



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**Estudio de la regulación de la apoptosis inducida por periodos  
prolongados de ayuno en la gónada del *C. elegans* adulto**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
EMILIO CARRANZA GARCÍA**

**DIRECTORA DE TESIS**  
Dra. Rosa Estela Navarro González  
Instituto de Fisiología Celular

**COMITÉ TUTOR**  
Dr. Jesús Chimal Monroy  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Wilhelm Hansberg Torres  
Instituto de Fisiología Celular

**Ciudad de México, Agosto de 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el laboratorio 206 sur del Departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo fue posible gracias a los apoyos a los proyectos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SEP) 220987 y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207415 e IN208918

El alumno Emilio Carranza García contó con una beca durante la realización de sus estudios de Doctorado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) con Número de Registro 361899.

Se agradece a los miembros del Comité Tutor: Dr. Jesús Chimal Monroy y Dr. Wilhelm Hansberg Torres por sus discusiones y sugerencias durante la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Juan Miranda Ríos, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez, Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez y Dr. Jesús Aguirre Linares, gracias por sus valiosas aportaciones y comentarios.

Se agradece a la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su contribución técnica durante la realización de este trabajo, a los compañeros y amigos del 206S.

También se agradece al personal de las siguientes unidades del IFC por su asistencia técnica:

A la Dra. Laura Ongay Larios y al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Guadalupe Códiz y Minerva Mora Cabrera.

Al personal de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez.

Al personal del taller: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

Al personal de la biblioteca: Javier Gallegos Infante y Sandra Moncada Hernández.

## ÍNDICE

<b>1 ABREVIATURAS</b>	13
<b>2 NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA EN <i>C. elegans</i></b>	14
<b>3 RESUMEN</b>	15
<b>3 ABSTRACT</b>	17
<b>4 INTRODUCCIÓN</b>	18
4.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio	18
4.1.1 Los nemátodos como organismo modelo	18
4.1.2 La recolección y observación morfológica de los nemátodos	18
4.1.3 La experimentación con nemátodos	18
4.2 Anatomía de <i>C. elegans</i>	21
4.3 El ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4.3.1 El desarrollo embrionario	24
4.3.2 El estadio larvario	25
4.3.3 La etapa adulta	25
4.4 Anatomía de la gónada y la ovogénesis	26
4.5 Estados de diapausa y arrestos del ciclo de vida del <i>C. elegans</i>	27
4.5.1 El arresto en L1	29
4.5.2 La diapausa dauer	30
4.5.3 La diapausa reproductiva del adulto	32
4.6 El papel de la apoptosis durante la diapausa del adulto	34
4.7 La regulación genética de la calidad de los ovocitos	36
<b>5 PLANTEAMIENTO DEL PROBELMA</b>	38
<b>6 HIPÓTESIS</b>	38
<b>7 OBJETIVO GENERAL</b>	39
7.1 Objetivos particulares	39

<b>8 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
8.1 Cepas	40
8.2 Ensayos de ayuno	41
8.3 Cuantificación de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada	42
8.4 Cuantificación de células germinales por brazo de la gónada	42
8.5 Visualización del proceso de degradación de cuerpos apoptóticos en la gónada	43
8.6 Cuantificación de progenie, letalidad embrionaria e incidencia de machos	43
8.7 Ensayo de choque de calor	44
8.8 Ensayo de resistencia al SDS	44
8.9 Tasa de ovulación	45
8.10 Silenciamiento de genes por ARNi	45
8.11 Microscopía	45
8.12 Análisis estadístico	46
<b>9 RESULTADOS</b>	<b>47</b>
9.1 El ayuno prolongado afecta la fertilidad	47
9.1.1 Los animales que experimentan la ARD no recuperan la fertilidad completamente debido a que esta condición afecta la calidad de las células germinales	47
9.1.2 Los animales con la línea germinal feminizada son más sensibles a la ARD que la línea germinal de los animales los silvestres	54
9.2 La respuesta de la gónada al ayuno durante la diapausa del adulto confiere protección a las células germinales contra el arresto prolongado en diacinesis	57
9.3 La reducción del tamaño de la gónada durante el ayuno prolongado no depende de la apoptosis de las células germinales	64
9.4 Durante el ayuno prolongado, la apoptosis de las células germinales aumenta y no se detiene	73

