cuerpos apoptóticos remanentes son fagocitados y degradados por las células foliculares. En otros organismos, como las abejas y las hormigas, se sabe poco acerca de la muerte celular programada en la línea germinal, pero al parecer también hay una donación de

citoplasma por parte de las células nodrizas, las cuales mueren por apoptosis (Baum et al., 2005).

Por otro lado, en *Hydra*, uno de los organismos más sencillos que presentan componentes de la maquinaria apoptótica, también tiene células nodrizas las cuales donan su citoplasma y son eliminadas por apoptosis (Baum et al., 2005). Este organismo se reproduce normalmente de manera asexual, pero cuando se vuelve sexualmente activo rápidamente se diferencian células germinales a partir de células intestinales. Para la ovogénesis se producen alrededor de 500 células germinales primordiales de las cuales sólo una se convierte en un ovocito. Las células donan su citoplasma al ovocito en crecimiento y luego son fagocitadas por el propio ovocito y mantenidas en vacuolas hasta que son degradadas una vez que el embrión eclosiona. En *Hydra* se puede observar por lo tanto una forma especial de apoptosis puesto que los cuerpos apoptóticos se mantienen en vacuolas durante un tiempo muy prolongado (Böttger y Alexandrova, 2007).

En los vertebrados, el desarrollo de los ovocitos ocurre desde la embriogénesis y durante toda la vida reproductiva del organismo. Se ha estimado que más de dos tercios de las células germinales iniciales se mueren cuando llega el momento de nacer, tanto en ratas como en humanos (Morita y Tilly, 1999). Se pueden distinguir dos fases de muerte de las células germinales, en los humanos la primera fase empieza a los seis meses después de la fertilización y se prolonga hasta la pubertad. La segunda fase ocurre entre la pubertad y la menopausia. En las mujeres, a los cinco meses de gestación hay aproximadamente siete millones de células germinales en el ovario y de las cuales sobreviven unos dos millones al momento de nacer. Como a los siete años de edad hay todavía unas 300 000 y previo al inicio de la senescencia del ovario, alrededor de los 50 años de edad, quedan menos de 1000 ovocitos (Baum et al., 2005; Morita y Tilly, 1999). Si se toma en cuenta que una mujer ovula un ovocito en cada ciclo mensual, únicamente logran sobrevivir y madurar aproximadamente 400 ovocitos durante su vida adulta (Morita y Tilly, 1999).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la muerte de las células germinales. Una de ellas plantea que la muerte se debe a la falta de factores de crecimiento esenciales requeridos para la supervivencia. Otra hipótesis

propone que se debe a defectos celulares como las anomalías meióticas. Por último, la tercera hipótesis dice que las células mueren por suicidio donando su contenido citoplásmico como organelos y proteínas. De esta última hipótesis no se tiene evidencia directa en los vertebrados, pero se han observado mitocondrias en los puentes intercelulares que conectan a las células germinales durante el desarrollo embrionario (Baum et al., 2005).

Al igual que en la ovogénesis, en algunas especies la apoptosis es necesaria para el desarrollo de los espermatozoides. Sin embargo, esta muerte no ocurre durante la producción de espermatozoides en *C. elegans* ni se observa en la gónada de los animales machos. En cambio, en *Drosophila* y en las ratas la apoptosis sirve para eliminar el exceso de material citoplásmico. En los mamíferos se sabe que la muerte celular es necesaria para mantener un balance entre el número de células de Sertoli y de células germinales, además de que se observan altos niveles de apoptosis al nacer y en el adulto (Baum et al., 2005).

1.7 Apoptosis en la línea germinal de *C. elegans*

La apoptosis en la línea germinal del hermafrodita adulto se presenta en la región del asa y ocurre después de la fase de paquíteno de la profase I (Gumienny et al., 1999; Hubbard y Greenstein, 2000). Los núcleos de las células que se están muriendo se celularizan y posteriormente son fagocitadas, lo cual permite la separación del resto del sincicio de manera que los factores apoptóticos no actúen sobre otros núcleos (Greenwood y Gautier, 2005). Cuando inicia la ovogénesis la muerte por apoptosis, conocida como apoptosis fisiológica, ocurre continuamente durante el tiempo que dura este proceso (Riddle et al., 1997). Se ha estimado que cerca de un 50% de las células se mueren por la vía de la muerte fisiológica (Gumienny et al., 1999; Lettre y Hengartner, 2006).

Todavía hoy en día se conoce poco la razón por la cual mueren por apoptosis tantas células en la gónada del animal adulto, pero al parecer ocurre para mantener la homeostasis o para eliminar células que sirvieron como células nodrizas tal como se ha observado en *Drosophila* y en *Hydra* (Baum et al., 2005).

La apoptosis fisiológica está regulada por una vía genética distinta a la vía molecular de muerte que se conoce en *C. elegans*, ya que se sabe que es una vía independiente de la proteína EGL-1. En ausencia de EGL-1 no existe apoptosis somática, pero la apoptosis en la gónada sigue ocurriendo (Baum et al., 2005; Gumienny et al., 1999; Hubbard y Greenstein, 2000; Lettre y Hengartner, 2006). La apoptosis fisiológica también ocurre de manera independiente del factor de transcripción p53, conocido en *C. elegans* como CEP-1, el cual se activa ante un daño al DNA (Figura 6) (Maldonado y Navarro, 2007). Por otro lado, se sabe que se requiere de la activación de la vía Ras/MAPK, vía necesaria para la salida de las células de la fase de paquíteno, para que ocurra la apoptosis en la línea germinal (Baum et al., 2005; Hubbard y Greenstein, 2000). La muerte de las células germinales ocurre únicamente durante la ovogénesis, por lo que las células que se encuentran proliferando en la región mitótica no son eliminadas por esta vía (Gumienny et al., 1999). No obstante, la muerte por apoptosis en la línea germinal también se puede inducir de manera ectópica por medio de agentes que dañen el DNA o por infecciones patógenas (Lettre y Hengartner, 2006)

Hasta ahora se han identificado algunos genes que mutados provocan cambios en la apoptosis fisiológica. Entre ellos se encuentra CGH-1, una helicasa de RNA asociada a los gránulos P muy similar al factor de inicio de la traducción, eIF4A. Esta proteína es necesaria para prevenir la muerte fisiológica (Maldonado y Navarro, 2007; Navarro et al., 2001) y una mutante en este gen produce un fenotipo estéril (Navarro et al., 2001).

A través de experimentos de RNA de interferencia (RNAi) realizados en un 86% de todos los genes conocidos en *C. elegans*, se encontraron genes cuya ausencia incrementa la apoptosis en la línea germinal de manera independiente a p53 (*ced-9*, *gla-3*, *cpb-3*, *rpf-1* y *pmk-3*). El gen *ced-9*, como se ha descrito anteriormente, forma parte de la vía central de la muerte celular. PMK-3 es una de las tres isoformas de las MAP cinasas de la vía de p38 que al parecer protege a las células germinales de la apoptosis (Lettre et al., 2004).

El gen *gla-3* es importante para la progresión de la meiosis y para la supervivencia de las células germinales. Una mutación en *gla-3* provoca un incremento en la apoptosis de la línea germinal y una progenie reducida. GLA-3 es una proteína que tiene un dedo de zinc y se expresa en la línea germinal

durante el paso del estado larvario L4 al adulto. La proteína participa en la cascada de señalización de las MAP cinasas e interactúa directamente con la cinasa MPK-1, un regulador meiótico. Es una proteína que controla la progresión meiótica y la apoptosis de la línea germinal además de que es un regulador negativo de la vía de las MAP cinasas durante el desarrollo de la vulva (Kritikou et al., 2006).

Por otro lado, el gen *rfp-1* codifica para una ligasa de ubiquitina que inhibe la apoptosis fisiológica de las células germinales, participa en el desarrollo de la vulva y en la expulsión de embriones. Es una proteína que se expresa en el intestino, en neuronas, en ovocitos y en la gónada de larvas y adultos (<http://www.wormbase.org/>, liberado en diciembre 2008, WS197).

Asimismo se ha detectado a CAR-1, una proteína que participa en el metabolismo de RNA y que interactúa con CGH-1 y con otras proteínas que tienen motivos con cajas tipo Y formando complejos ribonucleoprotéicos. La interacción de CGH-1/CAR-1 se encuentra conservada en los ovocitos de *Drosophila*. En ausencia de *car-1*, la apoptosis fisiológica aumenta, se reduce la progenie y la citocinesis embrionaria ocurre de manera anormal. El aumento en la apoptosis de las células germinales es parecida a la que ocurre en ausencia del regulador traduccional CPB-3, el cual también funciona junto con CGH-1 (Boag et al., 2005). CPB-3 es uno de los cuatro homólogos que existen en *C. elegans* de la proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplásmica (CPEB). Las proteínas de la familia CPEB son proteínas conservadas que se unen a los RNA mensajeros regulando su traducción (Luitjens et al., 2000). CPB-3 es una proteína que regula diferentes aspectos de la ovogénesis, pues se expresa en las regiones meióticas tempranas de la gónada del hermafrodita y su ausencia genera defectos en la proliferación y diferenciación de los ovocitos. Es un gen que juega un papel esencial en la meiosis y en el cambio de la producción de espermatozoides a ovocitos (Hasegawa et al., 2006).

Se ha encontrado también que la proteína DAZ-1, una proteína que une RNA, participa en la progresión de la meiosis durante la ovogénesis. El gen *daz-1* es un miembro de la familia DAZ (*Deleted in azoospermia*) y los mutantes en este gen presentan irregularidades en los ovocitos durante la meiosis temprana y eventualmente se detienen en el estado de paquíteno

(Maruyama et al., 2005). Al parecer la proteína DAZ-1 interactúa parcialmente con CPB-3 (Hasegawa et al., 2006) y también es requerida para el cambio de espermatogénesis a ovogénesis, paso fundamental para la producción de ovocitos (Otori et al., 2006).

Por otro lado, las proteínas Pax son factores de transcripción que tienen dominios de unión a DNA y están muy conservados tanto en vertebrados como en invertebrados (Chi y Epstein, 2002). Estas proteínas pueden promover la proliferación y supervivencia de las células e influyen en la diferenciación celular. La expresión de los genes Pax protege a las células de la muerte por apoptosis. Los genes de la familia PAX2/5/8, conocidos en *C. elegans* como *pax-2* y *egl-38*, participan en la apoptosis somática y germinal. Los animales mutantes para cualquiera de los dos genes muestran un aumento en la apoptosis de la línea germinal. La sobreexpresión de estos genes protege a las células que normalmente van a morir, mientras que la reducción de su actividad aumenta la apoptosis de la línea germinal. En los mutantes de los genes Pax la apoptosis está mediada por la vía de las caspasas y dado que la protección contra la muerte requiere de la expresión de *ced-9*, estos genes promueven la supervivencia celular regulando la transcripción de este gen (Park et al., 2006).

Asimismo, se ha encontrado que los genes *mcd-1* y *dpl-1* regulan transcripcionalmente la muerte apoptótica. Ambos genes actúan por debajo de *ced-9* en la cascada génica. *dpl-1* es homólogo del gen DP que forma parte del heterodímero E2F/DP en humanos y el gen *mcd-1* codifica para una proteína que tiene un dedo de zinc (Reddien et al., 2007). *dpl-1* y *efl-1*, éste último miembro de la familia E2F, interactúan directamente formando un complejo que funciona como un activador transcripcional que promueve la expresión de genes de manera específica según el tejido. En la línea germinal, este complejo activa genes fundamentales para la diferenciación de los ovocitos y la embriogénesis (Chi y Reinke, 2006). Estos genes junto con *efl-2* promueven la apoptosis en la línea germinal al inducir la expresión de *ced-4* y *ced-3*. Otro gen fundamental es *lin-35*, homólogo del gen de retinoblastoma (RB) en humanos, el cual promueve la muerte por apoptosis al reprimir la expresión de *ced-9* y actúa de manera independiente a los genes *dpl-1*, *efl-1* y *efl-2*. Al parecer *lin-35* también interactúa con las proteínas Pax, EGL-38 y PAX-2,

antagonizando la promoción de la transcripción de *ced-9*. Todos los genes mencionados, a excepción de *efl-1*, participan ya sea por debajo o en paralelo a *cep-1*(p53) y a *egl-1*(BH3) por lo que también promueven la muerte celular por daño al DNA a través de la inducción de otros factores (Schertel y Conradt, 2007).

En el *C. elegans* existen dos isoformas del factor de iniciación de la traducción 4G, el eIF4GI y el eIF4GII, los cuales están codificados por el gen *ifg-1*. La pérdida de ambas isoformas reprime la proliferación de las células germinales y se produce un arresto larvario. La ausencia de una de las isoformas, *ifg-1* (p170), causa un aumento en la apoptosis de la línea germinal y los ovocitos inmaduros no pueden pasar la fase de diacinesis. Al parecer este gen es necesario para que los ovocitos terminen de crecer y se diferencien. La ausencia de dichos factores induce la expresión de la proteína CED-4 y ambas isoformas juegan un papel para mantener la homeostasis durante la ovogénesis (Contreras et al., 2008).

Por otro lado, en *C. elegans* las infecciones con patógenos como *Salmonella typhimurium* provocan muerte por apoptosis en la gónada de manera dependiente de la proteína EGL-1, pero no se sabe si también depende de p53. Los factores virales producidos por el patógeno desatan señales somáticas que inducen la muerte de las células germinales y la activación de la cascada apoptótica protege a los animales de futuras infecciones bacterianas. Los mutantes en genes de la cascada apoptótica (*ced-3* y *ced-4*) no muestran muerte apoptótica en la línea germinal debida a la infección por el patógeno, pero son más susceptibles a la muerte inducida por *Salmonella typhimurium* (Aballay y Ausubel, 2001). La vía de las MAP cinasas (MAPK) está involucrada en la defensa contra patógenos puesto que se sabe que la cinasa PMK-1, la cual participa en la vía de p38, previene la apoptosis (Aballay et al., 2003). Asimismo, se ha encontrado que las cinasas cinasas MEK-1 y SEK-1 también tienen un efecto protector contra infecciones patógenas (Aballay et al., 2003; Kim et al., 2004).

Igualmente se sabe que diferentes tipos de estrés ambiental inducen apoptosis en la línea germinal. Animales sometidos a choque de calor, estrés osmótico, oxidativo y ayuno presentan un aumento en la apoptosis de las células germinales de forma independiente a p53 y EGL-1. El estrés osmótico,

oxidativo y el choque de calor inducen la apoptosis por medio de las MAPKK MEK-1 y SEK-1, las cuales pertenecen a la vía de transducción de JNK y p38 respectivamente. Las cinasas MEK-1 y SEK-1 y la proteína antagonista de p53, ABL-1, son esenciales para inducir apoptosis por estrés. A pesar de que la apoptosis inducida por distintos tipos de estrés es independiente de la proteína EGL-1, ante condiciones de ayuno la apoptosis no requiere de las cinasas MEK-1 y SEK-1. Por lo tanto, en ausencia de dichas cinasas, la apoptosis en la línea germinal inducida por ayuno sigue ocurriendo (Salinas et al., 2006).

Un análisis de microarreglos para ver los cambios en el patrón de expresión de genes específicos de la línea germinal en condiciones de ayuno arrojó que 264 genes cambian su patrón de expresión, de ellos 122 la aumentan y 142 la disminuyen. Se hicieron experimentos de RNA de interferencia en 64 genes de los cuales, para la apoptosis fisiológica, 27 aumentan el número de cuerpos apoptóticos en la gónada y sólo un gen los disminuye. En cuanto a la apoptosis inducida por ayuno el RNAi para 21 genes no afectan la apoptosis ocasionada por este tipo de estrés (Silva y Navarro, datos sin publicar).

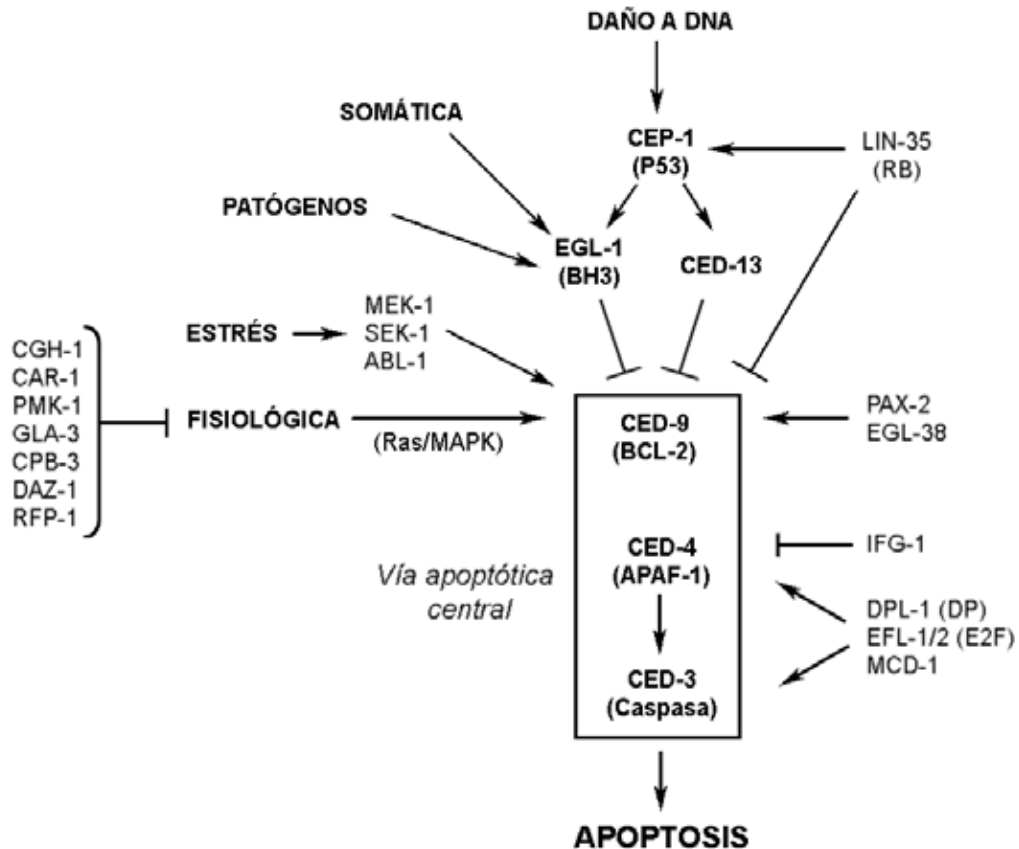


Figura 9: Diferentes vías que inducen la apoptosis en *C. elegans*. En la figura se muestra enmarcada la vía central de la apoptosis la cual comprende las proteínas CED-9, CED-4 y CED-3. Del lado izquierdo están los distintos tipos de vías que inducen la apoptosis. Por un lado la ocasionada por un daño al DNA la cual requiere de la participación de CEP-1. La apoptosis somática y la ocasionada por patógenos requieren de la activación de EGL-1. Por otro lado, la apoptosis inducida por estrés requiere de las cinasas MEK-1 y SEK-1, las cuales actúan de manera independiente a EGL-1. La apoptosis fisiológica ocurre en la línea germinal y requiere de la vía de Ras/MAPK. Este tipo de apoptosis se induce a nivel de CED-9 y es independiente de EGL-1 y CEP-1. Asimismo, del lado izquierdo se encuentran representados varios genes que previenen la apoptosis fisiológica. Por último, del lado derecho se muestran otros genes que inducen la apoptosis a distintos niveles de la cascada apoptótica. La activación de las proteínas está indicada por una flecha (→) y la inhibición por las barras (⊥). Los nombres en paréntesis representan la proteína homóloga en mamíferos (tomada de Gartner et al., 2008 y modificada).

En resumen, la apoptosis puede ser inducida por muchas vías que finalmente llevan a la activación de la caspasa CED-3. En general se puede identificar la apoptosis durante el desarrollo que es dependiente de EGL-1 (Lette y Hengartner, 2006) y la apoptosis fisiológica, la cual elimina el exceso de células germinales durante la ovogénesis con el fin de mantener la homeostasis de la gónada (Gumienny et al., 1999). Además existe la apoptosis ocasionada por un daño al DNA que ocurre en respuesta a un agente xenotóxico y se lleva a cabo mediante las proteínas EGL-1, CED-13 y CEP-1

(Schumacher et al., 2001). La apoptosis también se puede inducir como respuesta a una infección por patógenos y ocurre de manera dependiente de la proteína EGL-1 (Aballay y Ausubel, 2001) y por último se encuentra la apoptosis inducida por estrés la cual actúa a nivel de CED-9 y requiere de la participación de las cinasas MEK-1 y SEK-1 (Salinas et al., 2006) (Figura 9).

2. OBJETIVOS

- Estudiar si la apoptosis de las células germinales se ve afectada en condiciones normales de crecimiento y/o de ayuno realizando RNAi en genes que se expresan diferencialmente en ausencia de comida.
- Seleccionar genes que participan en la apoptosis fisiológica y/o en la inducida por ayuno para estudiar el fenotipo que provoca su silenciamiento en la línea germinal de *C. elegans*.

3. HIPÓTESIS

En la naturaleza, frecuentemente se presentan condiciones de estrés para las cuales los organismos deben tener mecanismos de resistencia que aseguren su supervivencia y la de sus descendientes. Uno de estos mecanismos es la apoptosis de las células germinales, la cual puede ocurrir de manera natural o debido a condiciones de estrés como el ayuno. En las células germinales de *C. elegans*, la regulación de la apoptosis fisiológica y la inducida por ayuno es independiente de los genes *egl-1*, *cep-1*, *mek-1* y *sek-1* (Gartner et al., 2008; Salinas et al., 2006), lo cual nos sugiere que estos dos tipos de apoptosis podrían estar relacionadas. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo que induce la apoptosis de las células germinales en cualquiera de las dos condiciones. Si el silenciamiento de genes que se expresan diferencialmente en condiciones de ayuno provoca variaciones en los niveles de apoptosis fisiológica, esto sugeriría que hay una relación entre ambas formas de apoptosis. El estudio de estos genes nos podría llevar a entender cuál es esta relación y a su vez encontrar algunos que participen en la apoptosis de la línea germinal.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Medios para el crecimiento de los animales

El nematodo *C. elegans* se dejó crecer en cajas petri de 55 mm con medio NGM y fue alimentado con la cepa OP50-1 de *Escherichia coli*. Los animales se mantuvieron a 20°C cuando se trataba de la cepa silvestre N2 y a 24°C si se trataba de la cepa (MD701) $P_{\text{lim-7}}\text{ced-1}::\text{gfp}$. Para mantener las cepas se seleccionaban de 3 a 4 individuos L4 y se colocaban en una nueva caja con alimento cada 3 a 4 días.

Para preparar las cajas con medio NGM se mezclaron los reactivos y se disolvieron en agua desionizada y purificada por medio del sistema Milli-Q (Millipore, USA). La mezcla se aforó a un litro, se le agregó el agar y se esterilizó por autoclave durante 20 minutos a 120°C y a 15 libras de presión. Una vez esterilizado el medio se dejó enfriar hasta que el matraz se pudiera manipular y se vació en cajas petri. De acuerdo con el tamaño de la caja se vertieron aproximadamente las siguientes cantidades:

- Caja grande (90mm diámetro): 15-20 ml o hasta cubrir la mitad del volumen
- Caja mediana (55mm diámetro): 9 ml
- Caja chica (40mm diámetro): 4 ml

Para elaborar el medio para inducir el RNA de doble cadena (RNA_{dc}) se agregaron 30 g de agar. Después de esterilizar el medio y que la temperatura bajara hasta ser tolerable para poder tocar el recipiente con las manos (aprox. 50°C) se añadió ampicilina a una concentración de 50 µg/ml y tetraciclina a 12.5 µg/ml. Asimismo se agregó IPTG, un inductor de la transcripción bacteriana, a una concentración de 1 mM. Una vez enfriadas y solidificadas las cajas se guardaron a 4°C.

Mezcla para preparar un litro del medio NGM:

- Cloruro de Sodio (NaCl) 2 g
- Bactotripton
- Fosfato de potasio monobásico 3 g
- Fosfato de potasio dibásico 0.5 g
- Colesterol 0.008 g

- Agar 20 g

4.2 Crecimiento de bacterias

Para hacer crecer bacterias se empleó el medio LB. Si se requiere usar medio líquido se omite el agar, pero en ambos casos se debe esterilizar por autoclave al igual que el medio NGM. Una vez que la temperatura haya bajado se le agregan diferentes concentraciones de antibióticos dependiendo del tipo de cepa de bacterias que se quiera hacer crecer. Para dejar crecer bacterias de la cepa OP50-1, utilizadas para alimentar a los animales, se añadió estreptomina a una concentración final de 50 µg/ml. En el caso de las bacterias empleadas para realizar la inducción del RNA de doble cadena se agregó ampicilina a 50 µg/ml y tetraciclina a 12.5 µg/ml.

Cuando se empleó medio LB líquido adicionado con antibióticos, se inoculó con la bacteria deseada y se dejó crecer en agitación a 37°C durante una noche. En caso de utilizar medios sólidos, las bacterias se estriaron en la caja con un palillo o con un asa de cultivo.

Para hacer las cajas con bacterias para la inducción de RNAdc se colocaron unas gotas del cultivo sobre las cajas de medio NGM previamente hechas y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante toda la noche. La cantidad de cultivo que se añade a las cajas es proporcional al tamaño de las mismas. A las cajas chicas se les añadieron aproximadamente 250 µl y a las cajas medianas unos 600 µl. En caso de las cajas medianas se centrifugaron 700 µl de cultivo a 8200 rpm durante un minuto y se resuspendió la pastilla en 100 µl.

Para hacer un litro de medio LB se requiere lo siguiente:

- Bactotriptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 5 g
- Agar 15 g

4.3 RNA de interferencia

El RNA de interferencia (RNAi) es una técnica basada en la inhibición del transcrito de un gen o en la activación de mecanismos que provoquen el silenciamiento de genes. Este fenómeno se ha observado en protozoarios, en invertebrados como *C. elegans* y *D. melanogaster* y en vertebrados (Agrawal et al., 2003; Timmons, 2007).

La técnica del RNA de interferencia es por tanto una forma de silenciar genes a través del RNA de doble cadena (RNAdc) (Grishok, 2005). La molécula efectora son los pequeños RNA de interferencia o siRNA, moléculas de doble cadena de unos 22 pares de bases. Los siRNA son el producto de la ruptura del RNAdc por la proteína Dicer, una endonucleasa específica de RNAdc que se encuentra en todos los organismos eucariontes (Timmons, 2007). Las proteínas de la familia Dicer tienen varios motivos como el de unión al RNA de doble cadena, el dominio de ribonucleasa III y un dominio de helicasa. Dicer procesa los precursores de los RNAdc en pequeños RNA de doble cadena (Agrawal et al., 2003). El producto se separa en una cadena sencilla de RNA y junto con RISC (*RNAi-induced silencing complex*), un complejo multiprotéico, actúa para reconocer el RNA mensajero homólogo y por tanto dar la señal de su degradación (Timmons, 2007). En resumen, los siRNA guían la degradación de los RNA mensajeros al unirse a ellos de forma complementaria.