9.4.1 La proteína homóloga del retinoblastoma LIN-35 regula parcialmente la apoptosis que se induce durante el ayuno prolongado	82
9.5 Mecanismo molecular que regula la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno	86
9.5.1 Los animales deficientes de <i>daf-2</i> reducen el tamaño de su gónada aun en presencia de alimento	88
9.5.2 Algunas mutaciones en el receptor de insulina promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento	92
9.5.3 La vía de la insulina regula algunos fenómenos durante la respuesta de la gónada al ayuno	98
9.5.4 La inactivación de la vía de la insulina causa un incremento en la apoptosis aún en presencia de alimento	100
9.6 Existe una mayor incidencia de machos entre la progenie producida por animales expuestos a la ARD	103
9.7 La diapausa reproductiva del adulto no protege a los animales de otros tipos de estrés	106
9.7.1 La ARD no confiere protección para sobrevivir durante el choque de calor	106
9.7.2 La ARD promueve la expresión de <i>sod-3</i> , un gen para contender contra del estrés oxidativo	112
9.7.3 La ARD no promueve la formación de gránulos de ribonucleoproteicos estrés dentro de la gónada	115
9.7.4 La ARD causa alteraciones en las redes mitocondriales dentro de la gónada	118
9.7.5 La ARD retrasa la aparición de signos relacionados con el envejecimiento	120
9.7.6 La inactivación de la vía de la insulina regula la apoptosis de las células germinales en animales adultos en presencia de alimento	124

<b>10 DISCUSIÓN</b>	128
10.1 La ARD compromete la fertilidad afectando a las células que dan lugar a los ovocitos	129
10.1.1 La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno evita el arresto de la ovogénesis	130
10.2 La apoptosis de las células germinales permanece elevada durante la ARD	130
10.3 La apoptosis es importante para preservar la calidad de los ovocitos durante la ARD; sin embargo, no es esencial para recuperar la fertilidad y reducir la gónada	132
10.4 La ARD causa un aumento en la incidencia de machos dentro de la progenie	133
10.5 La inactivación de DAF-2 podría inducir la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno	133
10.6 Los animales en ARD no son más resistentes a otros tipos de estrés	134
<b>11 CONCLUSIONES</b>	136
<b>12 PERSPECTIVAS</b>	137
<b>13 REFERENCIAS</b>	139
<b>14 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b>	144



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La anatomía del <i>C. elegans</i> .	23
Figura 2. El ciclo de vida del <i>C. elegans</i> .	24
Figura 3. La gónada del hermafrodita adulto de <i>C. elegans</i> esquematizada.	27
Figura 4. Las etapas del desarrollo alternas al ciclo reproductivo.	28
Figura 5. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno durante la ARD.	33
Figura 6. El ayuno induce la apoptosis de las células germinales.	36
Figura 7. El ayuno prolongado afecta la fertilidad.	48
Figura 8. El número de espermatidas en los animales silvestres permanece constante durante la diapausa.	51
Figura 9. La letalidad embrionaria es mayor en animales que pasaron por ARD.	52
Figura 10. Los animales recuperados de la ARD y cruzados no restablecen completamente su fertilidad.	53
Figura 11. La letalidad embrionaria después de la ARD se rescata al cruzar a los animales silvestres recuperados con machos.	54
Figura 12. Los animales con la línea feminizada son más susceptibles a la ARD.	56
Figura 13. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno previene el arresto prolongado en diacinesis de los ovocitos.	59
Figura 14. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno protege a los ovocitos del arresto prolongado en diacinesis, el cual es muy perjudicial para el ovocito.	61
Figura 15. La ovulación contribuye a la reducción de la gónada durante la ARD.	63
Figura 16. La apoptosis no contribuye a la reducción del tamaño de la gónada durante el ayuno ni para la recuperación de su tamaño al realimentarse.	65