El RNAi puede inducir el silenciamiento tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. En *C. elegans* existen varias vías por las cuales se induce este mecanismo y además tiene la ventaja de que ocurre de manera sistémica y puede ser heredable. Los primeros experimentos que se llevaron a cabo fueron por medio de la inyección del RNAi, siendo la inyección en el intestino la más efectiva y a partir de la cual los RNA de doble cadena se distribuyen por todo el cuerpo del organismo incluyendo la gónada (Grishok, 2005). También se puede hacer RNAi mediante la ingesta de bacterias que carguen RNA de doble cadena (RNAdc) y su posterior absorción en el intestino confiere un efecto específico de interferencia sobre el organismo (Timmons y Fire, 1998).

Para producir el RNA de doble cadena, el gen de interés se inserta en el plásmido pPD129.36. Este plásmido está diseñado para que haya una

transcripción bidireccional gracias a los dos promotores T7 que flanquean al gen de estudio y a la RNA polimerasa del bacteriófago T7 que realiza la transcripción del RNAdc (Fire et al., 1998). Los plásmidos se encuentran en la cepa de *E. coli*, HT115(DE3), la cual es resistente a la tetraciclina y carece de la RNAasa III específica para degradar los RNAdc. Las bacterias se dejan crecer en un medio LB con ampicilina, tetraciclina e IPTG para inducir la transcripción y formación del RNA de doble cadena (Timmons, 2007). El IPTG o Isopropinol β -D-1-tiogalactopiranosido es un compuesto similar a la lactosa y es un inductor de la actividad de la beta-galactosidasa, pues se une e inhibe el represor del operón *lac*. En este caso, el IPTG es capaz de inhibir al represor de los promotores T7 de manera que la RNA polimerasa pueda transcribir el gen de interés (Alexander et al., 1992; Kercher et al., 1997).

El laboratorio cuenta con una biblioteca para hacer RNA de interferencia que abarca cerca del 61% de los transcritos predichos para el genoma de *C. elegans*. Cada uno de ellos se encuentra clonado en el vector pPD129.36. Para realizar el RNA de interferencia o RNAi se tomó el gen de interés de la biblioteca y se estrió en cajas de medio LB con antibióticos y se dejó crecer en la incubadora a 37°C durante una noche.

Para llevar a cabo la inducción de genes en medio sólido se siguió el protocolo utilizado por Fraser et al. (2000). Previo a la inducción se puso un cultivo de medio LB líquido con ampicilina (50 μ g/ml) y tetraciclina (12.5 μ g/ml) y se inoculó con las bacterias que portan el gen de interés. El cultivo se dejó incubar durante toda la noche a 37°C en agitación constante.

Para la inducción del RNAdc se utilizaron cajas con medio NGM que contiene IPTG y antibióticos. La cantidad de cultivo empleada, como fue descrito anteriormente, depende del tamaño de la caja. Es importante que no se agregue demasiado cultivo en las cajas con el fin de que la inducción del RNAdc se pueda llevar a cabo de manera eficiente y homogénea. Las cajas, dos medianas y una chica, se incubaron a temperatura ambiente por 18 horas, tiempo suficiente para que se efectúe la inducción. Una vez transcurrido ese tiempo se colocaron como generación parental (P) a 5 animales hermafroditas en estado L4 por cada caja mediana y se dejaron crecer por 3 días a 24°C hasta obtener la primera generación filial (F1). A continuación se tomaron entre

80 y 100 gusanos L4 de la F1 y se dejaron crecer por 24 horas hasta que fueran adultos de un día o adultos jóvenes.

Para hacer el control se siguen los mismos pasos haciendo un cultivo del vector PD129.36 que carece de un inserto del gen y al que de ahora en adelante se le denominará plásmido vacío o PV.

4.4 Ayuno como condición de estrés y apoptosis fisiológica

Con el fin de aislar genes reguladores de la apoptosis inducida por ayuno se realizaron experimentos de microarreglos para ver el efecto del ayuno en la expresión de genes de la línea germinal (Silva y Navarro, datos sin publicar). A partir de los genes obtenidos, ya fuera que hubieran aumentado o disminuido su expresión más de 1.5 veces, se realizaron experimentos de RNAi para identificar genes que tuvieran un efecto sobre la apoptosis. Para ello se hizo una inducción de RNA de doble cadena para el gen de interés y para el plásmido vacío. De los animales adultos jóvenes obtenidos de la generación F1 se tomaron aproximadamente la mitad y fueron sometidos a ayuno, para lo cual se colocaron en cajas chicas de medio NGM sin bacterias. Los animales se dejaron a 24°C durante 6 horas pues de acuerdo a Salinas et al. (2006) es el tiempo adecuado para inducir apoptosis en las células germinales sin que se dañe la gónada. Para el control se dejaron los animales en las placas NGM que tienen comida y se incubaron a la misma temperatura y tiempo. Después de cada tratamiento los animales se observaron al microscopio con el fin de hacer un conteo de cuerpos apoptóticos.

Para estudiar la apoptosis fisiológica se emplearon los animales que permanecieron con comida y se realizó un conteo de cuerpos apoptóticos tanto para el gen de interés como para el plásmido vacío.

4.5 Determinación de la apoptosis

Para determinar la apoptosis se cuenta con la cepa de *C. elegans* (MD701) $P_{lim-7}ced-1::gfp$, la cual tiene fusionado entre el gen de *ced-1* al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). CED-1 es un receptor transmembranal que se encuentra en la superficie de las células que fagocitan a las células en apoptosis y que sirve para reconocer los cuerpos apoptóticos. La fusión CED-1::GFP no afecta la función de dicha proteína y nos permite la

identificación de los cuerpos apoptóticos cuando son fagocitados (Zhou et al., 2001) dado que se observa la fluorescencia en el contorno de la célula en apoptosis. Los animales *ced-1::gfp* se dejaron crecer a 24°C, ya que éstas condiciones favorecen la expresión de la proteína GFP en la gónada. Al hacer RNAi en la cepa *ced-1::gfp* para el gen *ced-3*, el cual codifica para la única caspasa que tiene el *C. elegans*, ya no se observan cuerpos apoptóticos ni en condiciones de ayuno ni en condiciones normales de comida, lo cual asegura que es una muerte por apoptosis (Salinas et al., 2006).

Los animales se montaron en portaobjetos que tienen una capa de agarosa al 2%, la cual sirve como soporte para los animales. Un vez colocados los animales se inmovilizaron con 15 µl de azida de sodio (NaN₃) a 40 mM preparada en medio M9. Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se observó al microscopio utilizando luz ultravioleta para detectar la fluorescencia de la GFP. Generalmente se observa sólo un brazo de la gónada de los animales, en el cual se lleva a cabo el conteo de cuerpos apoptóticos dado que generalmente el otro brazo queda cubierto por el intestino.

Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara digital AxioCam de la marca Zeiss. Las fotos fueron posteriormente procesadas en Adobe Photoshop CS2, versión 9.0.2.

4.6 Selección y secuenciación de genes

De los genes estudiados fueron seleccionados aquellos que tuvieron cambios en la apoptosis fisiológica y en la apoptosis inducida por ayuno. Se realizó una extracción de plásmido a partir de 25 ml de cultivo de la bacteria que porta el plásmido de interés utilizando el protocolo del estuche de extracción de plásmidos (QIAGEN, USA). Los plásmidos se mandaron secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para su verificación. La secuencia fue sometida a un análisis de BLAST (http://www.wormbase.org/db/searches/blast_blat) para identificar a la proteína.

4.7 Estudios de fertilidad

Los estudios de fertilidad fueron realizados con el propósito de relacionar la apoptosis de las células germinales con el número de hijos y ver si el aumento de la apoptosis tiene un efecto negativo sobre la progenie. Para hacer el

conteo de la descendencia se utilizaron las cepas N2 y *rrf-1(ok589)* y los animales se dejaron crecer a 24°C con el fin de mantener las condiciones empleadas en los experimentos de RNAi. La cepa *rrf-1(ok589)* se utilizó para estudiar uno de los cuatro genes seleccionados, puesto que ésta cepa es sensible al RNA de interferencia únicamente en la gónada. Dicha cepa se emplea generalmente cuando se presentan defectos somáticos que no permiten estudiar los daños ocasionados en la gónada. El gen *rrf-1* codifica para una RNA polimerasa dirigida por RNA (RdRP), la cual es necesaria para llevar a cabo RNAi en el soma, pero no en la línea germinal (Sijen et al., 2001).

Para llevar a cabo los experimentos se hizo una inducción de RNA de doble cadena en cada uno de los genes seleccionados. Se colocaron cinco animales L4 que se dejaron crecer a 24°C durante 3 días y se prepararon cajas chicas con medio NGM e IPTG. La inducción de RNAdc se llevó a cabo tanto para el gen como para el plásmido vacío.

Una vez que se tuvo la generación F1 se colocó un nematodo L4 por cada caja chica, completando un total de 15 cajas para el gen y la misma cantidad para el control. Los animales se dejaron crecer por 24 horas a 24°C para luego moverlos a 15 cajas nuevas. Los animales se volvieron a incubar por un día a la misma temperatura guardando las cajas del primer día. Al tercer día se tomaron las cajas del día uno y se contaron los embriones muertos, es decir, los embriones que no eclosionaron después de 24-48 horas. La embriogénesis dura 14 horas en animales mantenidos a 20°C (Riddle et al., 1997), por lo que al cabo de 24 horas los embriones se consideran muertos. Las larvas y los embriones muertos se contaron de manera sucesiva hasta que los animales dejaron de tener descendencia.

4.8 Tinción con DAPI e inmunotinción para la histona H3 fosforilada

Para realizar la tinción de los animales se emplearon portaobjetos cubiertos con 30 µl de poli-L-lisina, la cual se extendió sobre toda la superficie y se dejó secar en una parrilla caliente durante 20 minutos.

Por otro lado, en un cubreobjetos se colocaron 30 µl de medio M9 y se pusieron alrededor de 30 animales adultos. Para realizar la disección se

añadieron entre 1 y 5 μl de tetramisol para anestesiar a los animales que fueron disecados haciendo un corte a nivel de la cabeza utilizando dos jeringas de Gauge 25. Una vez disecados se colocó el cubreobjetos sobre el portaobjetos con poli-L-lisina dejando las esquinas sobresalientes para que después pudiera ser retirado fácilmente. A continuación se eliminó el exceso de líquido de las orillas del cubreobjetos y la muestra se introdujo lentamente en el nitrógeno líquido. Posteriormente la muestra se sacó y se removió el cubreobjetos. Después se colocó en la solución fijadora durante 10 minutos a -20°C . Transcurrido este tiempo la muestra se lavó en PBT (1x) durante 10 minutos y después se incubó por 5 minutos en 30 μl de PBT con suero de cabra (PBT/NGS) y DAPI a temperatura ambiente. El DAPI es una molécula fluorescente que se une al DNA tiñéndolo de color azul al observa la muestra bajo luz UV. El colorante se empleó a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Por último la muestra se lavó en PBT durante 10 minutos y se le agregaron 10 μl de vectashield (Vector Lab, USA), un conservador que resalta la fluorescencia. Se le colocó un cubreobjetos, se selló la muestra con barniz y se observó al microscopio.

Para hacer un litro de medio M9 1x se requiere:

- Na_2HPO_4 6 g
- KH_2PO_4 3 g
- NaCl 5 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g

La solución fijadora se debe hacer antes de la disección y mantenerse a -20°C de manera que se encuentre a dicha temperatura a la hora de incubar las muestras. Para la solución fijadora se utilizó:

- 5 ml Formol al 37%
- 300 μl H_2HPO_4 1M (esterilizar por autoclave)
- 40 ml Metanol

Un litro de PBT contiene 95 ml de agua Milli Q estéril, 100 ml PBS 10x y 5 ml Tween 20 (Sigma Aldrich, Alemania). Para hacer unos 3 ml de PBT con suero

de cabra, los cuales se mantienen a 4°C, se utilizan los reactivos enlistados a continuación:

- 1980 µl PBT
- 900 µl Suero de cabra NGS
- 120 µl Azida de sodio 0.5%

Para realizar la inmunotinción de la histona H3 fosforilada se siguió el protocolo descrito en Salinas et al. (2007), el cual se describe brevemente a continuación. Al igual que en la tinción para DAPI se prepararon portaobjetos con polilisina y se disecaron las gónadas. La muestra se introdujo en el nitrógeno líquido, se removió el cubreobjetos y luego se colocó en metanol absoluto a 20°C durante un tiempo máximo de un minuto. Posteriormente se fijó en la solución A por 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se lavó dos veces en PBT por 10 minutos. Después se bloqueó la muestra con 30 µl de PBT con suero de cabra (PBT/NGS) durante 30 minutos en una caja húmeda perfectamente nivelada.

La muestra se lavó en PBT por 10 minutos y se incubó con el anticuerpo primario durante dos horas a temperatura ambiente. El anticuerpo primario α -H3 (Ser10) de conejo (Upstate- Millipore, USA) fue utilizado a una dilución de 1:200 en PBT/NGS. Como alternativa se puede dejar toda la noche a 4°C dentro de una caja húmeda perfectamente nivelada.

Transcurrido este tiempo, la muestra se lavó en PBT durante 10 minutos. El anticuerpo secundario ALEXA Fluor 488 (Invitrogen, USA), un anticuerpo anti-conejo, se empleó a una dilución de 1:200 en PBT/NGS. En este último paso se agregó también el colorante DAPI a una concentración de 50 ng/µl. La muestra se incubó en un volumen de 30 µl durante una hora a temperatura ambiente dentro de una caja húmeda perfectamente nivelada. Por último se lavó en PBT durante 10 minutos, se agregaron 10 µl de vectashield (Vector Lab, USA), se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se selló con barniz para observarla al microscopio.

Para preparar 30 ml de la solución de fijado o solución A se requiere:

- 1.1 g de paraformaldehído

- Disolver en 24.6 ml de agua milli Q estéril
- Para favorecer la disolución se agregan 90 μ l de NaOH 5N y se deja dentro de un recipiente con agua caliente.
- Una vez disuelto el paraformaldehído, agregar 3 ml de PBS 10x, 2.4 ml de HEPES 1M, 48 μ l de MgSO₄ 1M y 96 μ l de EGTA 250mM.
- Mezclar y dejar a temperatura ambiente.

4.9 Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el programa Origin Pro7 de OriginLab, USA. Para analizar la apoptosis fisiológica se utilizó una prueba de t de una muestra. En la prueba de t se asume que la distribución es normal y se emplea cuando se desconoce la varianza de la población a estudiar. En este caso se tiene una variable numérica, es decir, el número de cuerpos apoptóticos y un único caso a estudiar, la apoptosis en condiciones de comida. La prueba compara la media de la muestra x contra la media hipotética μ de la población que en este caso sería el promedio de cuerpos apoptóticos de los animales que cargan el plásmido vacío (PV).

De la misma manera se analizaron los experimentos de progenie. En este caso se toma como media poblacional el promedio de hijos que tiene un animal silvestre a lo largo de toda su vida, dato obtenido de los experimentos de PV (RNAi). Esta prueba también se empleó para analizar los datos obtenidos del conteo de células de las gónadas para las cuales se hicieron las tinciones. Se compararon la cantidad de ovocitos y de espermatozoides tanto del PV como del gen de interés.

Para el caso de los animales sometidos a ayuno se realizó una prueba de t de dos muestras no pareadas. En este caso se buscaron las diferencias de las medias de ambos grupos, es decir, con comida y sin comida. Dicha prueba se empleó para el control y para cada uno de los genes. Esta prueba estadística también se usó para analizar los datos obtenidos de las tinciones, pues permitió comparar la cantidad de células que hay en la región mitótica, en la zona de transición y en la de paquíteno del gen bajo estudio y del control.

En cualquiera de las dos pruebas estadísticas se consideró una distribución normal y un intervalo de confianza del 95%, es decir que los valores de p que sean menores a 0.05 indican diferencias significativas entre

las muestras comparadas. En cuanto a las pruebas de una sola muestra, los datos obtenidos del control se consideraron representativos de la población de nematodos (Petrie y Sabin, 2000).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de encontrar factores involucrados en la apoptosis inducida por ayuno y/o en la apoptosis fisiológica, se seleccionaron genes que en un microarreglo tuvieron una expresión mayor o menor a un valor de z de 1.5 en condiciones de ayuno. Los genes se escogieron al azar y de muchos no se conocen los homólogos en otros organismos ni su función en el nematodo. Haciendo RNAi en animales hermafroditas de la cepa *ced-1::gfp* se realizó un escrutinio que consistió en contar cuerpos apoptóticos con el fin de probar si el silenciamiento de los genes tiene un efecto sobre la apoptosis de la línea germinal. En total se estudiaron 25 genes de los cuales tres de ellos, F38E1.7, C50F2.3 y F53F4.11, tuvieron un fenotipo letal y un cuarto (Y41C4A.10) carecía de gónada, por lo cual no pudieron ser incluidos en nuestro análisis.

F38E1.7 codifica para la proteína MOM-2 y es un transductor de señales que participa en la vía de factores Wnt, una vía fundamental en el desarrollo embrionario y en la vida adulta del organismo. El RNAi para dicho gen provoca letalidad embrionaria en los animales. El silenciamiento del gen C50F2.3, el cual codifica para un factor de splicing, induce el mismo fenotipo. El gen F53F4.11 codifica para un constituyente esencial de los ribosomas y de acuerdo a la base de datos, los animales RNAi presentan serios defectos en el desarrollo. Por último, en el RNAi para el gen Y41C4A.10 (*elb-1*), los animales mostraron una gónada muy atrofiada, incluso muchos de ellos carecían de ésta. Estos animales también eran mucho más delgados, más transparentes y presentaban una vulva protuberante (Figura 10). De acuerdo a la base de datos del *C. elegans*, este gen codifica para una proteína parecida a la elongina B, la cual es necesaria para la condensación y segregación de los cromosomas durante las divisiones mitóticas y meióticas (<http://www.wormbase.org/>, liberado en diciembre 2008, WS197).

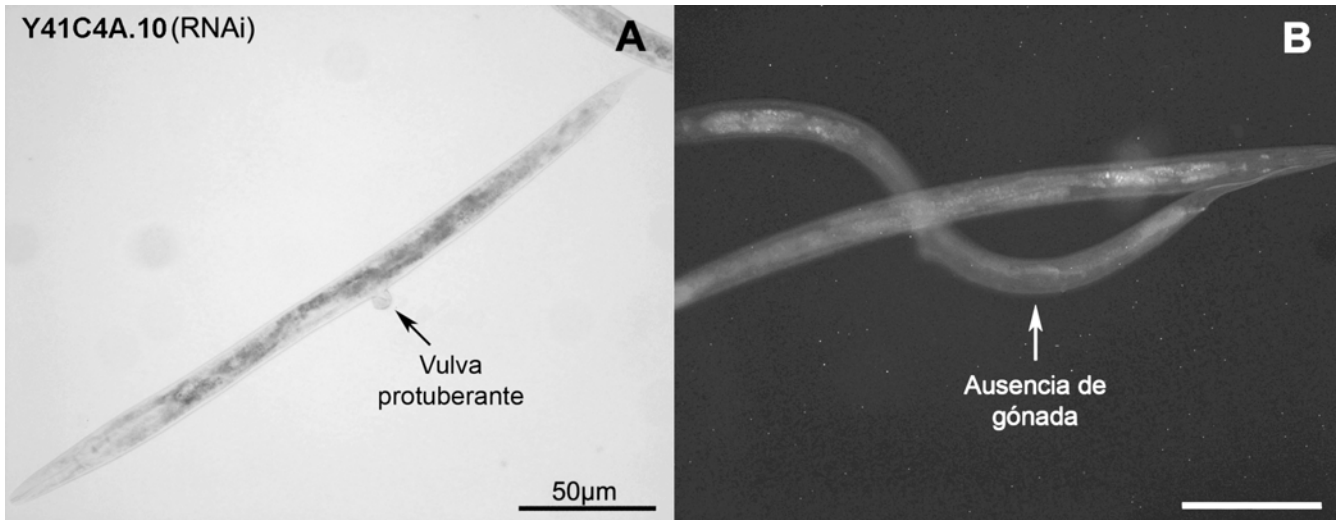


Figura 10: Animales *elb-1* (RNAi) que carecen de gónada y tienen una vulva protuberante. El gen Y41C4A.10 codifica para una proteína similar a la Elongina B que participa en la condensación y segregación de los cromosomas. **A:** Imagen en microscopía Nomarski de un animal muy delgado, transparente y con la vulva protuberante señalada por una flecha. **B:** Imagen de microscopía de fluorescencia en la que la flecha marca el lugar donde debería verse la gónada.

5.1 El silenciamiento de algunos genes provoca un aumento en la apoptosis fisiológica

La apoptosis de las células germinales ocurre únicamente durante la ovogénesis y sólo puede observarse en los animales hermafroditas. Esta muerte sucede bajo condiciones fisiológicas normales y es activada por la maquinaria apoptótica central que involucra a las proteínas CED-4 y CED-3. Además, es independiente de EGL-1, una proteína pro-apoptótica con un dominio BH3, y de CEP-1, proteína que se activa ante un daño al DNA. A pesar de estas características, todavía se desconoce el mecanismo por el cual ocurre este tipo de apoptosis (Gartner et al., 2008).

Para estudiar la apoptosis fisiológica se realizó un conteo de cuerpos apoptóticos en la gónada de animales que permanecieron en condiciones normales de crecimiento. El análisis estadístico arrojó que el silenciamiento de once genes provoca un aumento en la apoptosis fisiológica al compararlos con los animales control (PV). Todos aquellos animales RNAi que no mostraron diferencias significativas en la apoptosis fisiológica se encuentran descritos de manera resumida en los Anexos, Sección I, Figura 1 y 2. Los genes que al silenciarlos sí provocaron un incremento significativo en la apoptosis de los

ovocitos se encuentran marcados por un asterisco en las Figuras 11 y 12 y los más representativos están señalados por dos asteriscos. En este caso se consideró como más distintivos los experimentos de RNAi que en el análisis estadístico tuvieron un valor de p muy por debajo de 0.05, con lo cual aseguramos que existe un aumento real en la apoptosis. Algunos casos aparentan tener diferencias significativas, pero para asegurarlo se requeriría tener una muestra mayor. Es por ello que se han considerado únicamente aquellos que bajo la prueba de t sí tienen una diferencia real con el fin de poder cerciorarnos de la posible participación de los genes en la apoptosis.

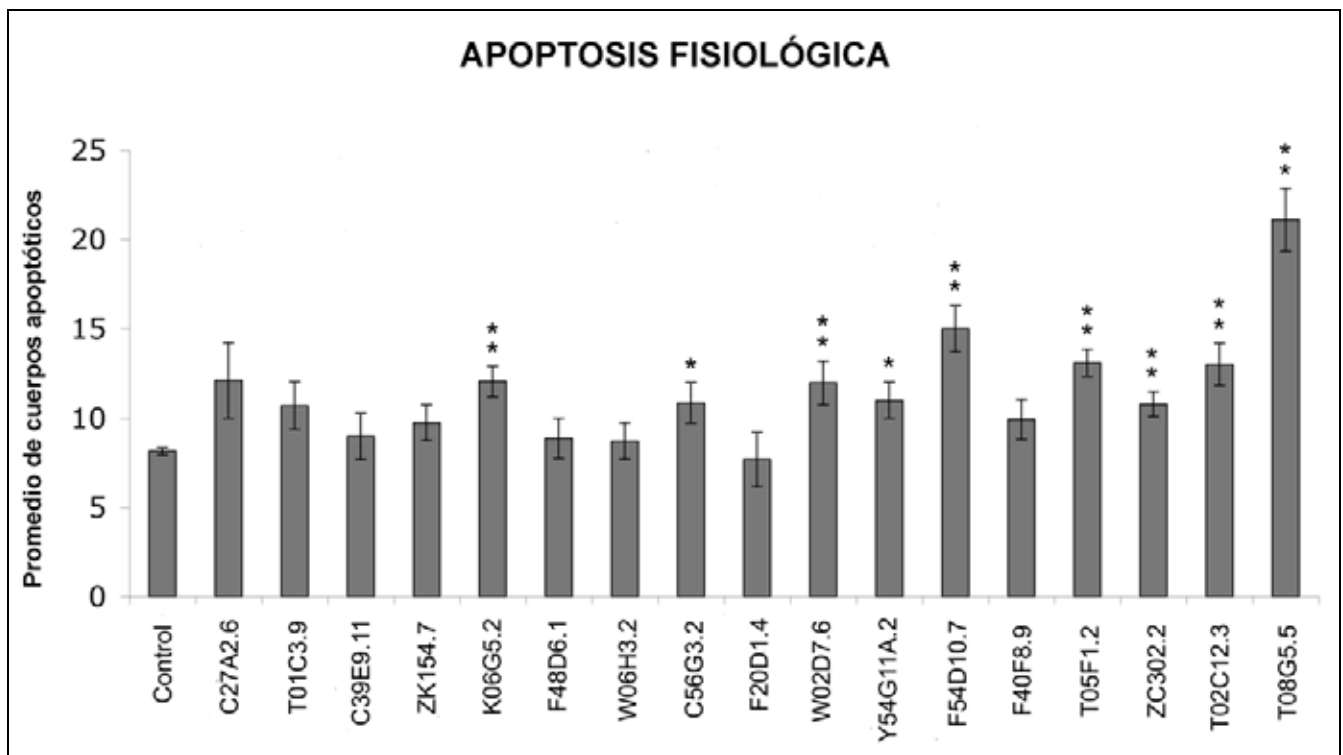


Figura 11: Estudio de la apoptosis fisiológica en animales RNAi para genes que en ayuno tienen una menor expresión. Se muestra graficado el promedio de los cuerpos apoptóticos observado en los animales control y RNAi para los genes indicados y su error estándar. Los asteriscos marcan los genes que tuvieron diferencias significativas en comparación con el control, denotando con dos asteriscos aquellos que tuvieron una diferencia contundente.

La diferencia significativa en el número de cuerpos apoptóticos indica que los genes estudiados podrían estar participando en la apoptosis de la línea germinal. En este caso, todos los animales RNAi que tienen diferencias significativas presentan un aumento en el número de cuerpos apoptóticos. Debido a esto, se podría suponer que en condiciones fisiológicas estos genes deberían

favorecer la supervivencia celular de manera directa o indirecta. No obstante, el aumento de la apoptosis no necesariamente indica que los genes están participando en la cascada apoptótica, pues hay una serie de factores que pueden influir en el número de los cuerpos apoptóticos detectados. La cepa *ced-1::gfp* permite reconocer los cuerpos apoptóticos tempranos por lo que es una técnica muy sensible. Sin embargo, es poco eficiente si hay una gran acumulación de cuerpos, ya que es difícil diferenciar una célula de otra. En este caso no hubo animales RNAi que presentaran una gran cantidad de cuerpos apoptóticos, por lo que el conteo se realizó de manera eficiente. Por otro lado, se sabe que al cabo de un tiempo algunas células flanqueadas pero no completamente rodeadas por la GFP no forman cuerpos apoptóticos, con lo cual se observaría una mayor cantidad de cuerpos en relación al número real. Para reducir el margen de error se contaron solamente aquellas células que se encontraban completamente rodeadas por la GFP.

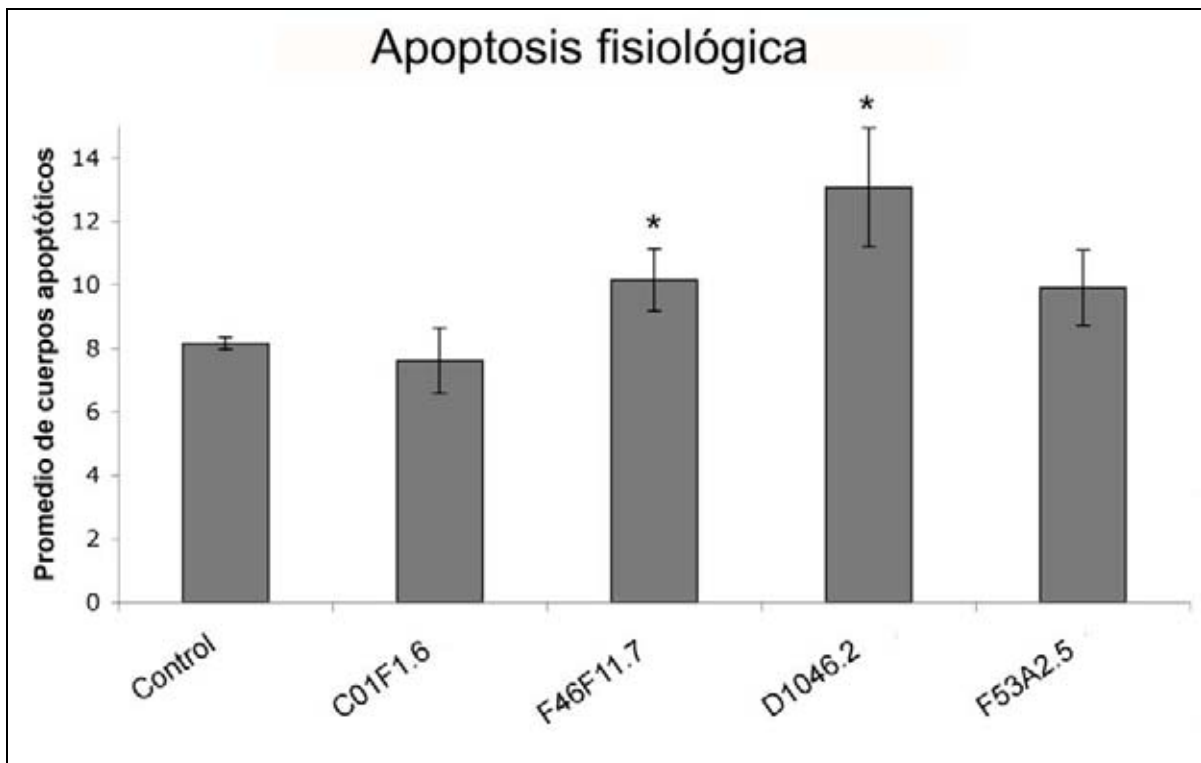


Figura 12: Estudio de la apoptosis fisiológica en animales RNAi para genes que en ayuno tienen una mayor expresión. Se muestra graficado el promedio de los cuerpos apoptóticos obtenido de animales control y RNAi para los genes indicados y sus respectivas barras de error. Los asteriscos marcan los genes que tuvieron diferencias significativas en comparación con el control.

Existen también otros factores que afectan el número de células en apoptosis detectadas, como por ejemplo la tasa de proliferación, ya que al haber más células puede a su vez haber más apoptosis. También, la tasa de fagocitosis puede afectar la cantidad de cuerpos apoptóticos. Si la maquinaria de fagocitosis está alterada habrá una acumulación de cuerpos apoptóticos sin que haya un defecto en la maquinaria apoptótica (Gartner et al., 2008).

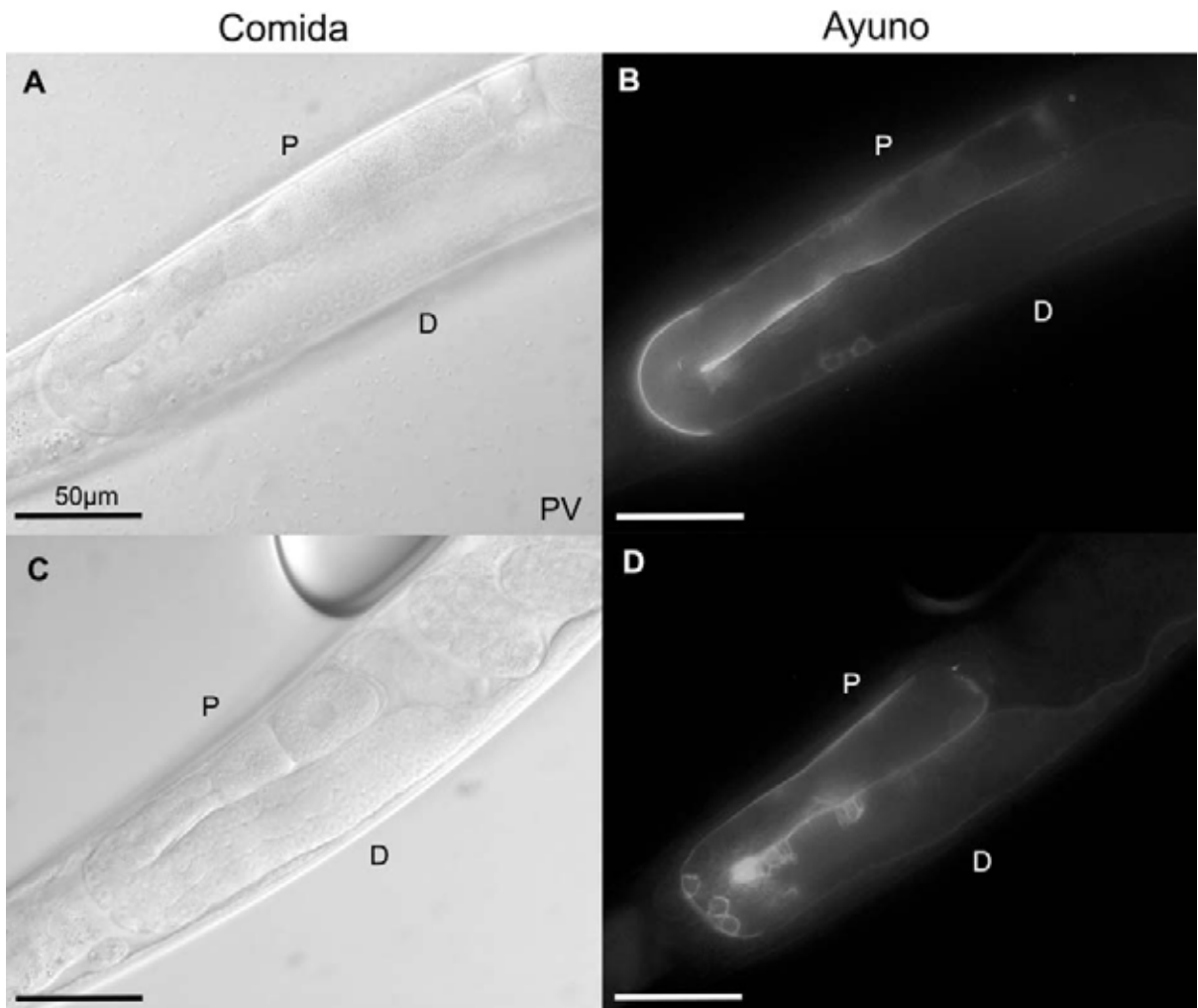


Figura 13: Animales control (PV). **A, B:** Imágenes en microscopía Nomarski de animales con comida y en ayuno. **C, D:** Imágenes en microscopía de fluorescencia de animales en condiciones normales de crecimiento y de ayuno. En las imágenes la letra P señala la región proximal de la gónada donde se encuentran los ovocitos y la letra D indica la región distal.

Un ejemplo de esto último es el gen *vps-39* (T08G5.5), el cual participa en la maduración de los fagosomas que contienen a los cuerpos apoptóticos (Kinchen et al., 2008). *vps-39* codifica para una proteína que pertenece al complejo HOPS,

un intercambiador de GTPasas que participa en la fusión de vacuolas y que fue descubierto en la levadura (Seals et al., 2000). Las mutaciones en los genes del complejo provocan la acumulación de cuerpos apoptóticos, pero no afectan la internalización de los mismos (Kinchen et al., 2008). El fenotipo se observa claramente en los animales *ced-1::gfp*, sobre todo en condiciones de ayuno en donde se ven una gran cantidad de cuerpos apoptóticos que llegan incluso a deformar un poco la gónada (Figura 14; B, D).

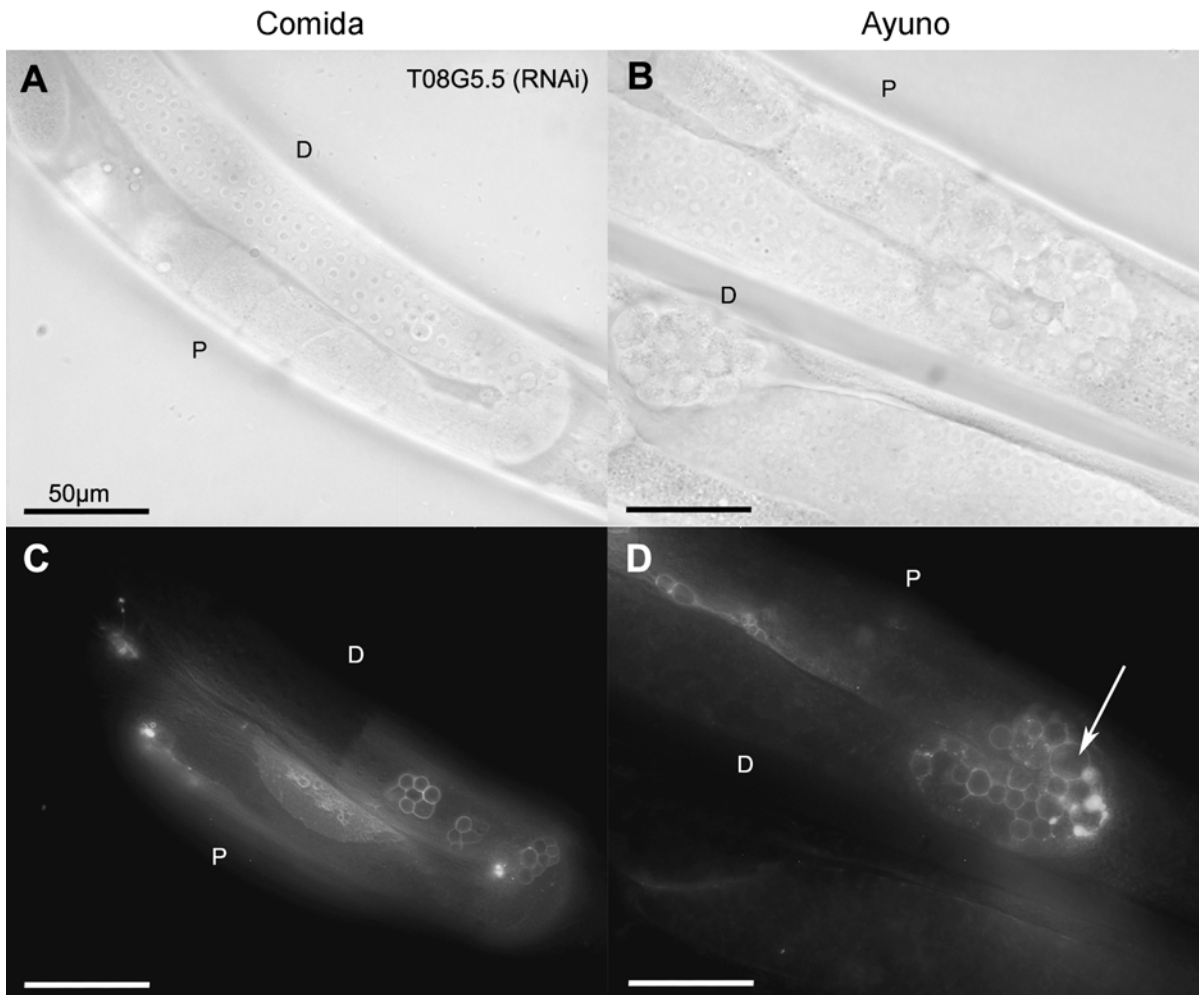


Figura 14: Animales *vps-39* (RNAi) que muestran una acumulación de cuerpos apoptóticos. El gen T08G5.5 codifica para la proteína VPS-39, la cual participa en la maduración de los fagosomas, por lo que al no estar presente los cuerpos apoptóticos se acumulan. **A, B:** Imágenes en microscopía Nomarski de animales con comida y en ayuno. **C, D:** Imágenes en microscopía de fluorescencia donde en D se aprecia la acumulación de los cuerpos apoptóticos que están señalados por una flecha. En las imágenes la letra P indica la región proximal de la gónada y la región distal está indicada por una D.

Los animales RNAi que tienen la apoptosis fisiológica más aumentada (marcados con dos asteriscos, Figura 11) son los denotados por el nombre de los genes K06G5.2, W02D7.6, F54D10.7, T05F1.2, ZC302.2 y T02C12.3. Algunos de ellos muestran fenotipos en la gónada como por ejemplo, la presencia de muchos gránulos en los ovocitos, huecos en el citoplasma, una gónada atrofiada, etc. En cambio, los animales control tienen una gónada silvestre y un bajo número de cuerpos apoptóticos en condiciones normales de crecimiento (Figura 13).

El gen *cyp-13B2* (K06G5.2) codifica para una proteína de la familia de los citocromos P450. Esta familia de enzimas son monooxigenasas involucradas en el metabolismo de xenobióticos y en la síntesis de esteroides, de lípidos y de vitaminas. Son proteínas que catalizan la inserción de moléculas de oxígeno en enlaces C-H inactivos (Chefson y Auclair, 2006). Todavía se desconoce en qué función metabólica participa la proteína CYP-13B2 y los animales RNAi observados bajo microscopía tipo Nomarski no tienen ningún otro fenotipo aparente en la gónada excepto el aumento en la apoptosis (Anexos, Sección III.I, Figura 5).

El gen W02D7.6 codifica para una proteína que tiene un dedo de zinc tipo C2H2 (Cys2-His2). Este tipo de dominios, que se presentan en varias proteínas reguladoras, tienen la propiedad de unir DNA y RNA e incluso participan en las interacciones tipo proteína-proteína (Iuchi, 2001). Además de su posible participación como factor de transcripción, no se ha reportado nada acerca de la función de esta proteína y el silenciamiento del gen no tiene un efecto sobre la morfología de la gónada (Anexos, Sección III.I, Figura 5).

Para el gen F54D10.7 se desconoce su función y la proteína para la cual codifica. De acuerdo a la base de datos, tiene un dominio de ubiquitina y en base a experimentos de doble híbrido parece ser que interactúa con la proteína IMA-3, con el receptor hormonal nuclear NHR-49 y con un factor de elongación de la traducción (T04H1.2). La proteína IMA-3 es una importina nuclear fundamental para la ovogénesis, la cual participa en la salida de los ovocitos de la fase de paquíteno y se expresa tanto en la línea germinal como en el soma. Asimismo,

está involucrada en la asociación de los gránulos P al complejo del poro nuclear (NPC) (Geles y Adam, 2001). Sin embargo, se desconoce si el gen F54D10.7 tiene alguna participación directa con procesos germinales.

El gen T05F1.2 codifica para una proteína que al parecer se expresa en la región media de la gónada. No obstante, no se ha reportado nada acerca de su función e incluso en las observaciones hechas, no se reconoce ningún fenotipo en la gónada en condiciones normales de crecimiento a pesar de que su silenciamiento provoca un aumento en la apoptosis fisiológica. Al observar a los animales RNAi sometidos a ayuno, se pueden apreciar unos ovocitos más granulados y la distribución de componentes del citoplasma concentrados hacia la región perinuclear (Figura 15, B), aunque este gen no participa en la apoptosis ocasionada por ayuno (Figura 17).

La proteína para la cual codifica el gen ZC302.2 tiene un dominio de repetidos de WD40 y todavía se desconoce su función o el proceso biológico en el que participa. La familia de proteínas que tienen este tipo de dominios tienen funciones muy diversas (Ploegh y van der Voorn, 1992). Por ejemplo, los repetidos WD40 son requeridos para las interacciones tipo proteína-proteína, tal como ocurre con el regulador del ciclo celular Cdc20 que interactúa con la proteína APC/C, la cual es fundamental para la progresión del ciclo celular (Yu, 2007). De igual manera, la proteína APAF-1 que participa en la formación del apoptosoma en mamíferos, contiene un repetido WD40 el cual regula de manera negativa a la proteína, puesto que la ausencia de dicho dominio provoca su activación constitutiva (Adams y Cory, 2002).

Otro de los genes estudiados es el gen T02C12.3. El silenciamiento de este gen provoca un aumento en la apoptosis fisiológica y los animales no responden a la apoptosis inducida por ayuno. T02C12.3 codifica para una subunidad del factor de transcripción TFIIC de la RNA polimerasa III que participa en la remodelación de la cromatina (Cui et al., 2006; Simms et al., 2008). Los animales observados presentan cuerpos apoptóticos en la región más proximal (Figura 16; A y C), lo cual no ocurre en el organismo silvestre, dado que las células mueren en la región del asa de la gónada donde los ovocitos en desarrollo salen de la fase de

paquíteno (Gartner et al., 2008; Gumienny et al., 1999). También en condiciones de ayuno parece que hay una agregación del citoplasma hacia el núcleo, con lo cual se aprecia un hueco en la célula y los ovocitos se ven más pequeños (Figura 16; B).

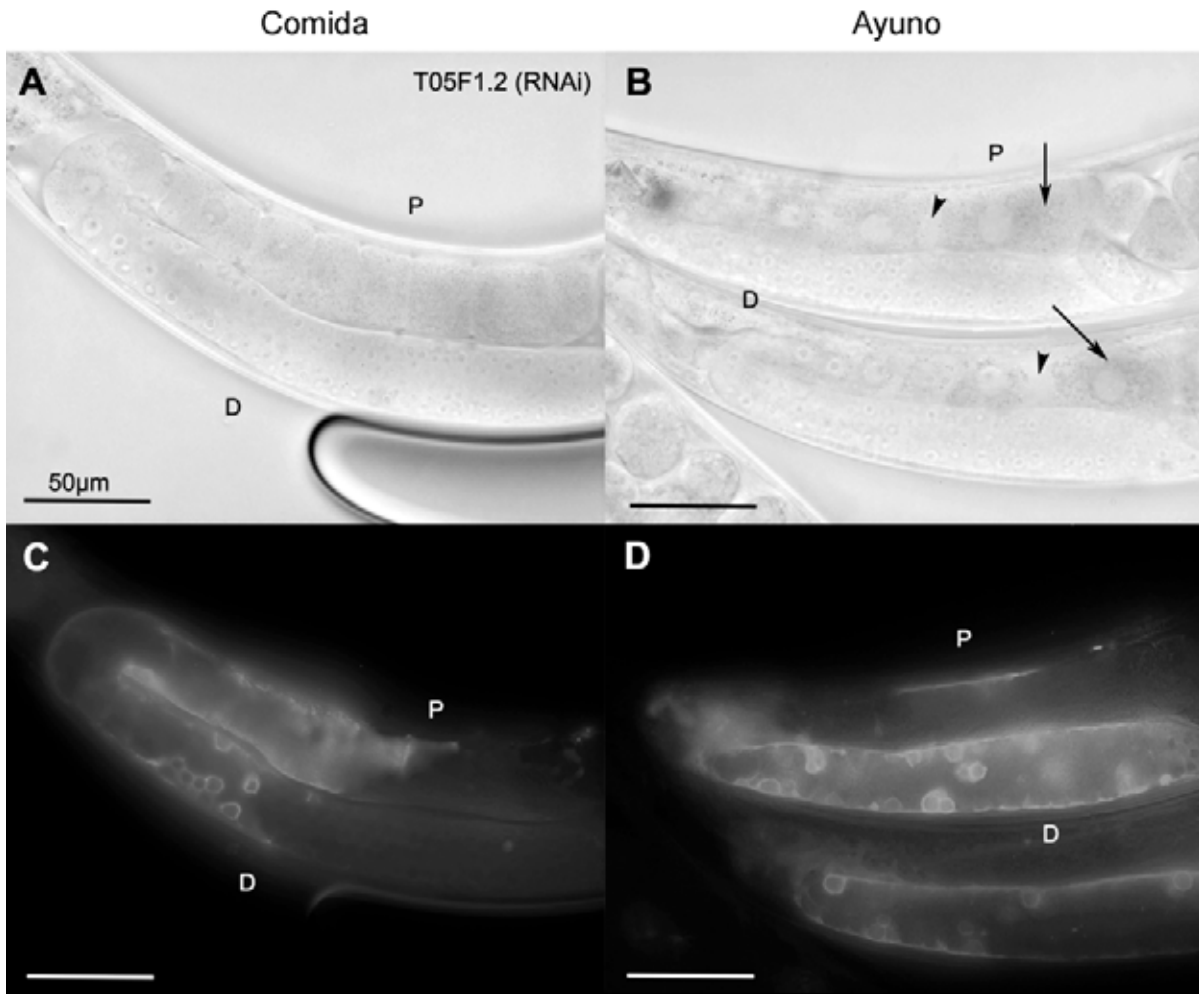


Figura 15: Animales T05F1.2 (RNAi) que en ayuno presentan el citoplasma concentrado hacia el núcleo y ovocitos granulados. El gen se expresa en la región media de la gónada, pero aún se desconoce la proteína para la cual codifica. En condiciones normales la gónada no tiene un fenotipo aparente. **A, B:** Microscopía Nomarski de animales en condiciones de comida y de ayuno. En B las cabezas de flecha muestran el hueco generado al concentrarse el citoplasma hacia el núcleo y las flechas los ovocitos granulados. **C, D:** Microscopía de fluorescencia de animales con comida y en ayuno. En las imágenes la región proximal de la gónada está indicada por una P y la distal por una D.

De acuerdo a lo observado, la apoptosis fisiológica es inducida al silenciar varios de los genes estudiados, aunque se desconoce la razón y la función que éstos desempeñan en la apoptosis. Algunos de los animales RNAi presentan

fenotipos somáticos o relacionados con la gónada, con lo cual puede que sean genes que tengan alguna otra función en el organismo y que participen de manera directa o indirecta en la apoptosis de las células germinales. Por otro lado, los animales RNAi para algunos genes como W02D7.6 y F54D10.7 no muestran un fenotipo aparente a nivel morfológico, pero tienen aumentada la apoptosis (Figura 11 y 12). Es por ello que estos genes podrían ser importantes para la apoptosis fisiológica. Entre éstos, el gen W02D7.6 y otro gen denominado D1046.2, codifican

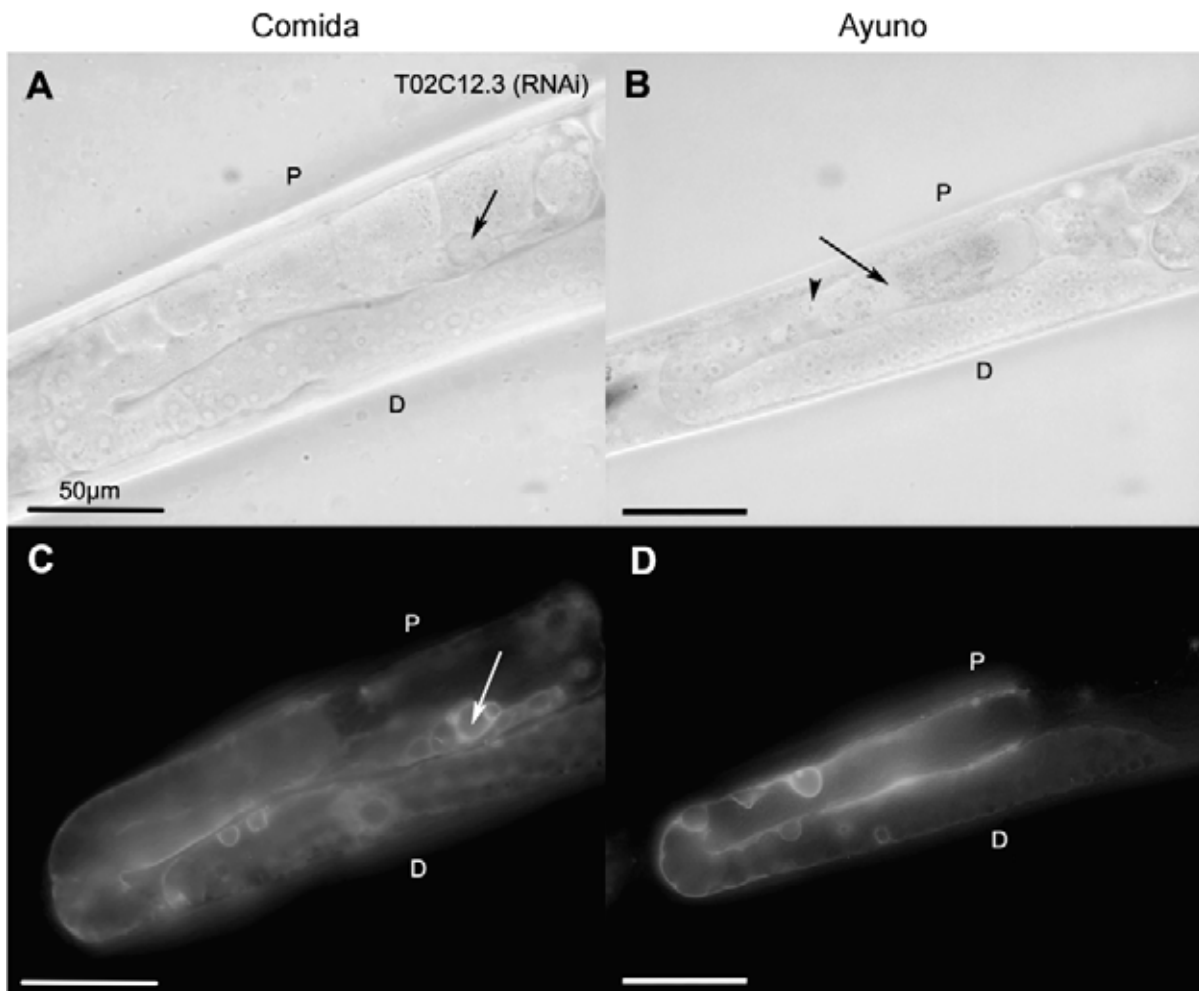


Figura 16: Animales T02C12.3 (RNAi) que presentan cuerpos apoptóticos en la región más proximal, ovocitos pequeños y huecos en el citoplasma. El gen T02C12.3 codifica para una subunidad del factor de transcripción tipo TFIIIC de la RNA polimerasa III que participa en la remodelación de la cromatina. **A, B:** Imágenes en microscopía Nomarski de animales RNAi en condiciones normales y en ayuno. En A se aprecian ovocitos en la región proximal señalados por una flecha. En el pánel B los animales presentan huecos en el citoplasma tal como lo señala la flecha. También se observan ovocitos pequeños como indica la cabeza de flecha. **C, D:** Imágenes en microscopía de fluorescencia de animales con y sin comida. En condiciones normales (C) se observan cuerpos apoptóticos en la región más proximal, señalados por una flecha. En las imágenes se encuentran indicadas las regiones proximal (P) y distal (D) de la gónada.

para proteínas que tienen la característica de presentar un dominio de dedo de zinc del tipo C2H2 y pueden por tanto unir RNA y DNA. Esto podría ser relevante, puesto que se sabe que muchos genes que previenen la apoptosis fisiológica son proteínas que unen RNA, como por ejemplo CGH-1, CAR-1 y DAZ-1 (Gartner et al., 2008).