Figura 17. Los animales mutantes en <i>ced-3</i> reducen el tamaño de su gónada durante la ARD.	67
Figura 18. Los animales mutantes de la caspasa producen menos progenie que los animales silvestres después de un ayuno prolongado.	69
Figura 19. La letalidad embrionaria es mayor en los animales mutantes <i>ced-3</i> en condiciones control y después del ayuno prolongado.	71
Figura 20. La letalidad embrionaria se rescata al cruzar a los animales <i>ced-3</i> con machos, sin embargo no se recupera completamente la fertilidad de los animales después de la ARD.	72
Figura 21. La apoptosis de las células germinales permanece activa durante la ARD.	74
Figura 22. El número de células germinales disminuye durante la ARD.	77
Figura 23. El número de cuerpos apoptóticos es mayor durante el ayuno.	79
Figura 24. La degradación de los cuerpos apoptóticos ocurre de manera normal durante el ayuno prolongado.	80
Figura 25. El aumento en la apoptosis durante el ayuno es independiente de <i>cep-1/p53</i> .	83
Figura 26. El aumento en la apoptosis durante el ayuno depende parcialmente de <i>lin-35/Rb</i> .	85
Figura 27. Los animales mutantes <i>daf-2(e1370)</i> reducen el tamaño de su gónada aun en presencia de alimento a través de DAF-16/FoxO.	89
Figura 28. Los animales mutantes <i>daf-2(e1370)</i> reducen el número de células germinales aun en presencia de alimento a través de DAF-16/FoxO.	91
Figura 29. Posición de las mutaciones que afectan a la proteína DAF-2 empleadas en el presente trabajo.	93

Figura 30. Mutaciones en los dominios L1, FnIII2 y tirosín-cinasa promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.	95
Figura 31. Mutaciones en los dominios L2, CR y una sección del FnIII2 no promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.	97
Figura 32. La tasa de ovulación disminuye al inactivar la vía de la insulina.	99
Figura 33. La apoptosis de las células germinales aumenta al inactivar la vía de la IIS en presencia de alimento.	102
Figura 34. Los animales recuperados de la ARD presentan una mayor incidencia de machos.	103
Figura 35. El esperma expuesto contribuye a la aparición de machos dentro de la población de animales recuperados de la ARD.	105
Figura 36. La ARD no induce la expresión una respuesta de protección contra el choque de calor.	108
Figura 37. Los animales sometidos a la ARD pueden inducir una respuesta contra el choque de calor.	109
Figura 38. La entrada en ARD promueve la resistencia al choque de calor.	111
Figura 39. Los animales en ARD son más susceptibles al choque de calor.	112
Figura 40. La ARD promueve una respuesta transitoria contra el estrés oxidante.	114
Figura 41. TIAR-1 se asocia en gránulos citoplasmáticos dentro de la gónada al someter a los animales a diferentes tipos de estrés.	115
Figura 42. Los gusanos en ARD no forman gránulos de estrés en la gónada.	117
Figura 43. Las redes mitocondriales de la gónada exhiben alteraciones durante la ARD.	119
Figura 44. La autofluorescencia roja correlaciona con la esperanza de vida en <i>C. elegans</i> .	121

Figura 45. La autofluorescencia roja no aumenta en los animales mientras se encuentran en ARD. 123

Figura 46. La inactivación de la vía de la insulina por 6 h induce la apoptosis de las células germinales en presencia de alimento. 125

Figura 47. Los animales *daf-2* responden al ayuno aumentando la apoptosis de las células germinales. 127

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos de fertilidad en los diferentes fondos genéticos usados en el presente trabajo.	49
Tabla 2. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en distintos fondos genéticos en condiciones control y ayuno.	64
Tabla 3. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en condiciones control, ayuno y recuperación de animales de diferentes fondos genéticos.	68
Tabla 4. Dinámicas de apoptosis en condiciones control y ARD.	75
Tabla 5. Cuantificación de células germinales por brazo de la gónada en condiciones control y durante la ARD.	78
Tabla 6. Degradación de cuerpos apoptóticos en condiciones control y durante la ARD.	81
Tabla 7. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno en diferentes fondos genéticos.	87
Tabla 8. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en distintos fondos genéticos en condiciones control con comida.	90