5.2 Algunos genes participan en la apoptosis inducida por ayuno

La apoptosis inducida por ayuno es independiente de los genes *egl-1* y *cep-1* por lo que se considera que es una apoptosis del tipo fisiológica. Además, no participan las cinasas MEK-1 y SEK-1 lo que sugiere que la apoptosis se induce por alguna otra vía de señalización (Gartner et al., 2008; Salinas et al., 2006). Con el fin de estudiar este tipo de apoptosis, se realizaron experimentos de RNAi en los genes antes descritos para identificar alguno que participe en la muerte ocasionada por ayuno. Para ello se hizo un conteo de cuerpos apoptóticos en animales RNAi y en animales control, ambos mantenidos tanto en condiciones normales de crecimiento como sometidos a ayuno.

En la cepa silvestre, bajo condiciones de ayuno, hay un aumento en la apoptosis de las células germinales (Salinas et al., 2006). Este tipo de muerte ocurre en regiones en las que las células germinales se están diferenciando en ovocitos y cuando entran en estrés se activa la vía de la apoptosis, provocando así el incremento observado. Aquellos genes que al ser silenciados no provoquen en los animales un aumento en la apoptosis inducida por ayuno, serán los principales involucrados en este tipo de apoptosis.

Los animales control sometidos a ayuno efectivamente presentan un aumento en el número de cuerpos apoptóticos en comparación con los animales mantenidos con comida. El análisis estadístico arrojó que, al igual que en el control, el silenciamiento de 16 genes provoca un incremento en la apoptosis bajo condiciones de ayuno. En general, el aumento de los cuerpos apoptóticos en ayuno es proporcional al incremento de la apoptosis en condiciones de comida. Al igual que para la apoptosis fisiológica se realizaron gráficas que representan el

promedio de los cuerpos apoptóticos de los animales control y de los animales RNAi para cada gen, tanto en condiciones de comida como de ayuno. Los genes relevantes para la apoptosis inducida por ayuno se encuentran marcados por una flecha (Figuras 17 y 18).

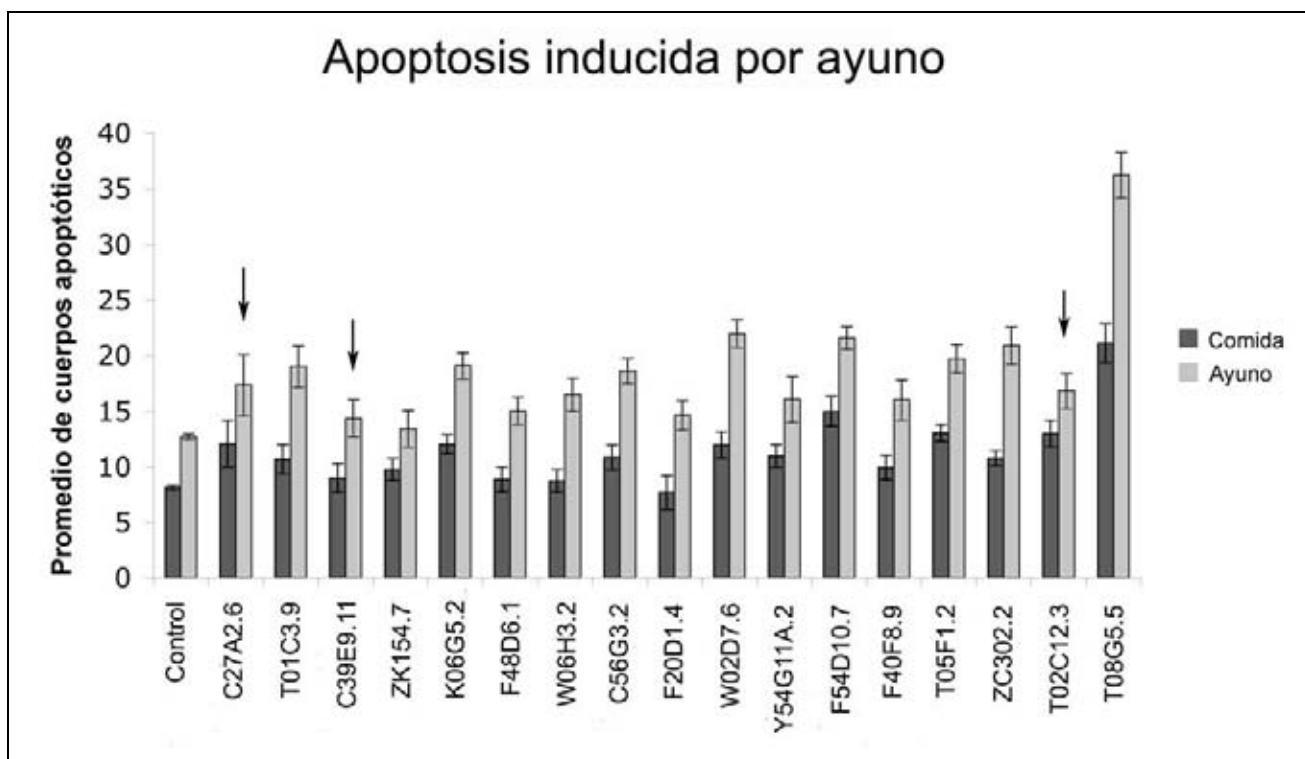


Figura 17: Estudio de la apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para genes que se expresan menos en ausencia de comida. Se muestran graficados el promedio de los cuerpos apoptóticos observado en animales control en condiciones de comida (barras gris oscuro) y de ayuno (barras gris claro). De igual manera está representado el promedio de cuerpos apoptóticos para cada uno de los experimentos de RNAi de los genes indicados. Las barras muestran el error estándar y las flechas marcan aquellos animales RNAi que no tienen una respuesta a la apoptosis inducida por ayuno.

Los animales RNAi para cinco genes, C27A2.6, ZK154.7, T02C12.3 (ya descrito), F46F11.7 y D1046.2, no mostraron un aumento en la apoptosis o tienen una respuesta reducida al ayuno (barras indicadas por flechas en las Figuras 17 y 18), lo cual sugiere que probablemente los genes estén participando en la apoptosis ocasionada por ayuno. A pesar de que la apoptosis observada sí aumenta un poco, no hay un incremento significativo con respecto al promedio de

cuerpos apoptóticos en condiciones de comida, por lo que no se están comportando de acuerdo a lo esperado.

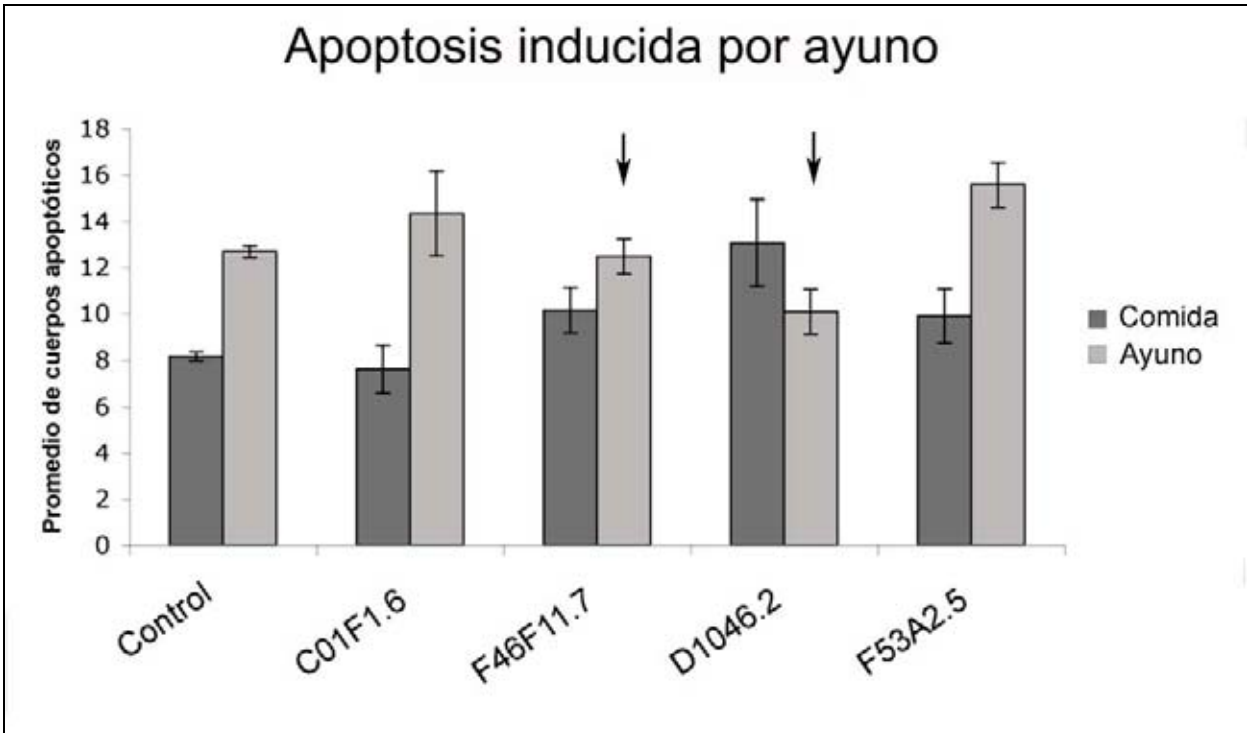


Figura 18: Estudio de la apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para genes que se expresan más en ausencia de comida. Se muestran graficados el promedio de los cuerpos apoptóticos de los animales control en condiciones de comida (barras gris oscuro) y de ayuno (barras gris claro). Asimismo está representado el promedio de cuerpos apoptóticos de los experimentos de RNAi para los genes indicados. Las barras muestran el error estándar y las flechas marcan aquellos animales RNAi que no mostraron una respuesta a la apoptosis inducida por ayuno.

El gen C27A2.6 o *dsh-2* (*dishevelled-2*) es un gen que codifica para una proteína que está principalmente asociada a membranas y tiene tres principales dominios, PDZ, DIX y DEP. El dominio PDZ se requiere para las interacciones tipo proteína-proteína (Tonikian et al., 2008), mientras que el dominio DIX es necesario para la transducción de señales (Schwarz-Romond et al., 2007). En cuanto al dominio DEP este es necesario para el reconocimiento específico de receptores acoplados a proteínas G (Ballon et al., 2006). De acuerdo con lo reportado en la literatura, los hermafroditas mutantes en este gen carecen de uno o de los dos brazos de la gónada, no forman bien el eje proximal-distal y no poseen las células del extremo distal. La proteína se expresa durante el desarrollo embrionario en las células Z1 y Z4 y se requiere para el desarrollo de la gónada. También se sabe

que participa en la vía de señalización de Wnt (Chang et al., 2005), una vía que es fundamental para una gran variedad de procesos durante el desarrollo embrionario y en el estado adulto. Existen hasta ahora tres distintas vías de señalización de Wnt, pero la vía canónica inicia cuando una glucoproteína de la familia Wnt activa a un receptor de la familia Frizzled lo cual conlleva a la activación de Dishevelled. Ésta a su vez inhibe a la cinasa-sintasa de glucógeno 3 (GSK3), lo que provoca que se activen proteínas como la β -catenina capaz de traslocarse al núcleo y promover la transcripción de algún gen blanco (Gilbert, 2006).

Los fenotipos reportados en la base de datos para los animales *dsh-2* (RNAi) son: letalidad embrionaria, desarrollo anormal o lento, vulva protuberante y esterilidad. Los animales RNAi observados no mostraron letalidad embrionaria ni esterilidad, por lo que pudieron ser estudiados a pesar de presentar anomalías corporales tales como una cabeza y una cola deforme (Figura 19; E y F). También se observó una gónada muy pequeña en condiciones de comida tal como se muestra en la Figura 19 (A y C).

En los animales RNAi para este gen se observó un hueco en el citoplasma de los ovocitos en condiciones de ayuno, tal como lo muestra la flecha en la Figura 20 B. De acuerdo con la base de datos del *C. elegans*, los nematodos *adm-4* (RNAi) muestran un crecimiento lento y parecen enfermos, fenotipos que no se observaron durante el desarrollo del experimento.

El gen ZK154.7 (*adm-4*) codifica para una proteína de la familia ADAM (*desintegrin plus metalloprotease family*). ADM-4 es una proteína que participa en la vía de señalización de LIN-12/Notch y tiene una función redundante con la proteína SUP-17, otra proteína de la misma familia (Jarriault y Greenwald, 2005). La vía de LIN-12/Notch es fundamental durante el desarrollo para el establecimiento del destino celular de las células de la gónada y en ella participan los receptores GLP-1 y LIN-12, los cuales son activados por ligandos como LAG-2 y DSL-1 (Greenwald, 2005). La reducción en la actividad de *adm-4* reprime la proliferación mitótica de la línea germinal inducida por *glp-1*. La reducción simultánea en la actividad de *sup-17* y de *adm-4* provoca la formación de dos

células ancla en vez de una, defecto que es característico en animales que carecen de *lin-12* (Jarriault y Greenwald, 2005).

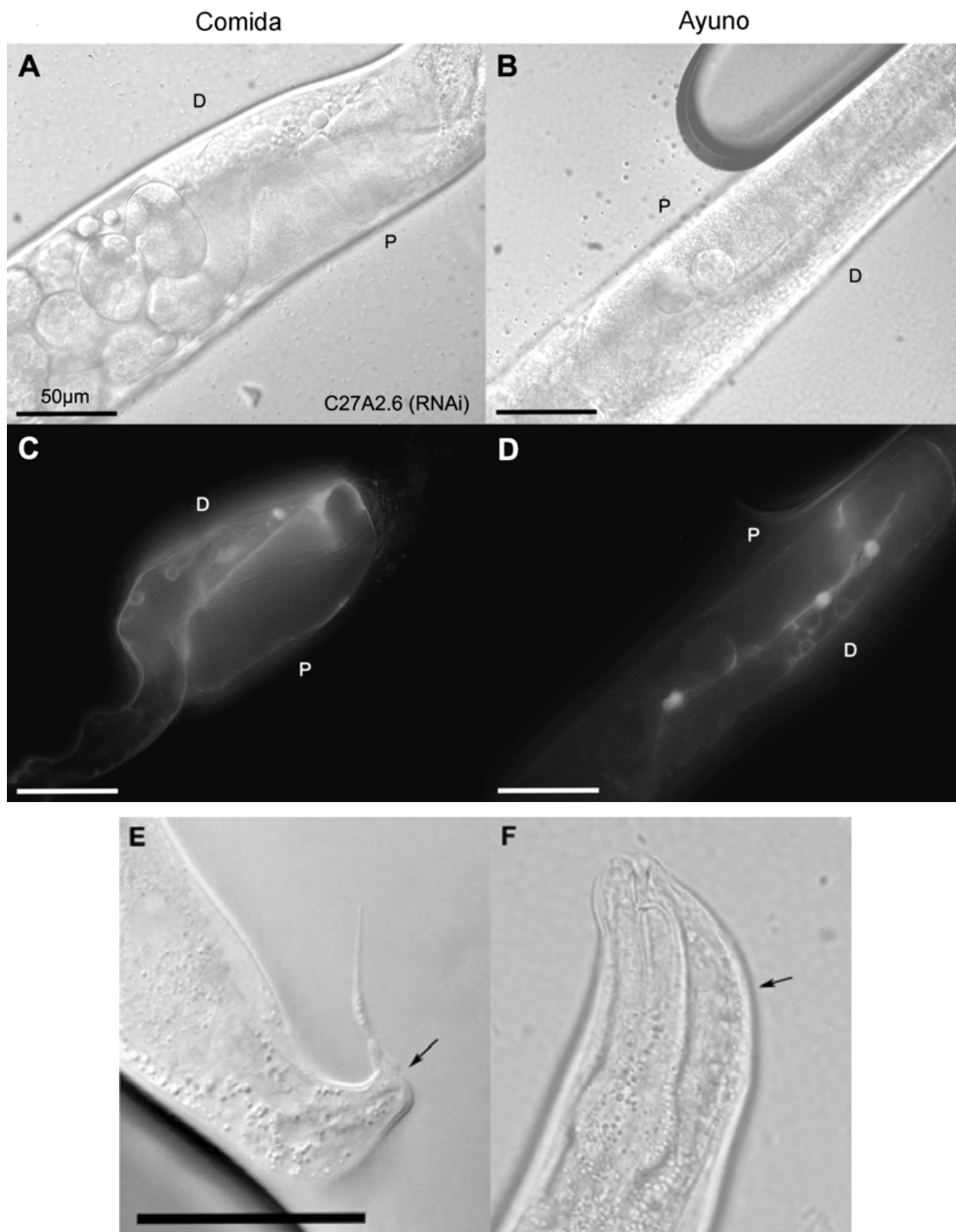


Figura 19: Animales *dsh-2* (RNAi) con anomalías en la cabeza y en la cola además de una gónada pequeña. El gen C27A2.6 codifica para la proteína Dishevelled la cual participa en la vía de señalización de los factores Wnt. **A, B:** Imágenes de microscopía Nomarski de animales con comida y en ayuno. **C, D:** Imágenes de fluorescencia, la gónada en C parece un poco más pequeña. En las imágenes se señala la región proximal (P) y distal (D) de la gónada **E, F:**

Microscopía Nomarski de animales en condiciones normales de crecimiento que presentan anomalías en la cabeza y en la cola señaladas por las flechas.

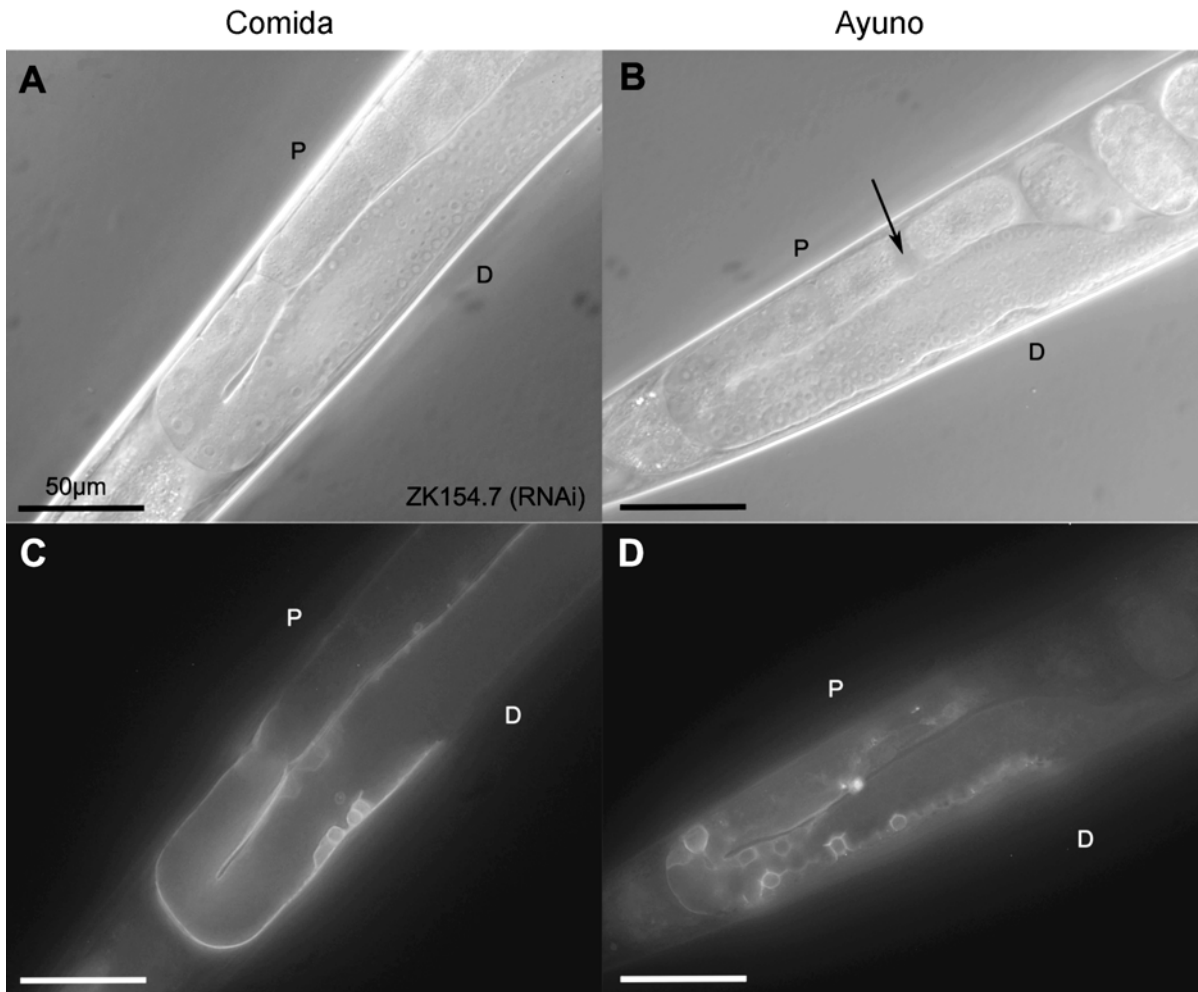


Figura 20: Animales *adm-4* (RNAi) que en condiciones de ayuno los ovocitos presentan huecos en el citoplasma. El gen ZK154.7 codifica para la proteína ADM-4 la cual participa en la vía de señalización de LIN-12/Notch. **A, B:** Imágenes en microscopía Nomarski de animales en condiciones normales y en ayuno. En B la flecha señala un hueco en el citoplasma de un ovocito. **C, D:** Fotos con microscopía de fluorescencia de animales en condiciones normales y de ayuno. En las imágenes la letra P indica la región proximal de la gónada y la región distal está denotada por una D.

Para el gen F46F11.7 no se ha reportado ningún fenotipo al ser silenciado por RNAi y se desconoce la proteína para la cual codifica. En los animales observados no se encontró ningún defecto a nivel morfológico (Anexos, Sección III.II, Figura 6). Sin embargo, el silenciamiento del gen no tuvo un efecto en la apoptosis inducida por ayuno, lo que sugiere que el gen podría participar en este tipo de apoptosis.

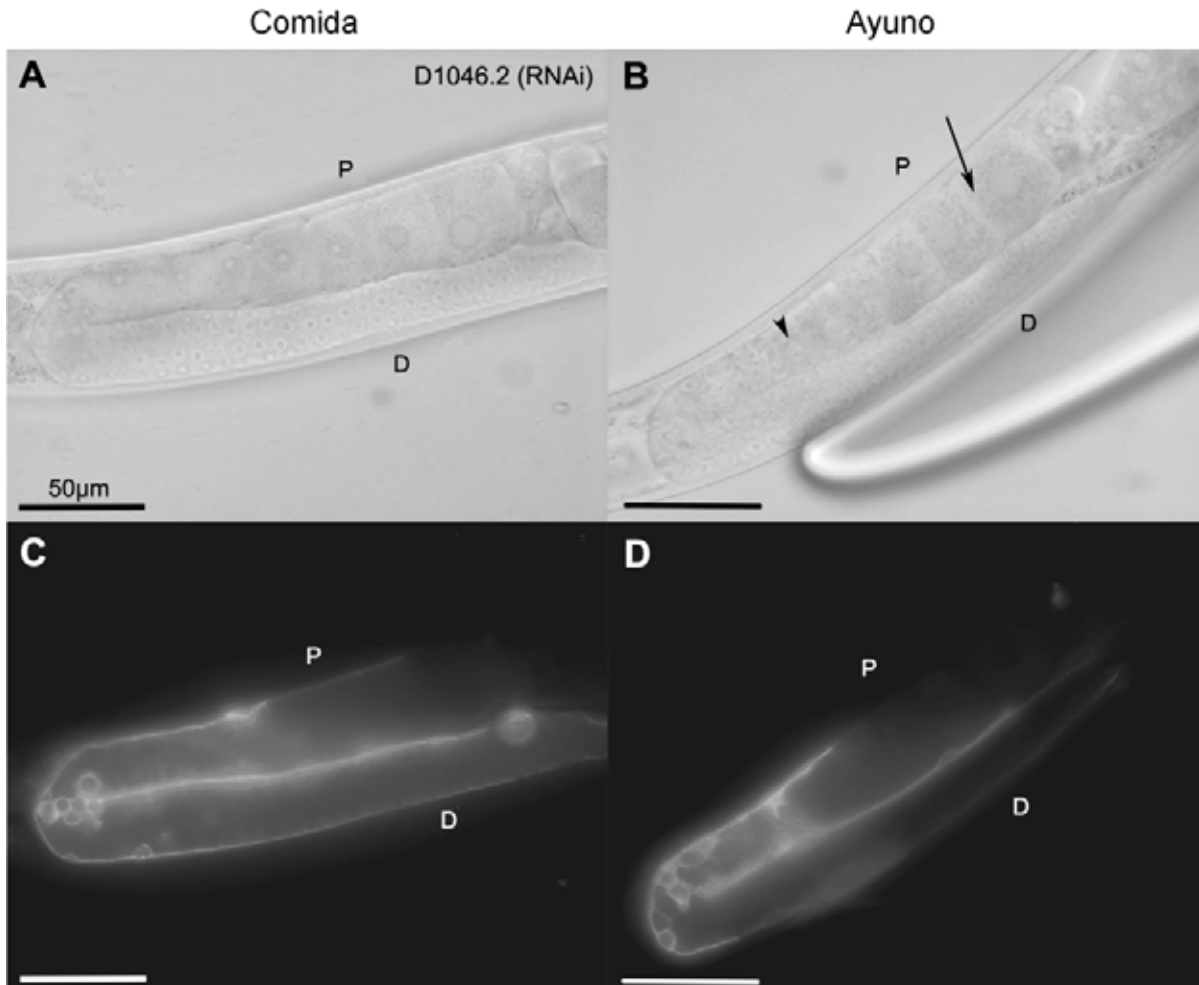


Figura 21: Animales D1046.2 (RNAi) que muestran ovocitos granulosos y pequeños en condiciones de ayuno. El gen D1046.2 codifica para una proteína con un dedo de zinc tipo C2H2. **A, B:** microscopía Nomarski de animales con comida y en ayuno. En condiciones de ayuno (B) los ovocitos se ven más granulosos tal como lo señala la flecha y algunos son más pequeños como indica la cabeza de flecha. **C, D:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de animales con comida y en ayuno. P y D indican la región proximal y distal de la gónada respectivamente.

En cuanto al gen D1046.2, cuyo silenciamiento provoca un aumento en la apoptosis fisiológica en la gónada, codifica para una proteína con un dominio de dedo de zinc tipo C2H2. Esta proteína se ha reportado como un posible factor de transcripción dado que puede unirse al DNA gracias a su dominio tipo C2H2 (Okkema y Krause, 2005), aunque también podría participar en la interacción proteína-proteína o en la unión a RNA (Iuchi, 2001).

De acuerdo con la base de datos los animales RNAi para este gen presentan varios fenotipos como son el arresto larvario, una locomoción anormal y

muerte por explosión de la vulva. En cuanto al fenotipo que se observó en los animales RNAi fue que explotaban por la vulva, se veían más transparentes y detuvieron su desarrollo en algún estado larvario. Sin embargo, los fenotipos no se observaron de manera conjunta ni en todos los animales, lo cual se puede deber a la penetrancia del RNAi. En los animales que superaron estos fenotipos se puede apreciar que, en condiciones de ayuno, tienen unos ovocitos más granulosos y otros muy pequeños justo al pasar el asa de la gónada (Figura 21; B).

Los animales RNAi para los cinco genes descritos anteriormente no muestran una respuesta a la apoptosis inducida por ayuno y algunos de ellos incluso tienen la apoptosis fisiológica aumentada. A excepción de los animales F46F11.7 (RNAi) todos tuvieron algún fenotipo a nivel de la gónada tales como huecos en el citoplasma y ovocitos granulosos o pequeños. De acuerdo con Salinas et al. (2006), las condiciones de ayuno empleadas no afectan la integridad genómica, ya que la apoptosis observada no es inducida por la proteína CEP-1 (p53). Debido a esto se podría suponer que el ayuno estuviera afectando componentes del citoplasma. Considerando la hipótesis de que las células en apoptosis sirven como células nodrizas para el ovocito que va a madurar, el ayuno debe afectar los componentes citoplásmicos, por lo que la célula recurre a la apoptosis. La apoptosis funcionaría como un mecanismo para eliminar células con componentes citoplásmicos alterados, con el fin de evitar la formación de ovocitos no viables (Gartner et al., 2008) y con ello asegurar el éxito de la embriogénesis. Este tipo de estrés citoplásmico se podría estar reflejando en los fenotipos observados, como son los huecos en el citoplasma. Otra hipótesis es que la presencia de ovocitos pequeños podría deberse a una señal de que no se produjo suficiente material citoplásmico para formar un ovocito de tamaño normal o que hay un defecto en la maquinaria que impulsa el citoplasma hacia el ovocito (Wolke et al., 2007).

También el hecho de que los ovocitos se vean granulosos puede ser un indicador de la formación de complejos ribonucleoprotéicos (RNP) como son los gránulos de estrés, los cuales se forman cuando en condiciones de estrés se fosforila el factor de iniciación de la traducción eIF2 α (Kedersha et al., 1999).

La formación de grandes cúmulos de RNP en el citoplasma se ha observado cuando los animales hermafroditas envejecen o se terminan las reservas de espermatozoides y la ovogénesis se detiene (Jud et al., 2007). Dichos complejos contienen RNA mensajeros reprimidos, proteínas de unión a RNA requeridas durante la embriogénesis y proteínas características de los gránulos P como CGH-1 y de los gránulos de estrés como TIA-1.

Además de presentarse cuando se detiene la ovogénesis, estos cúmulos de RNP también pueden ser inducidos por ciertos tipos de estrés en animales jóvenes. En condiciones de anoxia, estrés osmótico o choque de calor se forman los complejos de RNP, aunque para cada condición difieren un poco sus componentes (Jud et al., 2008). Los gránulos observados en los ovocitos de animales sometidos a ayuno podrían ser grandes complejos de RNP, los cuales podrían funcionar como un mecanismo para mantener la integridad y viabilidad de los ovocitos durante un tiempo más prolongado con el fin de resistir la ausencia de nutrientes (Silva y Navarro, datos sin publicar).

En *Drosophila*, durante los primeros estados de la ovogénesis, los ovocitos mueren por apoptosis cuando los animales son sometidos a ayuno (Drummond-Barbosa y Spradling, 2001; Terashima y Bownes, 2004). Normalmente la muerte de las células nodrizas ocurre durante la ovogénesis tardía (Baum et al., 2005; McCall, 2004), pero la apoptosis durante las primeras etapas puede ser inducida por algún tipo de estrés ambiental o por defectos durante el desarrollo. La apoptosis inducida por ayuno conduce a una menor producción de ovocitos con lo cual el número de hijos se reduce (Drummond-Barbosa y Spradling, 2001; Terashima y Bownes, 2004). En muchos nematodos sometidos a ayuno también se observa una menor cantidad de ovocitos maduros (Anexos, Sección III, Figuras 5 y 6), pero no se sabe si también se reduce la descendencia en dichas condiciones de estrés.

5.3 Efecto del silenciamiento de ciertos genes en la descendencia de los animales

Para estudiar la participación de algunos genes en la apoptosis y su relación con la fecundidad de los organismos, se prosiguió a realizar estudios de fertilidad. Se seleccionaron cinco genes: W02D7.6, T05F1.2, F54D10.7, F53A2.5 y D1046.2 con el fin de ver si el incremento en la apoptosis observado en los animales RNAi o su simple silenciamiento tenía un efecto sobre el número de hijos. El RNAi para cuatro de los cinco genes provoca un aumento en la apoptosis fisiológica pero sólo los animales D1046.2 (RNAi) tuvieron una respuesta débil a la apoptosis ocasionada por ayuno.

Se mandaron secuenciar los cinco genes para confirmar su identidad y una vez corroborada se prosiguió a realizar un conteo del número de larvas. También se estudió la letalidad embrionaria en la cual, todos aquellos embriones que al cabo de 24 a 48 horas no eclosionaron fueron considerados como muertos. Debido a que los animales D1046.2 (RNAi) mostraron defectos somáticos, se utilizó la cepa *rrf-1* (ok589) con el propósito de hacer RNAi exclusivamente en la gónada. El gen *rrf-1* codifica para una RNA polimerasa dirigida por RNA (RdRP), la cual es necesaria para llevar a cabo RNAi en el soma, pero no en la línea germinal (Sijen et al., 2001). En el resto de los genes se empleó la cepa silvestre N2 como control y para estudiar el fenotipo en condiciones genéticas normales.

Los animales RNAi para los genes W02D7.6, T05F1.2 y F53A2.5 no tuvieron diferencias significativas en su fertilidad (Figura 22; B), mientras que los animales *rrf-1* (ok589); D1046.2 (RNAi) presentaron una reducción del 27% en su descendencia al compararlo con el control *rrf-1* (ok589); PV (Figura 22; A). Con respecto al número de embriones muertos no hubo diferencias significativas ni en la cepa silvestre (N2) ni en la mutante en el gen *rrf-1* (Anexos, Sección IV.II, Figura 8).

La apoptosis de la línea germinal promueve la distribución adecuada de los recursos en los ovocitos y ayuda a manter la calidad de los mismos. La ausencia de la apoptosis fisiológica acentúa la disminución en la calidad de los ovocitos y esta última puede afectar la fertilidad de los organismos (Andux y Ellis, 2008). Una hipótesis es que los animales *rrf-1* (ok589); D1046.2 (RNAi) tengan un defecto ya

sea en la apoptosis o en el mecanismo de maduración de los ovocitos que altere la calidad de los mismos y esto se vea reflejado en la fertilidad.

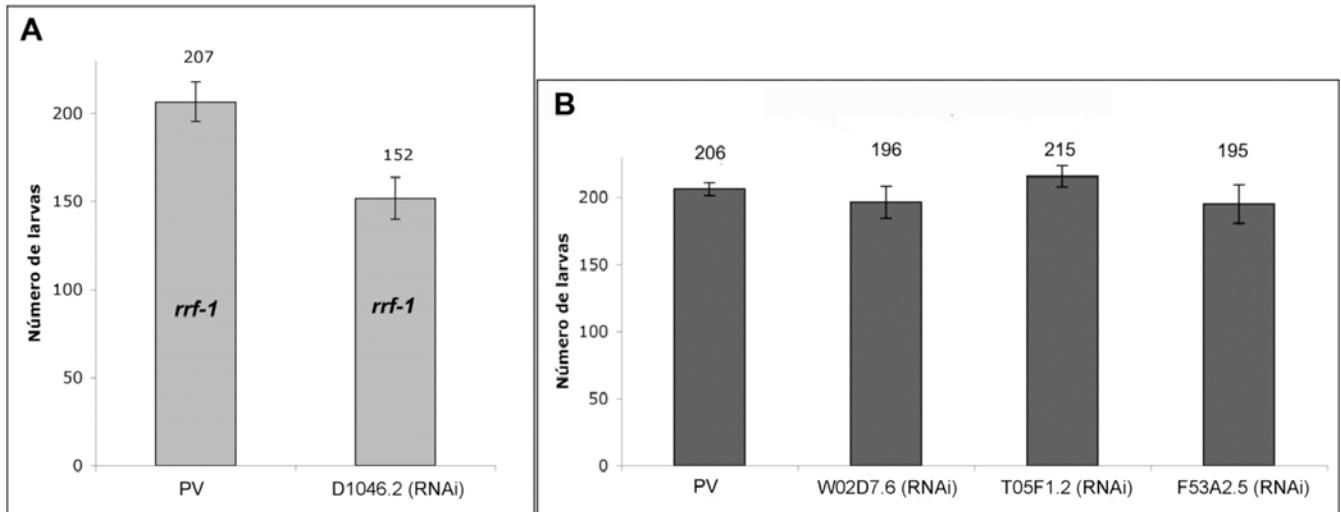


Figura 22: Fertilidad de los animales RNAi en los genes indicados. Las gráficas muestran el promedio de hijos que tienen los animales en condiciones normales de crecimiento **A**: Fertilidad en la mutante en el gen *rrf-1*. Los animales *rrf-1* (ok589); D1046.2 (RNAi) tuvieron una reducción del 27% en su descendencia en comparación con el control (PV). **B**: Descendencia en la cepa silvestre N2 y en los animales RNAi para los genes indicados. No hay diferencias significativas.

Dado que no hubo diferencias en la progeñe en el resto de los animales RNAi, podemos decir que el silenciamiento de los genes no tiene un efecto obvio sobre la gametogéñesis y/o que la apoptosis observada en condiciones normales no afecta la descendencia. No obstante, para confirmar esto se tendría que hacer un conteo de la descendencia en cepas que presenten un exceso de esperma o realizando cruza con animales macho. El animal silvestre produce un número de espermatozoides limitado, aproximadamente 160 por brazo gonadal, por lo que la cantidad de ovocitos fecundados es de alrededor de 300. Sin embargo, los ovocitos se producen en gran cantidad, pues los animales forman alrededor de 1500 células germinales. (Gumienny et al., 1999; Hubbard y Greenstein, 2000). Puesto que la apoptosis sólo ocurre en los ovocitos y los animales tienen un número de espermatozoides restringido, si la apoptosis aumenta un poco, la cantidad de embriones producidos no varía. Es por ello que la diferencia con el control no es significativa, aunque también puede ser que no se observen diferencias debido a que el organismo tiene un mecanismo para compensar la

pérdida de células germinales aumentando la producción de ovocitos o que la calidad de los mismos no este alterada.

De los cinco genes estudiados, se decidió escoger dos de ellos, D1046.2 y T05F1.2, para estudiar su fenotipo. Se seleccionó el gen D1046.2 debido a que muestra una reducción en la fertilidad y tiene la apoptosis fisiológica aumentada, por lo que se resolvió estudiarlo para ver si existe una relación entre ambos fenotipos. Se escogió también el gen T05F1.2 el cual tiene como único fenotipo la apoptosis fisiológica incrementada, con lo cual se decidió estudiarlo más a fondo.

5.4 Los animales D1046.2 (RNAi) tienen problemas durante la meiosis

Con el fin de estudiar la causa de la baja fertilidad en los animales D1046.2 (RNAi) (Figura 22; A) se realizaron tinciones para DAPI y se analizó la morfología de los núcleos de las tres principales regiones de la gónada. La tinción para DAPI permite ver los núcleos para verificar si varía la producción de células germinales y a su vez detectar defectos en la estructura nuclear que indiquen problemas durante la meiosis o la mitosis. Se contaron el número de ovocitos, la cantidad de espermatozoides y las células de tres regiones de la gónada: la región distal o mitótica (RD), la zona de transición (ZT) y la región de paquíteno (PQ) (Figuras 23 y 24). De la región distal se sabe que en promedio tiene unas veinte células a lo largo y la zona de transición tiene una longitud de aproximadamente diez células (Crittenden et al., 2006). Conociendo estos datos es fácil detectar si hay variaciones en el número de células en cada zona de la gónada y con ello localizar cualquier posible defecto. Todos los estudios se realizaron en la cepa *rrf-1* (ok589) pero que nombraremos como animales D1046.2 (RNAi) con el fin de facilitar la lectura.

Los animales RNAi para el gen D1046.2 no tuvieron diferencias significativas en el número de ovocitos ni en la cantidad de espermatozoides (Figura 23), por lo que aparentemente no tienen defectos en el número de células germinales sino en la calidad de las mismas. Una posible explicación es que el silenciamiento de este gen podría afectar la capacidad de los espermatozoides para fertilizar a los ovocitos o que los propios ovocitos no puedan ser fecundados.

Con respecto al análisis de la morfología de los núcleos en mitosis y en meiosis en las tres regiones de la gónada, los animales presentaron diferencias significativas principalmente en la zona de transición. También hubo diferencias en la región distal, aunque éstas no son tan pronunciadas (Anexos, Sección V.I, Figura 9). La región de paquíteno (PQ) no mostró diferencias significativas a pesar de que en la gráfica se observa una ligera baja en el número de células de los animales D1046.2 (RNAi). Tal como se aprecia en la Figura 24, la zona de transición presenta un aumento muy notorio en el número de células. Este fenotipo se puede

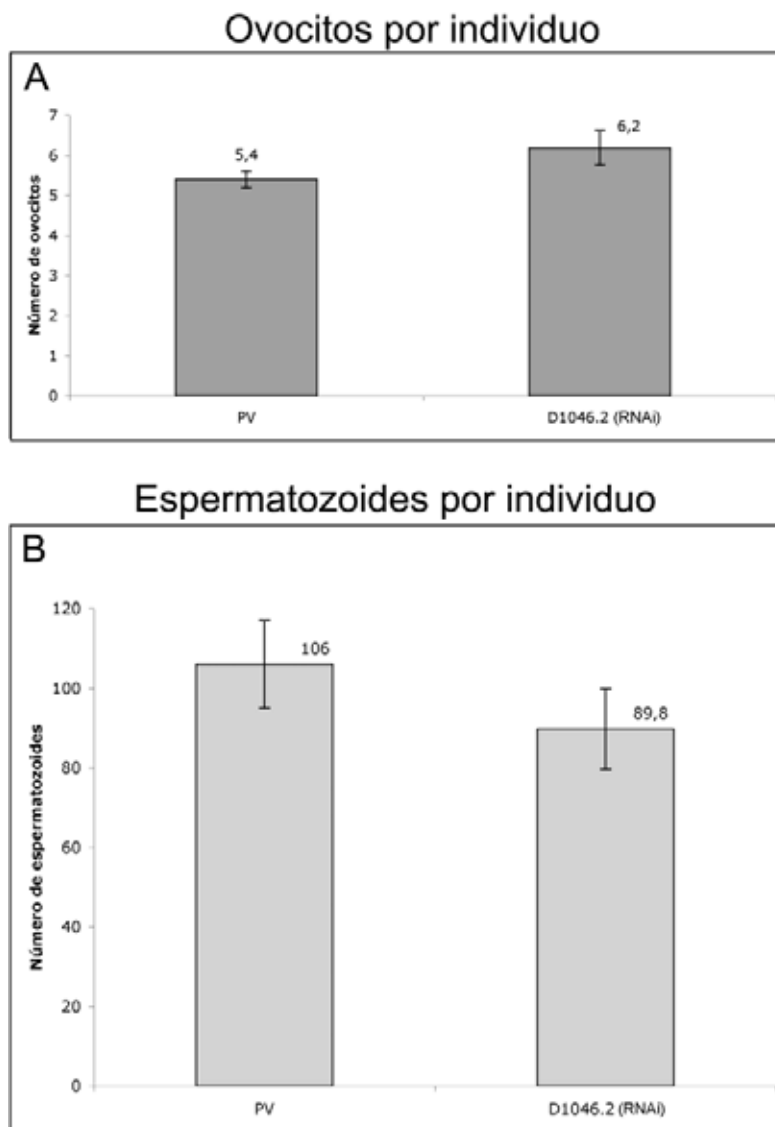


Figura 23: Animales D1046.2 (RNAi) que no tienen defectos en el número de ovocitos ni de espermatozoides. **A:** Gráfica que representa el promedio de ovocitos por individuo de animales

D1046.2 (RNAi) y su control (PV). **B:** Gráfica que muestra el promedio de espermatozoides por individuo de animales RNAi y su respectivo control. El conteo se hizo utilizando la cepa *rrf-1* (ok589) y haciendo una tinción para DAPI. De acuerdo al análisis estadístico no hay diferencias significativas en ninguno de los dos casos.

reconocer en la imágenes de las tinciones para DAPI donde la zona de transición es claramente más larga, además de presentarse núcleos en transición en la región de paquíteno (Figura 25, B).

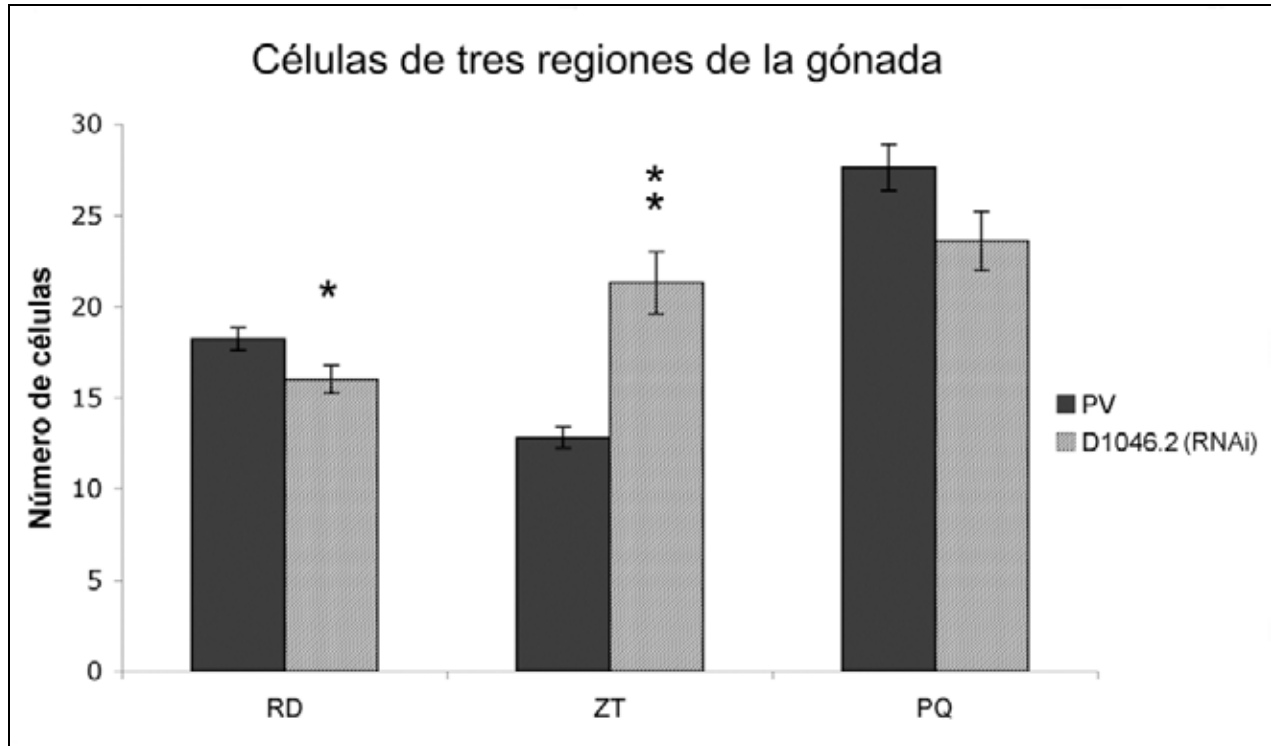


Figura 24: Los animales RNAi en el gen D1046.2 tienen más células germinales en la zona de transición (ZT) sugiriendo un posible defecto en la mitosis o en la meiosis. La gráfica muestra el promedio de células de los animales control (barras gris oscuro) y de los animales RNAi para el gen D1046.2 (barras gris claro), ambos con sus respectivas barras de error. El conteo se realizó en la cepa *rrf-1* (ok589) y haciendo tinciones con DAPI. En dos de las tres regiones analizadas, la región distal (RD) y la zona de transición (ZT), hubo diferencias significativas, principalmente en la zona de transición la cual está marcada con dos asteriscos. La región de paquíteno (PQ) no presentó diferencias significativas aunque se ve una ligera baja en el número de células.

La presencia de una zona de transición larga indica que estos animales presentan anomalías ya sea durante la salida de la mitosis o la entrada a la meiosis. El silenciamiento del gen podría estar afectando alguno de estos procesos influyendo negativamente en la fertilidad del organismo.

Cuando hay defectos durante la mitosis, las células de mamífero activan la vía de muerte por apoptosis conocida como catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu et

al., 2008). Esta muerte se puede inducir cuando hay fallas en los puntos de control de las distintas fases de la mitosis o cuando las células son sometidas a radiación ionizante o a agentes químicos que desestabilizan los microtúbulos. La catástrofe mitótica inducida por fallos en los puntos de control puede generar la duplicación de centrómeros y por tanto la formación de micronúcleos. También se pueden presentar fallos en la condensación de los cromosomas y su alineación en el huso mitótico. Incluso, si las células sobrepasan los puntos de control se pueden generar mecanismos de supervivencia y potenciar por tanto la tumorigénesis (Blank y Shiloh, 2007; Vakifahmetoglu et al., 2008). En *C. elegans*, cuando los factores que regulan la proliferación celular en la región distal no actúan de manera adecuada, como sería el ligando LAG-2, se forma lo que se conoce como un tumor germinal (Kimble y Crittenden, 2005).

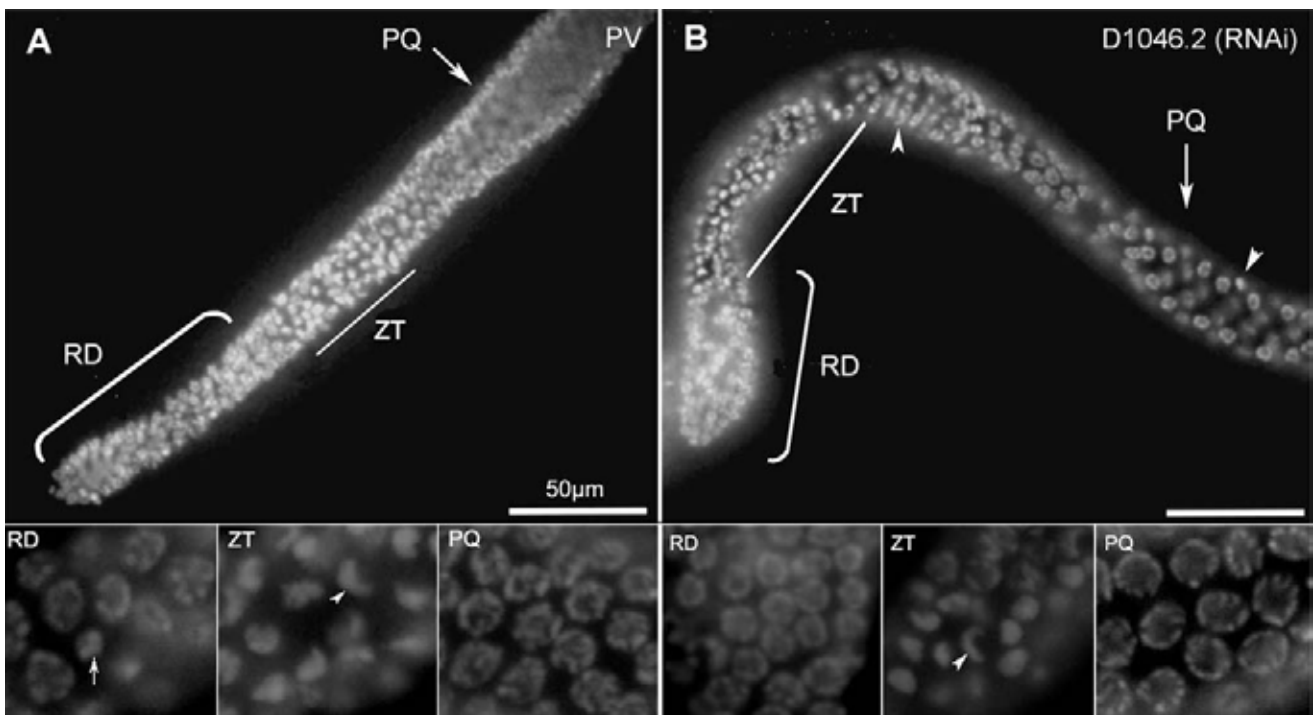


Figura 25: Animales D1046.2 (RNAi) que tienen una zona de transición más larga y presentan núcleos en transición en la región proximal. Las imágenes muestran las gónadas teñidas en las que se puede identificar la región distal (RD), la zona de transición (ZT) y la región de paquíteno (PQ). La zona de transición, la cual se reconoce por los núcleos en forma de media luna, es más larga en los animales RNAi para el gen D1046.2, tal como lo muestra la barra blanca. **A:** Tinción para DAPI de la gónada de animales control. Abajo se muestra el aumento de cada zona de la gónada en donde la flecha señala un núcleo en mitosis y la cabeza de flecha un núcleo en transición con la forma de media luna. La región de paquíteno se caracteriza por presentar núcleos con los cromosomas homólogos alineados y dispersos en la periferia (Altun y Hall, 2006). **B:** Tinción de la gónada de animales D1046.2 (RNAi). Las cabezas de flecha muestran núcleos en transición que se localizan en la región de paquíteno. Abajo se muestran las ampliaciones de cada

región de la gónada donde la cabeza de flecha muestra un núcleo en transición con forma de media luna.

Por otro lado, si las células presentan fallas durante los puntos de control de la meiosis se pueden formar espermatozoides u ovocitos no viables o provocar defectos en la embriogénesis, por lo que la reparación del daño o la muerte por apoptosis podrían evitarlo. Uno de los principales puntos de control se lleva a cabo durante la recombinación entre cromosomas homólogos, proceso que ocurre en la profase I de la meiosis. Durante este proceso se generan rupturas de doble cadena en el DNA que si no son reparadas adecuadamente las células podrían iniciar la cascada apoptótica. En *C. elegans* la apoptosis inducida por un fallo durante la recombinación de cromosomas requiere del gen *cep-1*, el cual se activa en la fase de paquíteno ante el daño al DNA (Gartner et al., 2008; Hochwagen y Amon, 2006).

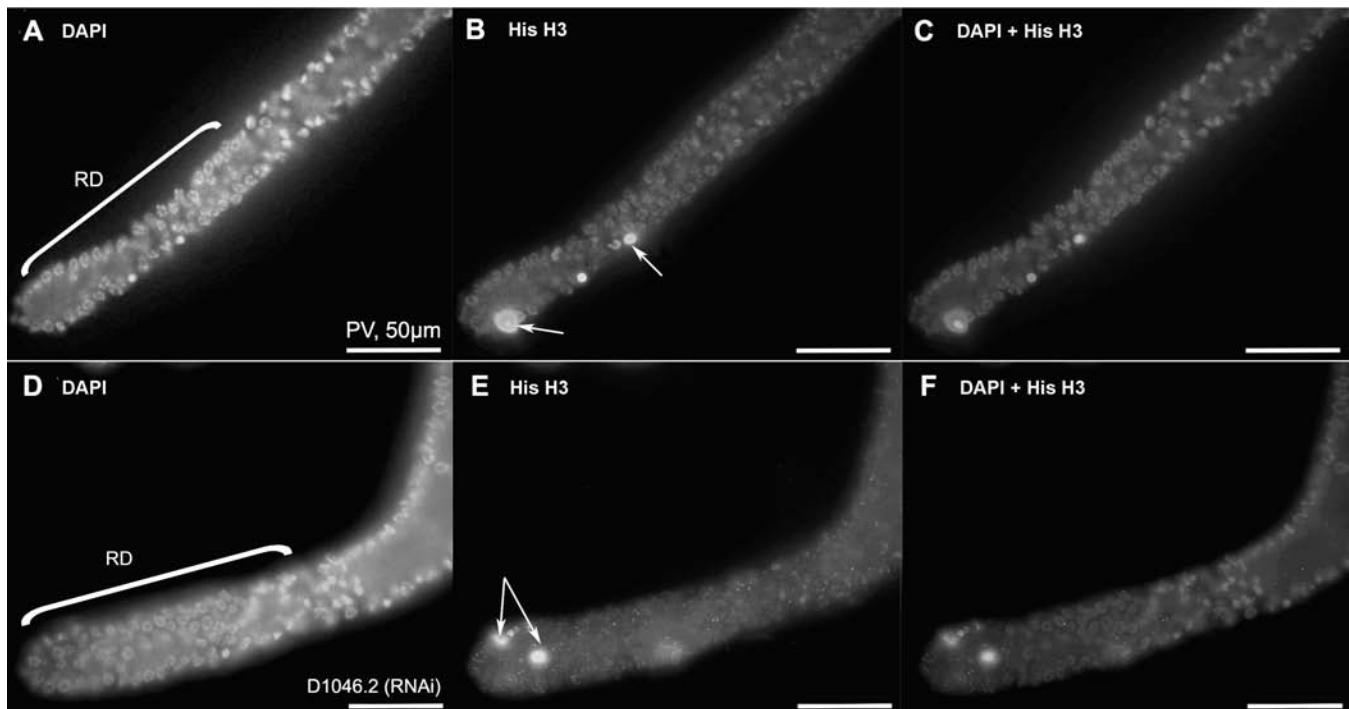


Figura 26: Las gónadas de los animales D1046.2 (RNAi) no presentan problemas evidentes durante la mitosis debido a que las células positivas para la histona H3 se localizan en la región distal. Las imágenes muestran una inmunotinción para la histona H3 fosforilada en animales control y D1026.2 (RNAi). **A, D**: Tinción para DAPI donde se muestra la región distal (RD) de la gónada. **B, E**: Imágenes de fluorescencia para la histona H3 donde está señalado por unas flechas el lugar donde se encuentran las células marcadas positivamente. **C, F**: Colocalización de la tinción para DAPI y para la histona H3.

La apoptosis también se puede inducir cuando la sinapsis entre los cromosomas homólogos no ocurre de manera adecuada durante la fase de cigoteno. Esta apoptosis es activada por medio de un punto de control distinto al inducido por las rupturas de doble cadena durante la recombinación de los cromosomas. Por lo tanto es independiente del gen *cep-1* y requiere de la proteína PCH-2, la cual es fundamental para el control del proceso sináptico entre los cromosomas (Bhalla y Dernburg, 2005).

Para investigar si las células germinales en los animales D1046.2 (RNAi) estaban llevando a cabo bien la mitosis se realizó una tinción para la histona H3 fosforilada. La histona H3 forma parte del octámero protéico que conforma a los nucleosomas. Durante la mitosis y la meiosis la histona es fosforilada en la serina 10 del extremo amino terminal. Esta modificación pos-traduccional es fundamental para la condensación y segregación de los cromosomas durante la división celular. En la mitosis, la fosforilación inicia en la profase, presenta un claro aumento durante la metafase y finalmente decrece en las fases finales de la división celular (Hans y Dimitrov, 2001; Nowak y Corces, 2004).

El anticuerpo reconoce la histona H3 fosforilada, con lo cual se pueden detectar las células que se encuentran en un punto particular de la mitosis y los cromosomas condensados de los ovocitos. Si se encontraran células positivas para la histona H3 en la zona meiótica, los animales estarían presentando un fallo durante la mitosis y podrían estar formando un tumor germinal. Tanto en la gónada de animales control como en la de animales D1046.2 (RNAi) se observaron de 1 a 6 células positivas en la región distal (Figura 26; B y E). Esto demuestra que la mitosis se está llevando a cabo en el lugar adecuado y en un número correcto de células, lo que sugiere que los animales D1046.2 (RNAi) podrían tener problemas en la meiosis.

La gónada de los animales D1046.2 (RNAi) muestra una zona de transición más larga y tiene núcleos en transición en la región de paquiteno. Además, estos animales tienen la apoptosis elevada y una progenie disminuida. La apoptosis observada en los animales RNAi podría ser producida por defectos durante la meiosis lo cual podría explicar la disminución en el número de hijos.

Este fenotipo también se ha observado en animales mutantes para el gen *prom-1* donde los núcleos en las primeras fases de la meiosis no llevan a cabo la sinapsis de los cromosomas homólogos de manera adecuada. La reparación de las rupturas de doble cadena del DNA durante la recombinación de los cromosomas está retrasada. La disminución en la descendencia de estos animales se debe a los problemas meióticos y el aumento de la apoptosis en la línea germinal es dependiente de CEP-1 (Jantsch et al., 2007).

La presencia de los núcleos en transición en la región de paquíteno de los animales D1046.2 (RNAi) sugiere que los núcleos se encuentran en asincronía y que las fases iniciales de la meiosis están retrasadas, afectando también la extensión de la zona de transición (Jantsch et al., 2007).

Si el fallo en la meiosis ocurre durante el proceso de recombinación de los cromosomas homólogos, se podría estar induciendo la apoptosis por medio del gen *cep-1* (p53) ante el daño al DNA (Gartner et al., 2008; Hochwagen y Amon, 2006). Suponiendo lo anterior, la activación de CEP-1 podría ser la causa del incremento observado en la apoptosis de los animales, enmascarando así la muerte fisiológica estudiada.

Otra explicación podría ser que los fallos durante la meiosis ocurrieran durante la sinapsis de los cromosomas homólogos, entonces se podría estar activando la apoptosis a través de otro punto de control independiente de CEP-1 (Bhalla y Dernburg, 2005). El aumento en la apoptosis fisiológica observado en los animales RNAi podría tratarse de un mecanismo para evitar la formación de células germinales aneuploides generadas por defectos durante la sinapsis de los cromosomas. Esto podría ser la causa del bajo número de hijos que tienen estos animales.

5.5 Los animales T05F1.2 (RNAi) tienen la apoptosis fisiológica aumentada

Decidimos estudiar el fenotipo de los animales T05F1.2 (RNAi) para ver si la apoptosis observada tiene un efecto sobre la fertilidad de los mismos. Los animales T05F1.2 (RNAi) no tuvieron variaciones en la descendencia ni presentaron defectos morfológicos en la gónada en condiciones normales de

crecimiento (Figura 22; B y Figura 15; A y C). No obstante, muestran un aumento significativo en la apoptosis fisiológica (Figura 11) por lo que se nos hizo interesante estudiarlo. Se analizó la morfología de la gónada haciendo tinciones para DAPI (Figura 27) para estudiar las tres principales regiones de la gónada y se hizo un conteo del número de ovocitos y de espermatozoides.

Los animales RNAi para el gen T05F1.2 muestran diferencias significativas en el número de ovocitos (Anexos Sección V.I, Figura 9), aunque estas no son relevantes dado que el número de ovocitos en un animal adulto es de 6 a 7 ovocitos por brazo gonadal. En cuanto al número de de espermatozoides no hubo diferencias significativas (Figura 28) y tampoco en las tres regiones de la gónada analizadas (Figura 29). Por lo tanto, el incremento en la apoptosis no parece que esté afectando el número de células germinales ni posibles procesos durante la meiosis o la mitosis. Tampoco parece ser que la fecundación esté alterada, pues el número de hijos no decrece, aunque se necesitaría hacer cruza con el fin de incrementar la cantidad de espermatozoides y extender el tiempo de reproducción (Bhalla y Dernburg, 2005).

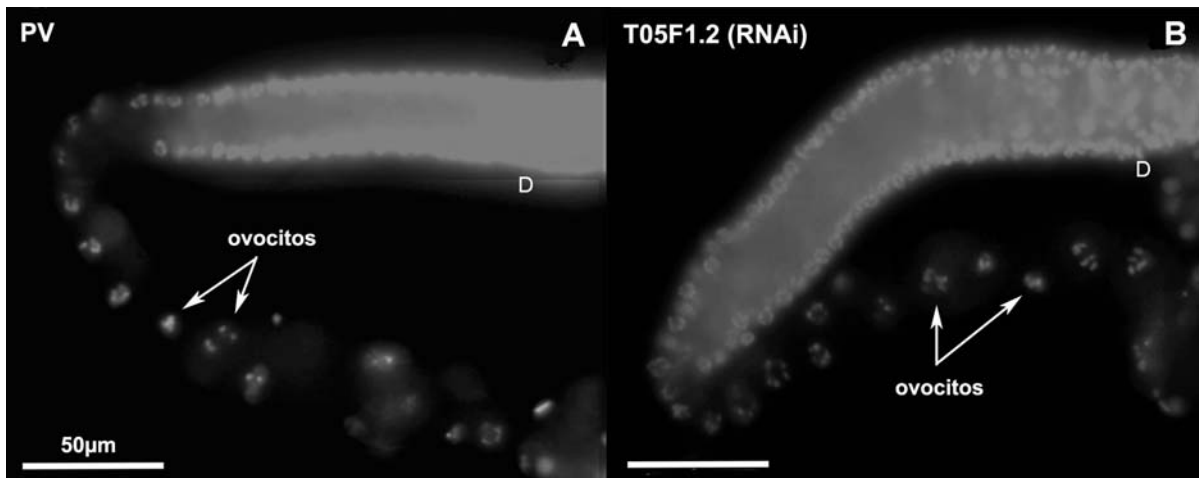


Figura 27: Morfología de la gónada de animales T05F1.2 (RNAi) mantenidos en condiciones normales de crecimiento. **A:** Imágenes de microscopía de fluorescencia de la gónada teñida con DAPI de animales control. **B:** Microscopía de fluorescencia de animales RNAi para el gen T05F1.2. En ambas fotos se muestra una gónada completa donde se señala la región proximal con los ovocitos indicados por una flecha y la región más distal de la gónada denotada por una D.

A pesar de todo, los animales tienen la apoptosis fisiológica aumentada por lo que el gen T05F1.2 podría ser sumamente específico de este tipo de apoptosis. Además se sabe que se expresa en la región media de la gónada, región que

comprende el asa de la gónada donde se observan los cuerpos apoptóticos. Es por ello que podría estar participando en alguna vía que promoviera la supervivencia celular de los ovocitos de manera directa o indirecta. De acuerdo con la base de datos para el *C. elegans* (<http://www.wormbase.org/>, liberado en diciembre 2008, WS197) se predice que el gen T05F1.2 interactúa con una gran cantidad de proteínas entre las cuales se encuentra el gen *mom-2* (F38E1.7). Este gen forma parte de la familia de Wnt y en este estudio no pudo ser analizado debido a que el RNAi provoca letalidad embrionaria y esterilidad en los animales (Anexos, Sección I.I, Figura 1).

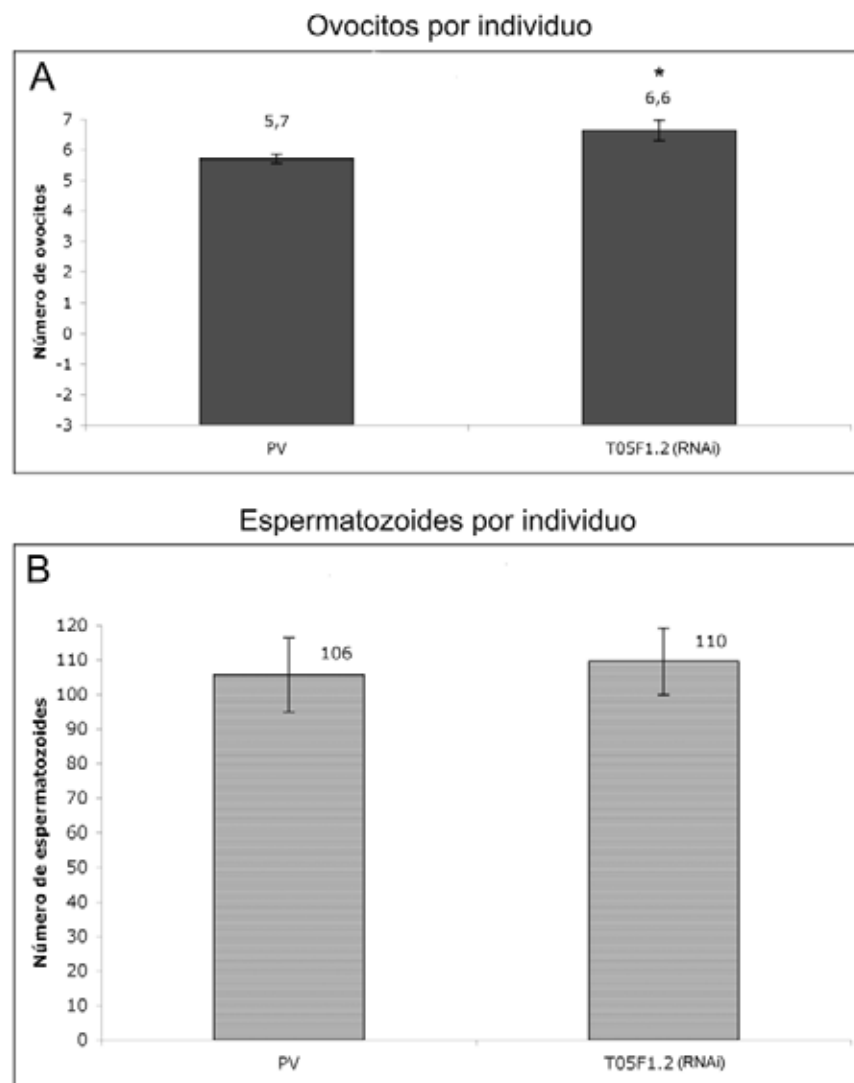


Figura 28: Animales T05F1.2 (RNAi) que muestran una leve diferencia en el número de ovocitos. **A:** Gráfica que representa el promedio de ovocitos por individuo en animales RNAi para el gen T05F1.2 y el control (PV). **B:** Gráfica que muestra el promedio de espermatozoides por individuo en animales RNAi para el gen T05F1.2 y el control. No hay diferencias significativas en el número

de espermatozoides. El conteo se hizo utilizando la cepa N2 y haciendo una tinción para DAPI. De acuerdo al análisis estadístico hay diferencias significativas en el número de ovocitos tal como lo marca el asterisco, aunque estas no son relevantes debido a que los animales adultos tienen entre 6 y 7 ovocitos por brazo gonadal.

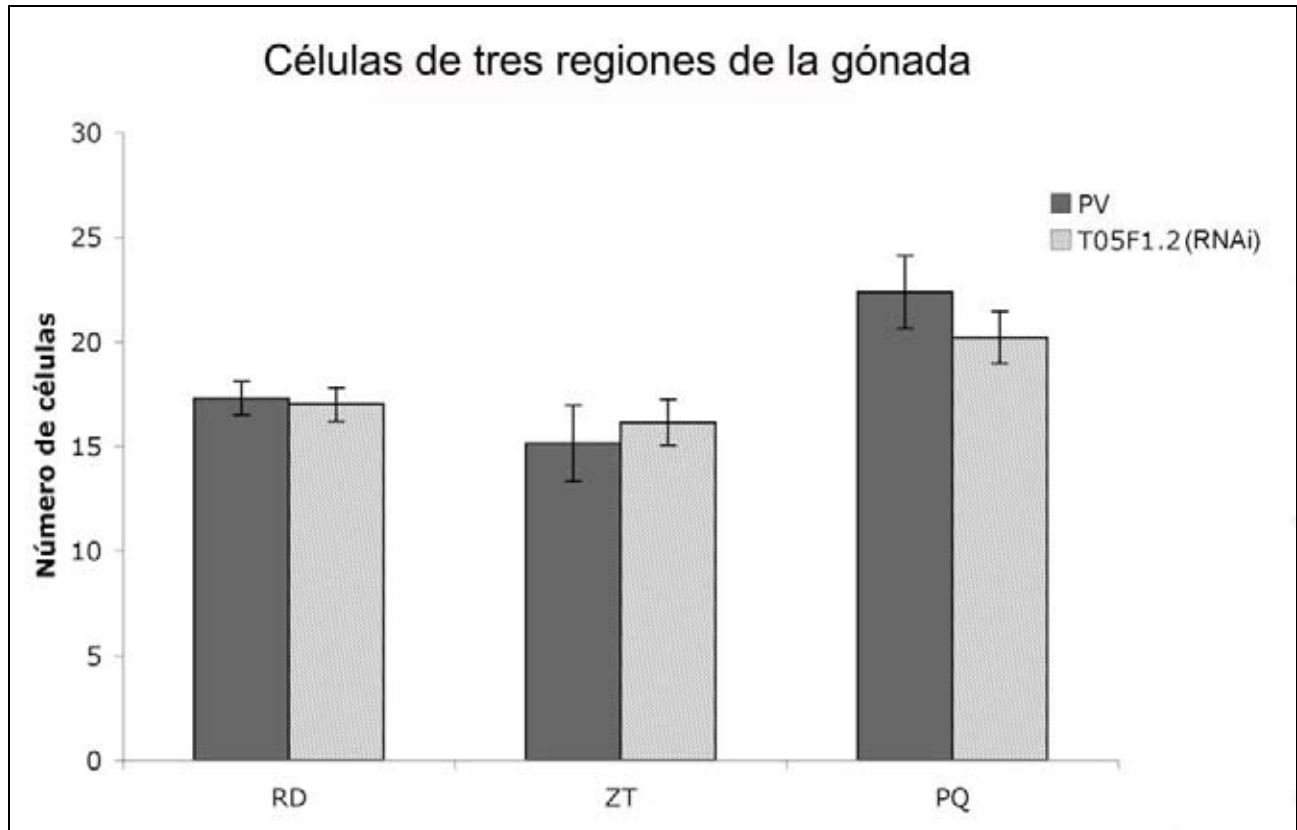


Figura 29: Los animales T05F1.2 (RNAi) no tienen diferencias significativas en las tres regiones de la gónada. Se muestra el promedio de células de la región distal (RD), la zona de transición (ZT) y la región de paquíteno (PQ) de los animales control (barras gris oscuro) y de los animales RNAi para el gen (barras gris claro). De acuerdo al análisis estadístico, no hay diferencias significativas en ninguna de las tres regiones. El conteo se hizo empleando la cepa silvestre N2 y haciendo una tinción para DAPI.

6. DISCUSIÓN GENERAL

La apoptosis inducida por ayuno y la apoptosis fisiológica están sumamente relacionadas puesto que comparten algunas características. Ambas ocurren únicamente en la gónada del hermafrodita adulto y son independientes de los genes *cep-1* y *egl-1*. Por lo tanto se cree que el ayuno está provocando una muerte apoptótica del tipo fisiológica (Gartner et al., 2008; Salinas et al., 2006). No obstante, el ayuno es un tipo de estrés ambiental que también puede ocasionar la muerte por autofagia. Este tipo de muerte inicia cuando los nutrientes básicos se encuentran ausentes (Mizushima, 2007) y la célula comienza a degradar proteínas de larga vida media y organelos, manteniendo el citoesqueleto y el DNA intacto hasta las últimas fases de la muerte (Klionsky, 2007; Levine y Klionsky, 2004). Este mecanismo se activa como una vía de supervivencia ante condiciones de estrés. La autofagia está muy relacionada con la apoptosis y la necrosis, e incluso se ha propuesto como un mecanismo previo a la muerte celular por apoptosis (Galluzzi et al., 2008). Por lo tanto, podría ser que las células germinales presentaran de manera inicial características autofágicas que se tornaran en apoptóticas una vez que los nutrientes fueran insuficientes. Sin embargo, esto no se ha estudiado todavía y los cuerpos apoptóticos observados en la cepa *ced-1::gfp* no se detectan al eliminar la caspasa (CED-3), lo cual asegura que es una muerte por apoptosis.

De los genes estudiados, algunos de ellos participan tanto en la apoptosis fisiológica como en la inducida por ayuno, lo cual sugiere que ambas vías están conectadas en algún punto. Otros únicamente participan en alguna de las dos formas de apoptosis, por lo que pueden ser genes específicos y sería interesante estudiarlos más a fondo.

Entre los fenotipos observados en los nematodos está la presencia de ovocitos granulados en condiciones de ayuno como ocurre en los animales D1046.2 (RNAi) o T05F1.2 (RNAi), pero se desconoce qué tipo de gránulos son. De acuerdo con estudios recientes realizados en el laboratorio, la proteína C18A3.5, homóloga a la proteína de mamífero TIA-1, es un componente de los gránulos de estrés (SG). Los animales mutantes para el gen C18A3.5 no forman

gránulos de estrés en el corazón de la gónada de los animales y no hay una inducción de la apoptosis en condiciones de ayuno. Es por ello que se cree que la proteína participa en el ensamblaje de los gránulos y que de alguna manera induce la apoptosis en condiciones de estrés, aunque puede ser que ambas funciones sean independientes. No obstante, pueden estar relacionadas si la carencia prolongada de nutrientes provoca la desintegración de los gránulos y que esto sea una señal que active la cascada apoptótica. Otra hipótesis es que aquellas células que no contienen los componentes adecuados en los gránulos entren en apoptosis con el fin de solventar la formación de ovocitos defectuosos (Silva y Navarro, datos sin publicar). En los animales RNAi estudiados, un fenotipo frecuente son los cambios en el citoplasma como son la presencia de ovocitos granulados y el citoplasma concentrado hacia el núcleo. Este tipo de fenotipos sugieren que ciertos componentes del citoplasma deben de permanecer intactos para que se produzcan ovocitos viables o de lo contrario son eliminados por apoptosis.

Los fenotipos observados en animales RNAi podrían ser mucho más evidentes en animales mutantes. Esto se debe a la penetrancia del RNA de interferencia sobre el organismo. La penetrancia se define como el porcentaje de individuos con un cierto genotipo que exhiben el fenotipo asociado a dicho genotipo. Es una manera de cuantificar la modificación de la expresión génica al variar el ambiente y el contenido genético (Griffiths et al., 1999). Dado que el RNAi actúa a nivel de RNA mensajero, la penetrancia es menor que en una mutante.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudiaron 25 genes utilizando la técnica de RNAi para analizar su posible participación en la apoptosis inducida por ayuno y en la apoptosis fisiológica. Del estudio se obtuvo que once genes participan en la muerte fisiológica y cinco de ellos en la apoptosis provocada por ayuno (Figura 30). Los animales T05F1.2 (RNAi) no mostraron ningún fenotipo en la gónada y tuvieron un número normal de hijos. No obstante, tienen la apoptosis fisiológica muy aumentada, con lo cual podría tratarse de un gen que participara en este tipo de apoptosis. Con el fin de estudiarlo más a fondo, se podrían hacer inmunotinciones para ver si efectivamente se está expresando en las células en apoptosis o ensayos de doble híbrido para ver si interactúa con alguna proteína relacionada con la apoptosis. Asimismo, sería interesante obtener una mutante en este gen para continuar con los estudios.

Por otro lado, los animales D1046.2 (RNAi) tuvieron la apoptosis fisiológica aumentada y no presentaron una respuesta a la apoptosis inducida por ayuno. Los animales RNAi para este gen tienen una zona de transición más larga que parece indicar problemas en la meiosis y también se observa una descendencia reducida. Sin embargo, hay que recalcar que el gen también participa a nivel somático, puesto que los animales D1046.2 (RNAi) tuvieron defectos somáticos. A pesar de no ser un gen específico de la línea germinal podría ser interesante para estudiar la relación entre la apoptosis fisiológica y la inducida por ayuno. También sería interesante estudiar qué defecto está ocurriendo durante la meiosis y qué vía de regulación de la apoptosis se está activando.

	Nombre	Proteína reportada	Respuesta a la apoptosis		Fenotipo RNAi observado	
			Fisiológica	Ayuno	Condiciones normales	Ayuno
	Control	-----	+	-	----	Menos ovocitos
	1 C27A2.6	DSH-2, Dishevelled.	-	●	Gónada pequeña, cabeza y cola deforme.	Menos ovocitos
	2 T01C3.9	Proteína desconocida.	-	-	----	----
	3 C39E9.11	Proteína de punto de control mitótico.	-	●	----	----
	4 ZK154.7	ADM-4, proteína de la familia ADAM.	-	-	----	Ovocitos con huecos en el citoplasma, menos ovocitos.
	5 K06G5.2	CYP-13B2, proteína de la familia de los citocromos P450.	+	-	----	----
	6 F48D6.1	TAF-11, factor de iniciación de la transcripción TFIID	-	-	----	----
	7 W06H3.2	PUS-1, tRNA pseudouridina sintasa mitocondrial.	-	-	----	----
Menor expresión	8 C56G3.2	Proteína de la familia de las aldo/ceto reductasas.	+	-	----	Menos ovocitos
	9 F20D1.4	Regulador transcripcional de la familia PUR.	-	-	----	Menos ovocitos
	10 W02D7.6	Proteína con dominio de dedo de zinc del tipo C2H2.	+	-	----	Menos ovocitos
	11 Y54G11A.2	Proteína desconocida.	+	-	----	----
	12 F54D10.7	Proteína desconocida.	+	-	----	----
	13 F40F8.9	ISM-1 (LSM Sm-like prot.), factor de splicing nuclear.	-	-	----	Menos ovocitos
	14 T05F1.2	Proteína de la línea germinal.	+	-	----	Citoplasma concentrado hacia el núcleo y ovocitos granulosos.
	15 ZC302.2	Proteína con repetidos WD40.	+	-	----	----
	16 T02C12.3	Subunidad del factor de transcripción IIIC de la RNA pol III.	+	●	Cuerpos apoptóticos en la región proximal.	Ovocitos pequeños y huecos en el citoplasma.
	17 T08G5.5	VPS-39, internalización de cuerpos apoptóticos.	+	-	Acumulación de cuerpos apoptóticos.	
18 F38E1.7	MOM-2, miembro de la familia Wnt, ligando de LIN-18.	-	-	----	----	
19 C50F2.3	Factor de splicing.	-	-	----	----	
20 F53F4.11	Proteína ribosomal.	-	-	----	----	

Mayor expresión	21	C01F1.6	Proteína con dominios de anquirina.	-	-	----	----
	22	F46F11.7	Proteína desconocida.	+	●	----	----
	23	D1046.2	Proteína con dominio de dedo de zinc tipo C2H2.	+	●	Zona de transición larga, problemas durante la meiosis.	Ovocitos granulosos y pequeños.
	24	F53A2.5	DRO-1, proteína con dominio de factor de transcripción.	-	-	----	----
	25	Y41C4A.10	ELB-1, elongina B, factor de elongación de la transcripción de la RNA pol-II.	-	-	Ausencia de gónada, animales más delgados, vulva protuberante.	

Figura 30: Tabla que resume los resultados obtenidos. Del lado izquierdo se encuentra enlistado el nombre de los genes que tienen una menor y mayor expresión en ausencia de comida. Asimismo está descrita la proteína para la cual codifica de acuerdo a la base de datos de *C. elegans*. Por otro lado, se encuentra tabulada la respuesta de la apoptosis tanto en condiciones fisiológicas como de ayuno. Todos aquellos genes que al ser silenciados provocan un aumento en la apoptosis fisiológica están marcados por el símbolo de más (+). Del mismo modo, los genes que participan en la apoptosis inducida por ayuno se encuentran marcados por un punto negro (●). Del lado derecho se encuentra tabulado el fenotipo observado en los animales RNAi tanto en condiciones normales de crecimiento como de ayuno.

Asimismo, sería interesante ver si la descendencia disminuye en condiciones de ayuno, tal como ocurre en *Drosophila* (Drummond-Barbosa y Spradling, 2001; Terashima y Bownes, 2004) y estudiar la gónada para ver si se presentan los mismos defectos que en condiciones normales. Además, se pueden hacer otras inmunotinciones para ver si los gránulos observados en los ovocitos son gránulos de estrés.

Para entender la apoptosis fisiológica todavía se requieren hacer muchos estudios, pero haciendo un sondeo, donde se emplee la técnica de RNAi, se pueden encontrar algunos genes que participen en esta vía. Este tipo de introspecciones que emplean modelos biológicos sencillos como el *C. elegans* permiten ir descifrando poco a poco el misterio que representa la muerte por apoptosis en las células germinales de diversos organismos.

REFERENCIAS

- Aballay, A., Ausubel, F. M. (2001). Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects Caenorhabditis elegans from Salmonella typhimurium-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 2735-9.
- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R., and Ausubel, F. M. (2003). Caenorhabditis elegans innate immune response triggered by Salmonella enterica requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr Biol* **13**, 47-52.
- Adams, J. M., Cory, S. (2002). Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 715-20.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., and Mukherjee, S. K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 657-85.
- Alexander, W. A., Moss, B., and Fuerst, T. R. (1992). Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the Escherichia coli lac repressor. *J Virol* **66**, 2934-42.
- Altun, Z. F., Hall, D.H. (2006). "Handbook of C. elegans hermaphrodite anatomy." Worm Atlas.
- Andux, S., Ellis, R. E. (2008). Apoptosis maintains oocyte quality in aging Caenorhabditis elegans females. *PLoS Genet* **4**, e1000295.
- Ballon, D. R., Flanary, P. L., Gladue, D. P., Konopka, J. B., Dohlman, H. G., and Thorner, J. (2006). DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell* **126**, 1079-93.
- Baum, J. S., St George, J. P., and McCall, K. (2005). Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 245-59.
- Bhalla, N., Dernburg, A. F. (2005). A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in Caenorhabditis elegans. *Science* **310**, 1683-6.
- Blank, M., Shiloh, Y. (2007). Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* **6**, 686-95.
- Boag, P. R., Nakamura, A., and Blackwell, T. K. (2005). A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in C. elegans. *Development* **132**, 4975-86.
- Böttger, A., Alexandrova, O. (2007). Programmed cell death in Hydra. *Semin Cancer Biol* **17**, 134-46.
- Brenner, S. (1974). The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics* **77**, 71-94.
- Brusca, R. C., Brusca, Gary J. . (2002). "Invertebrates." Sinauer Associates, Inc., Publisher, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Buszczak, M., Cooley, L. (2000). Eggs to die for: cell death during Drosophila oogenesis. *Cell Death Differ* **7**, 1071-4.
- Chang, W., Lloyd, C. E., and Zarkower, D. (2005). DSH-2 regulates asymmetric cell division in the early C. elegans somatic gonad. *Mech Dev* **122**, 781-9.
- Chefson, A., Auclair, K. (2006). Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Mol Biosyst* **2**, 462-9.
- Chi, N., Epstein, J. A. (2002). Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* **18**, 41-7.

- Chi, W., Reinke, V. (2006). Promotion of oogenesis and embryogenesis in the C. elegans gonad by EFL-1/DPL-1 (E2F) does not require LIN-35 (pRB). *Development* **133**, 3147-57.
- Conradt, B., Xue, D. (2005). Programmed cell death. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-13.
- Contreras, V., Richardson, M. A., Hao, E., and Keiper, B. D. (2008). Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in C. elegans. *Cell Death Differ* **15**, 1232-42.
- Crittenden, S. L., Leonhard, K. A., Byrd, D. T., and Kimble, J. (2006). Cellular analyses of the mitotic region in the Caenorhabditis elegans adult germ line. *Mol Biol Cell* **17**, 3051-61.
- Cui, M., Kim, E. B., and Han, M. (2006). Diverse chromatin remodeling genes antagonize the Rb-involved SynMuv pathways in C. elegans. *PLoS Genet* **2**, e74.
- Drummond-Barbosa, D., Spradling, A. C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis. *Dev Biol* **231**, 265-78.
- Ellis, R., Schedl, T. (2007). Sex determination in the germ line. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-13.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature* **391**, 806-11.
- Galluzzi, L., Joza, N., Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Hengartner, M., Abrams, J. M., Tavernarakis, N., Penninger, J., Madeo, F., and Kroemer, G. (2008). No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ*.
- Gartner, A., Boag, P. R., and Blackwell, T. K. (2008). Germline survival and apoptosis. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-20.
- Geles, K. G., Adam, S. A. (2001). Germline and developmental roles of the nuclear transport factor importin alpha3 in C. elegans. *Development* **128**, 1817-30.
- Gilbert, S. F. (2006). "Developmental Biology." Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Gönczy, P., Rose, L. S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-20.
- Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch signaling in C. elegans. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-16.
- Greenwood, J., Gautier, J. (2005). From oogenesis through gastrulation: developmental regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 215-24.
- Griffiths, A. J. F., Miller, Jeffrey H., Suzuki, David T., Lewontin, Richard C., Gelbart, William M. (1999). "Introduction to Genetic Analysis." W. H. Freeman & Co., New York.
- Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in Caenorhabditis elegans. *FEBS Lett* **579**, 5932-9.
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartweg, E., Horvitz, H. R., and Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. *Development* **126**, 1011-22.

- Hans, F., Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* **20**, 3021-7.
- Hasegawa, E., Karashima, T., Sumiyoshi, E., and Yamamoto, M. (2006). C. elegans CPB-3 interacts with DAZ-1 and functions in multiple steps of germline development. *Dev Biol* **295**, 689-99.
- Herman, M. A. (2006). Hermaphrodite cell-fate specification. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-16.
- Hochwagen, A., Amon, A. (2006). Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Curr Biol* **16**, R217-28.
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-19.
- Hubbard, E. J., D., Greenstein. (2000). The Caenorhabditis elegans gonad: a test tube for cell and developmental biology. *Dev Dyn* **218**, 2-22.
- Iuchi, S. (2001). Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol Life Sci* **58**, 625-35.
- Jantsch, V., Tang, L., Pasierbek, P., Penkner, A., Nayak, S., Baudrimont, A., Schedl, T., Gartner, A., and Loidl, J. (2007). Caenorhabditis elegans prom-1 is required for meiotic prophase progression and homologous chromosome pairing. *Mol Biol Cell* **18**, 4911-20.
- Jarriault, S., Greenwald, I. (2005). Evidence for functional redundancy between C. elegans ADAM proteins SUP-17/Kuzbanian and ADM-4/TACE. *Dev Biol* **287**, 1-10.
- Jud, M., Razelun, J., Bickel, J., Czerwinski, M., and Schisa, J. A. (2007). Conservation of large foci formation in arrested oocytes of Caenorhabditis nematodes. *Dev Genes Evol* **217**, 221-6.
- Jud, M. C., Czerwinski, M. J., Wood, M. P., Young, R. A., Gallo, C. M., Bickel, J. S., Petty, E. L., Mason, J. M., Little, B. A., Padilla, P. A., and Schisa, J. A. (2008). Large P body-like RNPs form in C. elegans oocytes in response to arrested ovulation, heat shock, osmotic stress, and anoxia and are regulated by the major sperm protein pathway. *Dev Biol* **318**, 38-51.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol* **147**, 1431-42.
- Kercher, M. A., Lu, P., and Lewis, M. (1997). Lac repressor-operator complex. *Curr Opin Struct Biol* **7**, 76-85.
- Kim, D. H., Liberati, N. T., Mizuno, T., Inoue, H., Hisamoto, N., Matsumoto, K., and Ausubel, F. M. (2004). Integration of Caenorhabditis elegans MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10990-4.
- Kimble, J., Crittenden, S. L. (2005). Germline proliferation and its control. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, Wormbook, 1-14.
- Kimble, J., Crittenden, S. L. (2007). Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in Caenorhabditis elegans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 405-33.
- Kinchen, J. M., Doukoumetzidis, K., Almendinger, J., Stergiou, L., Tosello-Trampont, A., Sifri, C. D., Hengartner, M. O., and Ravichandran, K. S.

- (2008). A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* **10**, 556-66.
- Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**, 7-18.
- Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 931-7.
- Kourtis, N., Tavernarakis, N. (2007). Non-developmentally programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Semin Cancer Biol* **17**, 122-33.
- Kritikou, E. A., Milstein, S., Vidalain, P. O., Lettre, G., Bogan, E., Doukometzidis, K., Gray, P., Chappell, T. G., Vidal, M., and Hengartner, M. O. (2006). *C. elegans* GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival. *Genes Dev* **20**, 2279-92.
- Lettre, G., Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 97-108.
- Lettre, G., Kritikou, E. A., Jaeggi, M., Calixto, A., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., and Hengartner, M. O. (2004). Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death Differ* **11**, 1198-203.
- Levine, B., Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**, 463-77.
- Lodish H., B. A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J. (2004). "Molecular Cell Biology." W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Lossi, L., Gambino, G. (2008). Apoptosis of the cerebellar neurons. *Histol Histopathol* **23**, 367-80.
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J., and Wickens, M. (2000). CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev* **14**, 2596-609.
- Maldonado, E., Navarro, R. (2007). "Apoptosis lessons from a tiny little worm: *Caenorhabditis elegans*." Research Signpost, Kerala, India.
- Maruyama, R., Endo, S., Sugimoto, A., and Yamamoto, M. (2005). *Caenorhabditis elegans* DAZ-1 is expressed in proliferating germ cells and directs proper nuclear organization and cytoplasmic core formation during oogenesis. *Dev Biol* **277**, 142-54.
- McCall, K. (2004). Eggs over easy: cell death in the *Drosophila* ovary. *Dev Biol* **274**, 3-14.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861-73.
- Morita, Y., Tilly, J. L. (1999). Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* **213**, 1-17.
- Nance, J., Lee, J. Y., and Goldstein, B. (2005). Gastrulation in *C. elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 1-13.
- Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., Singson, A., and Blackwell, T. K. (2001). cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development* **128**, 3221-32.

- Nowak, S. J., Corces, V. G. (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* **20**, 214-20.
- Okkema, P. G., Krause, M. (2005). Transcriptional regulation. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 1-40.
- Otori, M., Karashima, T., and Yamamoto, M. (2006). The *Caenorhabditis elegans* homologue of deleted in azoospermia is involved in the sperm/oocyte switch. *Mol Biol Cell* **17**, 3147-55.
- Park, D., Jia, H., Rajakumar, V., and Chamberlin, H. M. (2006). Pax2/5/8 proteins promote cell survival in *C. elegans*. *Development* **133**, 4193-202.
- Petrie, A., Sabin, Caroline. (2000). "Medical Statistics at a Glance." Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
- Ploegh, H. L., van der Voorn, Loesje. (1992). The WD-40 repeat. *FEBS* **307**, 131-134.
- Reddien, P. W., Andersen, E. C., Huang, M. C., and Horvitz, H. R. (2007). DPL-1 DP, LIN-35 Rb and EFL-1 E2F act with the MCD-1 zinc-finger protein to promote programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **175**, 1719-33.
- Reddien, P. W., Horvitz, H. R. (2004). The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 193-221.
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. (1997). "*C. elegans*." Cold Spring Laboratory Press,
- Salinas, L. S., Maldonado, E., and Navarro, R. E. (2006). Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* **13**, 2129-39.
- Schertel, C., Conradt, B. (2007). *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development* **134**, 3691-701.
- Schierenberg, E. (2006). Embryological variation during nematode development. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 1-13.
- Schumacher, B., Hofmann, K., Boulton, S., and Gartner, A. (2001). The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* **11**, 1722-7.
- Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., Tuck, S., Mitani, S., Gartner, A., Conradt, B., and Shaham, S. (2005). *C. elegans* ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death Differ* **12**, 153-61.
- Schwarz-Romond, T., Fiedler, M., Shibata, N., Butler, P. J., Kikuchi, A., Higuchi, Y., and Bienz, M. (2007). The DIX domain of Dishevelled confers Wnt signaling by dynamic polymerization. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 484-92.
- Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T., and Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9402-7.
- Semotok, J. L., Lipshitz, H. D. (2007). Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early *Drosophila* development. *Differentiation* **75**, 482-506.

- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K. L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R. H., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* **107**, 465-76.
- Silva, C., Navarro, R. (datos sin publicar).
- Simms, T. A., Dugas, S. L., Gremillion, J. C., Ibos, M. E., Dandurand, M. N., Toliver, T. T., Edwards, D. J., and Donze, D. (2008). TFIIIC binding sites function as both heterochromatin barriers and chromatin insulators in *S. cerevisiae*. *Eukaryot Cell*.
- Stergiou, L., Hengartner, M. O. (2004). Death and more: DNA damage response pathways in the nematode *C. elegans*. *Cell Death Differ* **11**, 21-8.
- Strome, S. (2005). Specification of the germ line. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 1-10.
- Terashima, J., Bownes, M. (2004). Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **167**, 1711-9.
- Timmons, L., Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Timmons, L. D. (2007). ABC transporters and RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *J Bioenerg Biomembr* **39**, 459-63.
- Tonikian, R., Zhang, Y., Sazinsky, S. L., Currell, B., Yeh, J. H., Reva, B., Held, H. A., Appleton, B. A., Evangelista, M., Wu, Y., Xin, X., Chan, A. C., Seshagiri, S., Lasky, L. A., Sander, C., Boone, C., Bader, G. D., and Sidhu, S. S. (2008). A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS Biol* **6**, e239.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., and Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**, 1153-62.
- Venegas, V., Zhou, Z. (2007). Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **18**, 3180-92.
- Wolke, U., Jezuit, E. A., and Priess, J. R. (2007). Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development* **134**, 2227-36.
- Yochem, J. K. (2006). Nomarski images for learning the anatomy, with tips for mosaic analysis. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, 1-47.
- Yu, H. (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell* **27**, 3-16.
- Zhou, Z., Hartweg, E., and Horvitz, H. R. (2001). CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*. *Cell* **104**, 43-56.

<http://www.wormbase.org/> (liberado diciembre 2008, WS197)

<http://www.wormatlas.org/> (actualizado noviembre 2008)

ANEXOS

I. DESCRIPCIÓN DE LOS GENES ESTUDIADOS

I.I Genes de menor expresión en condiciones de ayuno

Gen	Proteína	Proceso biológico	Fenotipo RNAi
1 C27A2.6	DSH-2, Dishevelled related, dominios DIX, DEP y PDZ. Actividad de transductor de señales.	Vialidad embrionaria, formación de gametos, crecimiento y desarrollo de genitales, desarrollo larvario, morfogénesis.	Crecimiento lento, letalidad embrionaria y larvaria, morfología anormal, esterilidad, explosión por la vulva, arresto larvario, vulva protuberante.
2 T01C3.9	Proteína desconocida.	No reportado.	No reportado.
3 C39E9.11	Proteína de punto de control mitótico.	Desarrollo embrionario, locomoción.	Locomoción anormal, letalidad embrionaria.
4 ZK154.7	ADM-4, proteína de la familia ADAM. Dominio de peptidasa y desintegrina. Actividad de metaloendopeptidasa.	Reproducción, crecimiento.	Enfermos, esterilidad, destino celular anormal, múltiples células ancla, crecimiento lento.
5 K06G5.2	CYP-13B2, proteína de la familia de los citocromos P450. Unión de grupos hemo, unión a hierro, actividad de monooxigenasa.	Transporte de electrones.	No reportado.
6 F48D6.1	TAF-11, factor de iniciación de la transcripción TFIID, subunidad TAF11. Unión a DNA.	Regulador de la transcripción.	No reportado.
7 W06H3.2	PUS-1, tRNA pseudouridina sintasa mitocondrial.	Síntesis de pseudouridina, procesamiento de tRNA.	No reportado.
8 C56G3.2	Proteína de la familia de las aldo/ceto reductasas. Actividad de oxidoreductasa.	No reportado.	No reportado.
9 F20D1.4	Regulador transcripcional de la familia PUR. Unión a DNA de hebra sencilla. Proteína específica de ovocitos.	No reportado.	No reportado.
10 W02D7.6	Proteína con dominio de dedo de zinc del tipo C2H2. Unión a ácido nucléicos, unión a iones de zinc.	No reportado.	No reportado.
11 Y54G11A.2	Proteína desconocida.	No reportado.	No reportado.
12 F54D10.7	Proteína desconocida. Dominio de ubiquitina.	Modificación de proteínas.	No reportado.
13 F40F8.9	ISM-1 (LSM Sm-like prot.), pequeña ribonucleoproteína, factor de splicing nuclear. Procesamiento de mRNA.	Desarrollo embrionario y larvario, crecimiento.	Letalidad embrionaria, enfermos, descendencia reducida, arresto larvario.

Gen	Proteína	Proceso biológico	Fenotipo RNAi
14 T05F1.2	Proteína de la línea germinal.	No reportado.	No reportado.
15 ZC302.2	Proteína con repetidos WD40, muy conservada.	No reportado.	No reportado.
16 T02C12.3	Subunidad del factor de transcripción IIIC de la RNA pol III.	Regulación de la tasa de crecimiento.	Crecimiento lento.
17 T08G5.5	VPS-39, dominio CNH, repetidos tipo WD40. Regulador de pequeñas GTPasas.	Fagocitosis de cuerpos apoptóticos, desarrollo embrionario.	Fagocitosis anormal, letalidad embrionaria, explosión por la vulva.
18 F38E1.7	MOM-2, miembro de la familia Wnt, ligando de LIN-18. Actividad de transductor de señales.	Morfogénesis embrionaria, orientación del huso mitótico, desarrollo embrionario, establecimiento de la polaridad celular.	Esterilidad, letalidad embrionaria, crecimiento lento, morfología anormal, resistente a RNAi,
19 C50F2.3	Factor de splicing. Posible unión a RNA, procesamiento de RNA.	Gastrulación, reproducción, desarrollo embrionario, citocinesis, división celular, crecimiento.	Letalidad embrionaria y larvaria, ciclo celular lento, grandes gránulos citoplásmicos en el embrión, esterilidad, descendencia reducida.
20 F53F4.11	Proteína ribosomal. Participa en la traducción de mRNA.	Desarrollo embrionario, crecimiento, reproducción, desarrollo de genitales en el hermafrodita.	Letalidad embrionaria y larvaria, esterilidad, vulva protuberante, crecimiento lento.

Figura 1: Tabla que enlista los genes que tienen una menor expresión en condiciones de ayuno. Está representado de izquierda a derecha el nombre del gen; la proteína, sus características y la función hasta ahora reportada en la base de datos; los posibles procesos biológicos en los que participa la proteína y los fenotipos publicados para los animales RNAi (<http://www.wormbase.org/>, liberado en diciembre 2008, WS197).

I.II Genes de mayor expresión en condiciones de ayuno

Gen	Proteína	Proceso biológico	Fenotipo RNAi
1 C01F1.6	Proteína desconocida que presenta dominios de anquirina.	No reportado.	No reportado.
2 F46F11.7	Proteína desconocida.	No reportado.	No reportado.
3 D1046.2	Proteína desconocida con dominio de dedo de zinc tipo C2H2. Unión a iones de zinc.	Crecimiento, desarrollo larvario, locomoción.	Locomoción anormal, arresto larvario, puesta de embriones anormal, explosión por la vulva.
4 F53A2.5	DRO-1, proteína con dominio de factor de transcripción. Unión a DNA.	No reportado.	No reportado.
5 Y41C4A.10	ELB-1, proteína ortóloga de la elongina B, factor de elongación de la transcripción de la RNA pol-II.	Morfogénesis corporal, desarrollo embrionario y larvario, desarrollo de los genitales, crecimiento, locomoción, reproducción.	Letalidad embrionaria, esterilidad, morfología y locomoción anormal, arresto en la segunda división meiótica, aberraciones cromosomales, baja proliferación de células germinales, descendencia reducida, vulva protuberante.

Figura 2: Tabla que enlista los genes que tienen una mayor expresión en condiciones de ayuno. Está representado de izquierda a derecha el nombre del gen; la proteína, sus características y la función hasta ahora reportada en la base de datos; los posibles procesos biológicos en los que participa y los fenotipos publicados para los animales RNAi (<http://www.wormbase.org/>, liberado en diciembre 2008, WS197).

II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

II.I Niveles de apoptosis fisiológica en animales RNAi para los genes indicados.

	Gen	Promedio de cuerpos apoptóticos	Nivel de inducción	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>p</i>	Significancia
Menor expresión	Control (PV)	8.16±4.51 (519)	----	----	----	----
	1 C27A2.6 (-)	12.1±6.66 (10)	1.48	1.871	0.0941	
	2 T01C3.9 (-)	10.7±5.91 (20)	1.31	1.921	0.0698	
	3 C39E9.11 (-)	9±4.87 (14)	1.1	0.646	0.5297	
	4 ZK154.7 (-)	9.77±4.15 (17)	1.2	1.596	0.1301	
	5 K06G5.2 (-)	12±5.99 (49)	1.47	4.533	< 0.0001	S ↑
	6 F48D6.1 (-)	8.88±5.59 (25)	1.09	0.644	0.5259	
	7 W06H3.2 (-)	8.73±3.94 (15)	1.07	0.564	0.5816	
	8 C56G3.2 (-)	10.86±5.3 (22)	1.33	2.395	0.0260	S ↑
	9 F20D1.4 (-)	7.7±4.83 (10)	0.94	-0.301	0.7702	
	10 W02D7.6 (-)	11.97±7.11 (35)	1.47	3.171	0.0032	S ↑
	11 Y54G11A.2 (-)	11±4.71 (22)	1.35	2.828	0.0100	S ↑
	12 F54D10.7 (-)	15±7 (29)	1.84	5.247	< 0.0001	S ↑
	13 F40F8.9 (-)	9.94±4.43 (16)	1.22	1.603	0.1297	
	14 T05F1.2 (-)	13.1±3.97 (27)	1.61	6.431	< 0.0001	S ↑
	15 ZC302.2 (-)	10.8±3.32 (24)	1.32	3.880	0.0008	S ↑
	16 T02C12.3 (-)	13±6.39 (29)	1.59	4.081	0.0003	S ↑
17 T08G5.5 (-)	21.12±9 (26)	2.59	7.326	< 0.0001	S ↑	
Mayor expresión	Control (PV)	8.16±4.51 (519)	----	----	----	----
	1 C01F1.6 (+)	7.61±4.35 (18)	0.93	-0.5349	0.5997	
	2 F46F11.7 (+)	10.15±6.67 (46)	1.24	2.024	0.0488	S ↑
	3 D1046.2 (+)	13.1±7.27 (15)	1.61	2.615	0.0203	S ↑
	4 F53A2.5 (+)	9.91±5.54 (22)	1.21	1.482	0.1532	

Figura 3: Análisis estadístico de la apoptosis fisiológica en animales RNAi para genes de menor y mayor expresión. Se encuentran tabulados el promedio de los cuerpos apoptóticos, su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el tamaño de la muestra. El nivel de inducción del RNAi es el resultado de la división del promedio de cuerpos apoptóticos para cada gen entre el del control. El valor de *p* fue obtenido de la prueba estadística de *t* de una muestra. La significancia representa la diferencia entre los promedios, en caso de ser significativamente diferentes, es decir, con un valor de *p* menor a 0.05 y con un intervalo de confianza del 95%, se representa con una **S**. Si el número de cuerpos apoptóticos aumenta se denota con una flecha (↑).

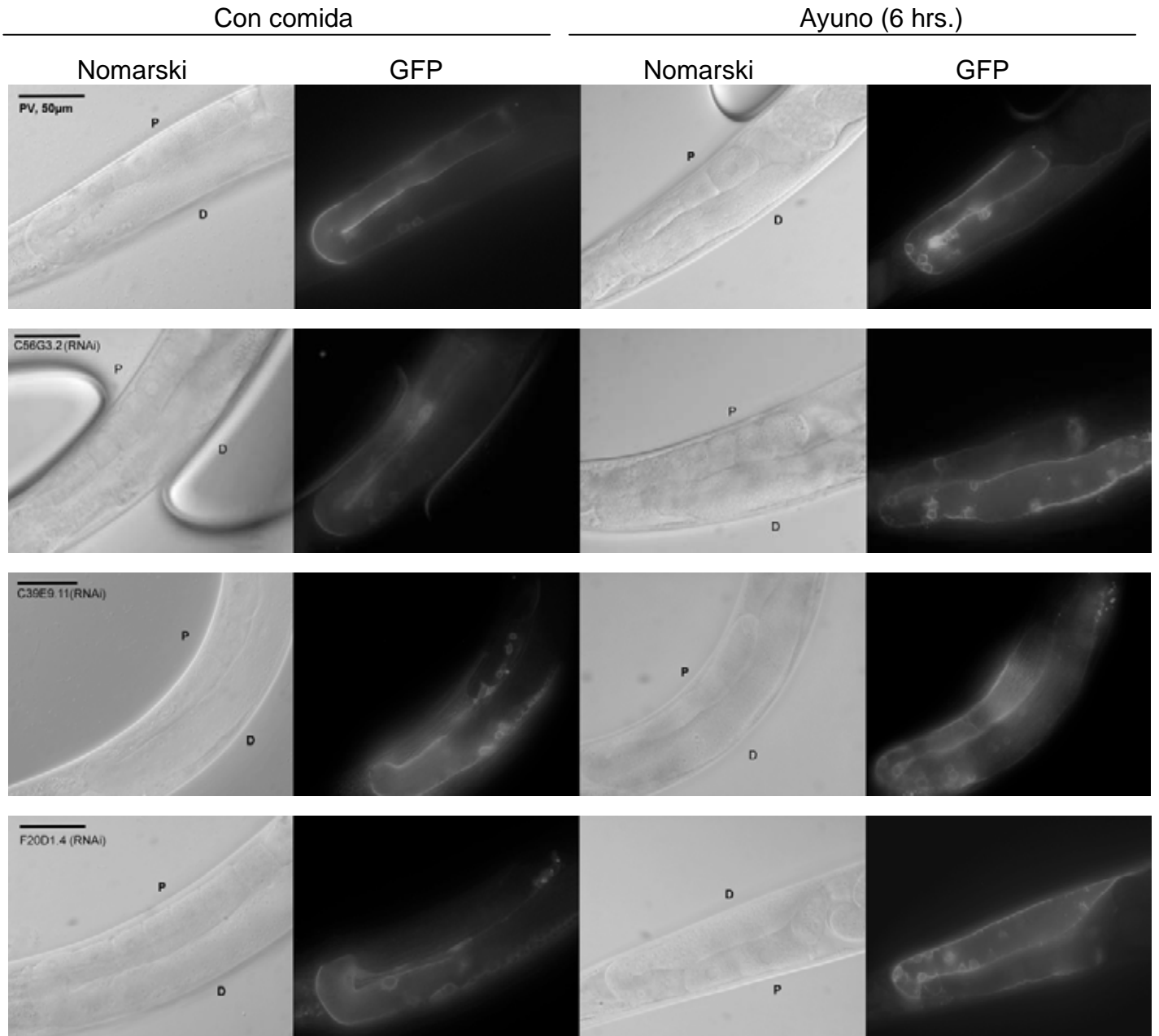
II.II Niveles de apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para los genes indicados.

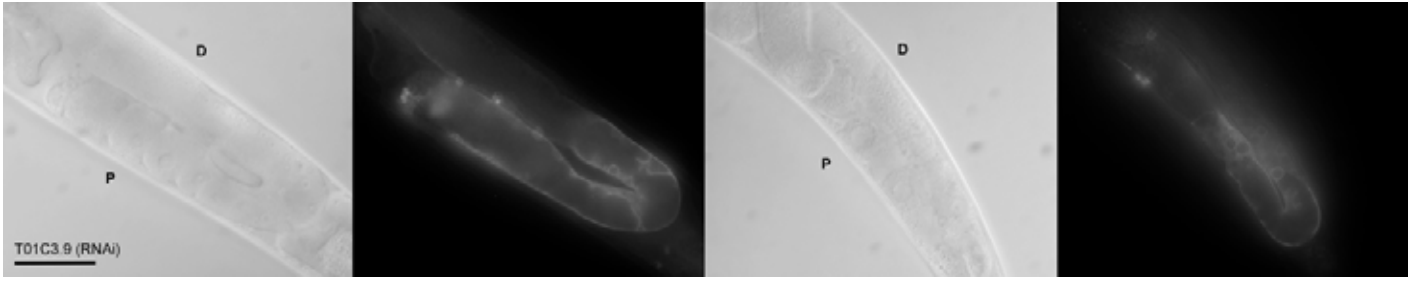
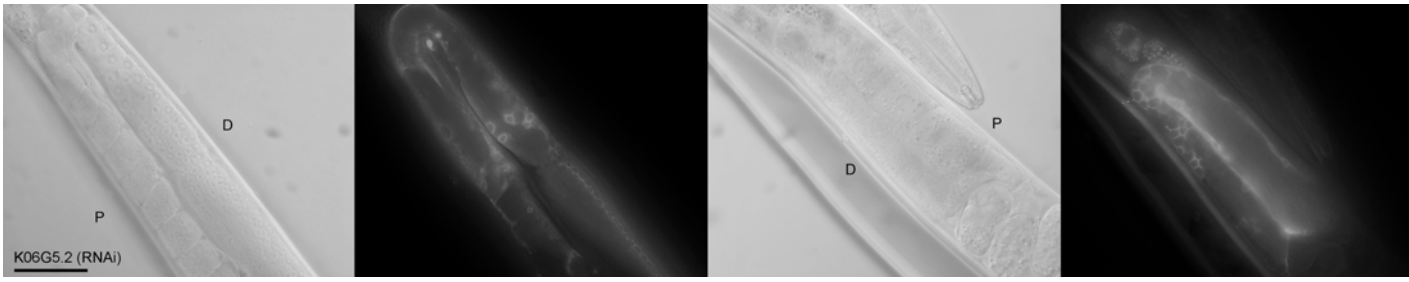
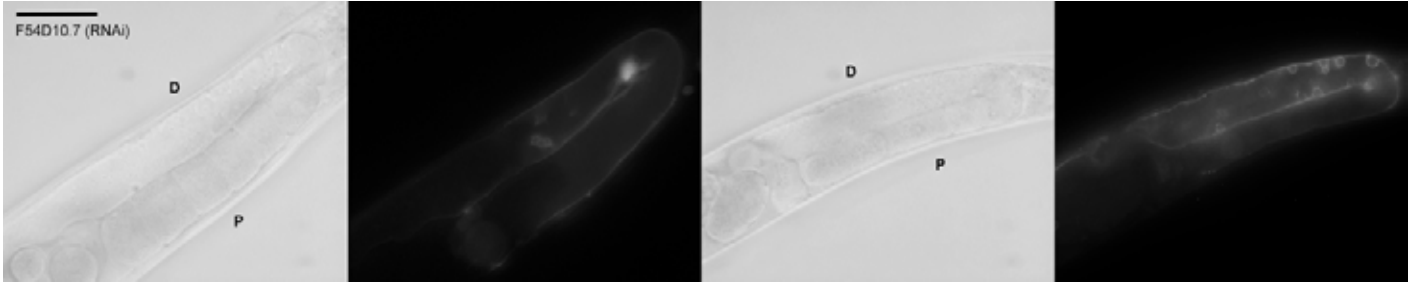
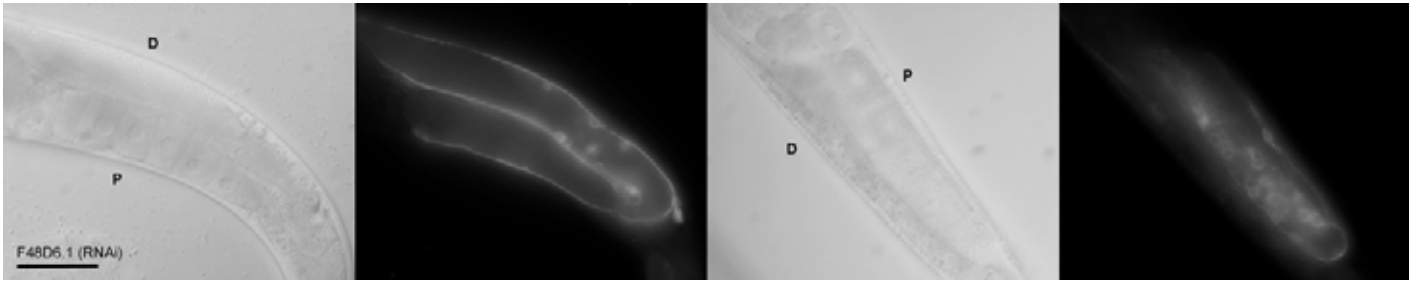
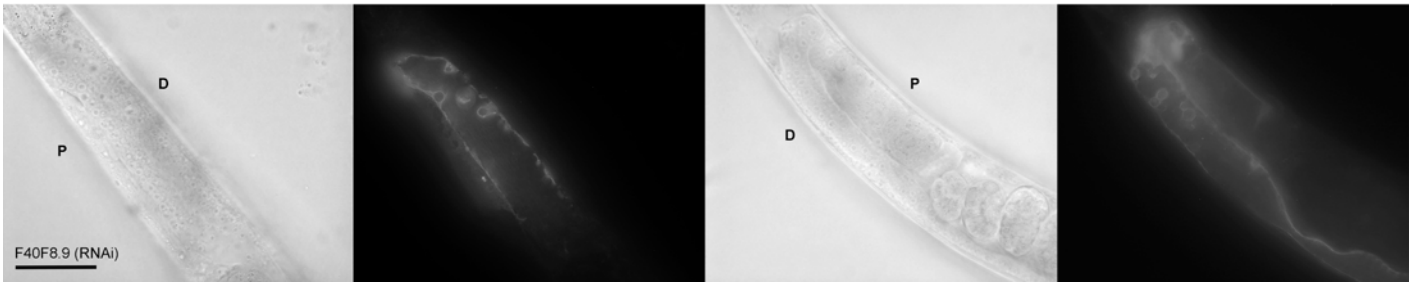
	Gen	Con comida	Sin comida	Nivel de inducción	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>p</i>	Significancia
Menor expresión	Control (PV)	8.16±4.51 (519)	12.7±5.7 (507)	1.56	-14.099	< 0.0001	S ↑
	1 C27A2.6 (-)	12.1±6.66 (10)	17.33±6.68 (6)	1.43	-1.520	0.1507	
	2 T01C3.9 (-)	10.7±5.91 (20)	19±8.76 (22)	1.78	-3.561	0.0010	S ↑
	3 C39E9.11 (-)	9±4.87 (14)	14.37±8.57 (27)	1.6	-2.162	0.0368	S ↑
	4 ZK154.7 (-)	9.77±4.15 (17)	13.44±7.95 (23)	1.38	-1.734	0.0911	
	5 K06G5.2 (-)	12±5.99 (49)	19.1±7.97 (46)	1.59	-4.874	< 0.0001	S ↑
	6 F48D6.1 (-)	8.88±5.59 (25)	15±7 (33)	1.69	-3.599	0.0007	S ↑
	7 W06H3.2 (-)	8.73±3.94 (15)	16.48±7.58 (27)	1.89	-3.672	0.0007	S ↑
	8 C56G3.2 (-)	10.86±5.3 (22)	18.6±8.27 (55)	1.71	-4.058	0.0001	S ↑
	9 F20D1.4 (-)	7.7±4.83 (10)	14.65±6.63 (26)	1.9	-3.013	0.0049	S ↑
	10 W02D7.6 (-)	11.97±7.11 (35)	21.96±8.75 (50)	1.83	-5.583	< 0.0001	S ↑
	11 Y54G11A.2 (-)	11±4.71 (22)	16.1±8.83 (19)	1.46	-2.330	0.0250	S ↑
	12 F54D10.7 (-)	15±7 (29)	21.58±5.55 (31)	1.44	-4.042	0.0002	S ↑
	13 F40F8.9 (-)	9.94±4.43 (16)	16±7.16 (16)	1.61	-2.881	0.0073	S ↑
	14 T05F1.2 (-)	13.1±3.97 (27)	19.7±6.63 (27)	1.5	-4.457	< 0.0001	S ↑
	15 ZC302.2 (-)	10.8±3.32 (24)	20.88±6.69 (16)	1.93	-6.330	< 0.0001	S ↑
	16 T02C12.3 (-)	13±6.39 (29)	16.81±6.26 (16)	1.29	-1.930	0.0602	
17 T08G5.5 (-)	21.12±9 (26)	36.21±11.7 (33)	1.71	-5.427	< 0.0001	S ↑	
Mayor expresión	Control (PV)	8.16±4.51 (519)	12.7±5.7 (507)	1.56	-14.099	< 0.0001	S ↑
	1 C01F1.6 (+)	7.61±4.35 (18)	14.33±6.34 (12)	1.88	-3451	0.0018	S ↑
	2 F46F11.7 (+)	10.15±6.67 (46)	12.5±4.28 (32)	1.23	-1.753	0.0837	
	3 D1046.2 (+)	13.1±7.27 (15)	10.1±4.46 (21)	0.77	1.520	0.1377	
	4 F53A2.5 (+)	9.91±5.54 (22)	15.58±4.18 (19)	1.57	-3.652	0.008	S ↑

Figura 4: Análisis estadístico de la apoptosis inducida por ayuno en animales RNAi para genes de menor y mayor expresión. Se encuentran enlistados el promedio de los cuerpos apoptóticos en condiciones de comida y de ayuno, su desviación estándar y la cifra entre paréntesis indica el tamaño de la muestra. El nivel de inducción es el resultado de la división del promedio de cuerpos apoptóticos en ayuno entre el promedio obtenido con comida. El valor de *p* fue obtenido de la prueba estadística de *t* de dos muestras no pareadas. La significancia representa la diferencia entre los promedios con comida y sin comida, en caso de ser significativamente diferentes, es decir, con un valor de *p* menor a 0.05 y con un intervalo de confianza del 95%, se representa con una **S**. Si el número de cuerpos apoptóticos aumenta en condiciones de ayuno se denota con una flecha (↑).

III. IMÁGENES DE MICROSCOPIA NOMARSKI Y DE FLUORESCENCIA DE ANIMALES RNAi

III.I Imágenes de animales RNAi para genes que tienen una menor expresión en condiciones de ayuno





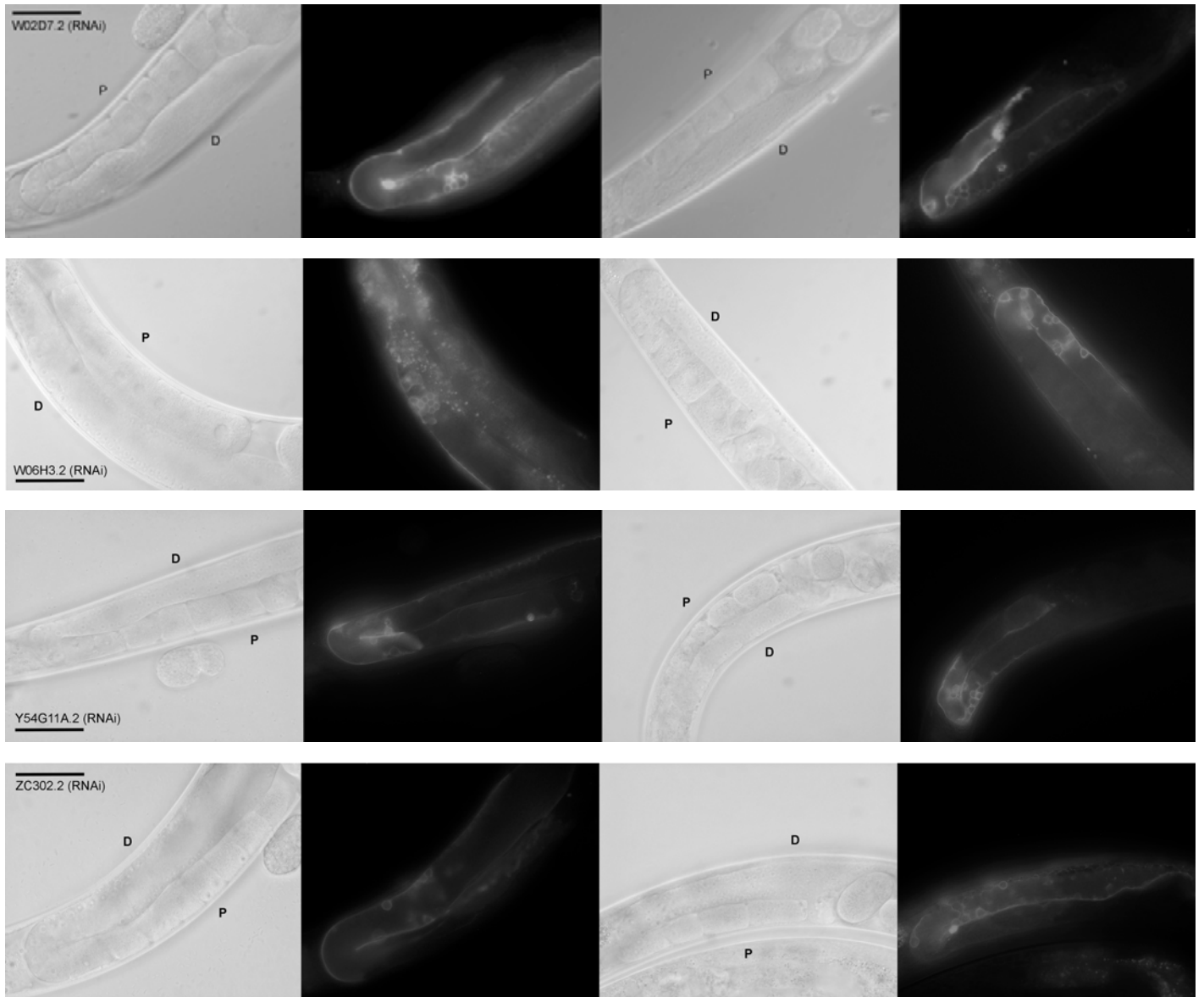


Figura 5: Imágenes de animales RNAi para los genes de menor expresión tanto en microscopía Nomarski como de fluorescencia. En las dos columnas del lado izquierdo se encuentran los animales mantenidos en condiciones normales de crecimiento y del lado derecho los animales sometidos a ayuno. En las imágenes de microscopía Nomarski se denotan la región distal (D) y la región proximal (P) de la gónada. La primera hilera de imágenes son los animales control (PV). En la imagen de la izquierda se encuentra escrito el nombre del gen y la barra indica una escala de 50μm.

III.II Imágenes de animales RNAi para genes que tienen una mayor expresión en condiciones de ayuno

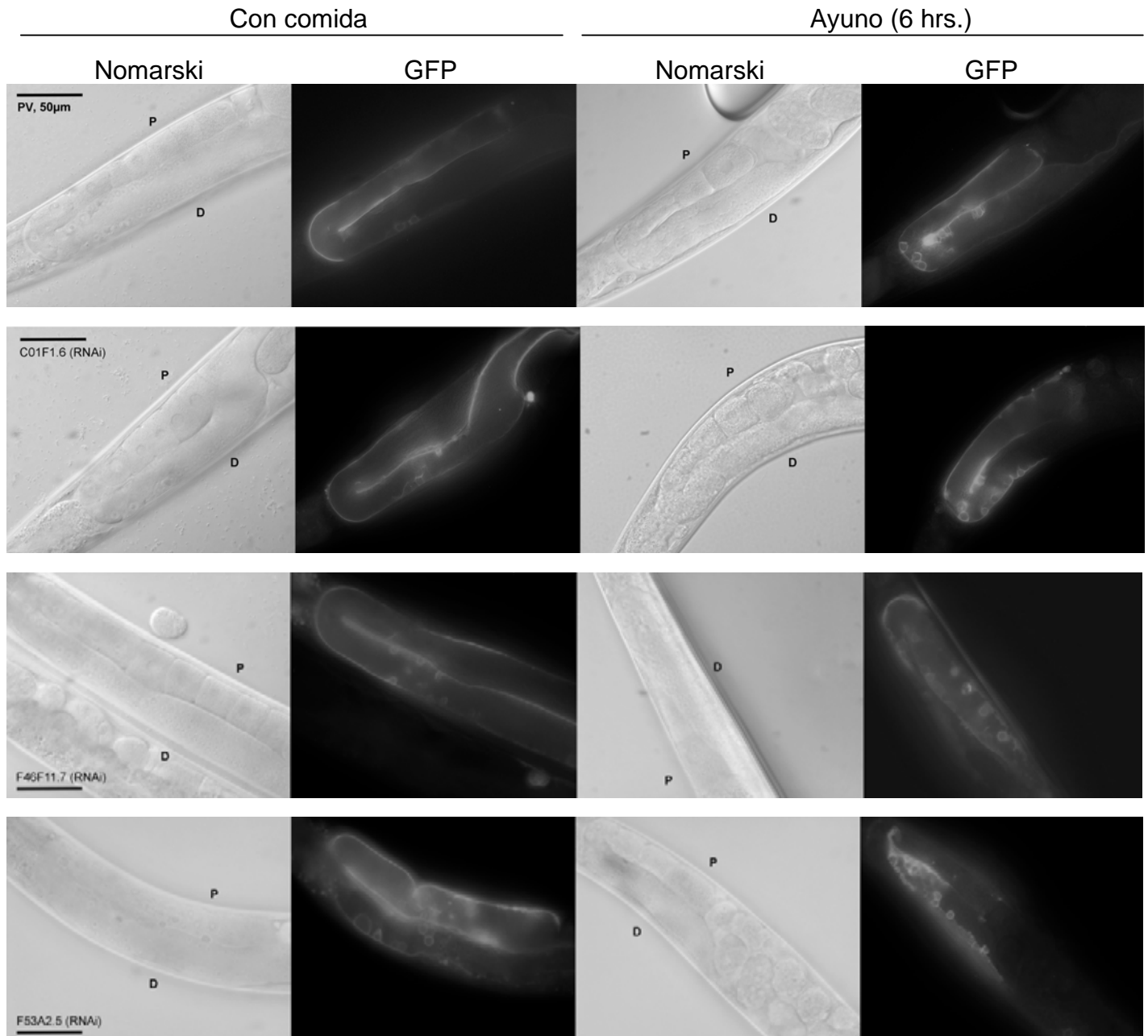


Figura 6: Imágenes de los animales RNAi para genes de mayor expresión tanto en microscopía Nomarski como de fluorescencia. En las dos columnas de la izquierda se encuentran los animales mantenidos en condiciones normales y del lado derecho los animales sometidos a ayuno. Las imágenes de microscopía Nomarski muestran la región distal (D) y proximal (P) de la gónada. La primera hilera de imágenes son los animales control (PV). En la imagen de la izquierda se encuentra escrito el nombre del gen y la barra indica una escala de 50µm.

IV. ESTUDIOS DE FERTILIDAD

IV.I Análisis estadístico de la descendencia en las cepas N2 y *rrf-1* (ok589)

	Larvas	Valor de <i>p</i>	Significancia	Embriones muertos	Valor de <i>p</i>	Significancia
Cepa N2						
PV	206	---	---	0.98	---	---
W02D7.6	196	0.415	no	1.66	0.433	no
T05F1.2	216	0.261	no	1.17	0.476	no
F53A2.5	195	0.448	no	1.21	0.519	no
Cepa <i>rrf-1</i> (ok589)						
PV	206	---	---	2.43	---	---
D1046.2	152	0.0006	sí	1.84	0.161	no

Figura 7: Tabla que resume los datos estadísticos obtenidos de los experimentos de progenie. Se muestra el promedio de larvas y de embriones muertos, cada uno con el valor de *p* obtenido y su significancia. Se encuentran tabulados los genes para los cuales se empleó la cepa N2 y el gen para el cual se utilizó la cepa *rrf-1*(ok589). Los valores de *p* menores a 0.05 indican una diferencia significativa representada en la columna de la significancia por un “sí”.

IV.II Letalidad embrionaria en los genotipos indicados

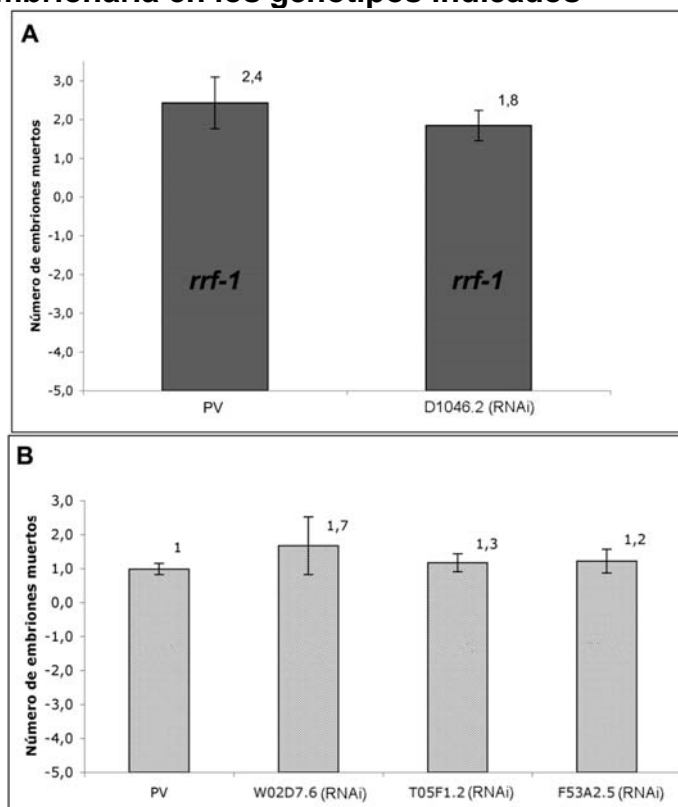


Figura 8: Gráfica que representa el promedio de embriones muertos por individuo, considerando como muerto a aquellos embriones que no eclosionaron al cabo de 24 a 48 horas. **A:** Promedio de embriones muertos para los animales D1046.2 (RNAi) de la cepa *rrf-1* (ok589). **B:** Conteo de embriones muertos en animales RNAi para cuatro genes y para los cuales se utilizó la cepa silvestre (N2). En ninguno de los casos hay diferencias significativas.

V. INMUNOTINCIONES

V.I Análisis estadístico de tinciones realizadas en animales T05F1.2 (RNAi) y D1046.2 (RNAi)

	N2			<i>rff-1</i> (ok589)		
	PV	T05F1.2	Significancia	PV	D1046.2	Significancia
Ovocitos Valor de p	5.71	6.63 0.010	sí	5.4	6.18 0.087	no
Espermatozoides Valor de p	105.7	109.56 0.696	no	106	89.75 0.135	no
Región distal (RD) Valor de p	17.3	17 0.795	no	18.2	16 0.03	sí
Zona de transición (ZT) Valor de p	15.13	16.14 0.652	no	12.8	21.31 <0.0001	sí
Región de paquíteno (PQ) Valor de p	22.37	20.2 0.313	no	27.61	23.6 0.056	no

Figura 9: Tabla que resume los datos estadísticos obtenidos de las tinciones para DAPI realizadas en los animales T05F1.2 (RNAi) y D1046.2 (RNAi). Se hizo un conteo del número de ovocitos y de espermatozoides, del número de células de la región distal (RD), de la zona de transición (ZT) y de la región de paquíteno (PQ). Se muestra en la columna central el promedio de los datos obtenidos de los animales T05F1.2 (RNAi) para los cuales se empleó la cepa N2. En la columna de la derecha están representados los datos de los animales D1046.2 (RNAi) para los cuales se utilizó la cepa *rff-1* (ok589). Asimismo se encuentran tabulados los datos para los respectivos controles (PV). El valor de *p* menor a 0.05 indica que hay diferencias significativas señaladas por un "sí" en la columna de la significancia.