## 1 ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ARD	Diapausa reproductiva del adulto.
ARN	Ácido ribonucleico.
<i>C. elegans</i>	Nombre científico del nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .
CED	Proteínas que producen muerte celular anormal en <i>C. elegans</i> .
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico.
Col.	Colaboradores.
Daf-c	Mutaciones que originan la entrada constitutiva a la etapa dauer.
Daf-d	Mutaciones que son defectuosas para la entrada a la etapa dauer.
DIC	Contraste interdiferencial.
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena.
DTC	Célula de la punta distal.
<i>et al.</i>	Y colaboradores.
Fig.	Figura.
GLP-1/Notch	Proteína de membrana que al ser interrumpida produce una proliferación anormal de la línea germinal.
h	Horas.
IIS	Vía de señalización de la insulina y su receptor.
L1-4	Estadio larvario que va del 1 al 4.
lb	Libra.
M	Molar.
m	Mili.
Mb	Megabase.
NGM	Medio de crecimiento para nemátodos.
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta 1.
UV	Ultravioleta.
$\mu$	Micro.

## 2 NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA EN *C. elegans*

Nombre/Símbolo	Significado
CED-3	Representación de una proteína.
<i>ced-3</i>	Representación de un gen.
Daf-c	Representación de un fenotipo. Este fenotipo consiste en la entrada a diapausa dauer de manera constitutiva ( <u>D</u> auer <u>f</u> ormation- <u>c</u> onstitutive).
<i>ced-3(n717)</i>	Representación del genotipo. Se muestra el alelo entre paréntesis, obtenido del laboratorio <i>n</i> (del Dr. Robert Horvitz).
<i>ced-1::gfp</i>	Fusión transcripcional de <i>ced-1</i> con <i>gfp</i> .
<i>bcIs39 lim-7p::ced-1::GFP</i>	Genotipo que tiene el alelo bcIs39. Este genotipo tiene el alelo de <i>ced-1</i> bajo el promotor de <i>lim-7</i> , cuya expresión es específica de las células somáticas de la gónada, fusionado con <i>gfp</i> , inserción ( <i>Is</i> ) número 39 hecha en el laboratorio de la Dra. Barbara Conradt.
<i>daf-16(m26) I;</i> <i>daf-2(e1370) III</i>	Genotipo con los alelos de <i>daf-16</i> y <i>daf-2</i> que están en los cromosomas I y III, respectivamente. Si los alelos están en el mismo cromosoma no se separan con “;”.

Fuente: Wormbase/Userguide/Nomenclature, Versión: WS52

### 3 RESUMEN

Los animales han desarrollado mecanismos para contrarrestar los efectos adversos del medio ambiente, pudiendo ajustar su ciclo de vida dependiendo de la disponibilidad de alimento para poder subsistir y propagarse. El nemátodo *Caenorhabditis elegans* tiene la capacidad de detener su ciclo vital de manera reversible si las condiciones del medio son desfavorables, mediante un fenómeno conocido como diapausa. Durante las diapausas, los nemátodos detienen sus funciones metabólicas y pueden vivir arrestados por días, e incluso meses. La diapausa reproductiva del adulto (ARD, por sus siglas en inglés) es un mecanismo poco estudiado que ocurre cuando los animales son privados de una fuente de alimento durante la última etapa larvaria o la etapa adulta, causando un retraso en su ciclo reproductivo y el arresto de su ciclo de vida. Los animales logran retrasar su ciclo reproductivo por medio de “la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno” que les permite mantener la fertilidad durante la diapausa. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto que tiene el ayuno en la gónada. Midiendo la calidad de los ovocitos como el éxito que tienen los gametos para dar lugar embrión capaz de completar el desarrollo, encontramos que la ARD afecta la capacidad reproductiva tanto de los gametos masculinos como de los femeninos. Anteriormente se propuso que la ARD retrasa enormemente la producción de ovocitos, pero no la detiene completamente. Nosotros encontramos que esta condición protege a los ovocitos de un arresto prolongado en (diacinesis), lo cual mantiene una buena calidad de los ovocitos cuando las condiciones se reestablecen. Encontramos que la ovulación activa contribuye a reducir el tamaño de la gónada durante la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno. Durante la ARD existe un incremento en el número de cuerpos apoptóticos dentro de la gónada. El ortólogo del Retinoblastoma, *lin-35* induce parcialmente el incremento en la apoptosis de las células germinales. Encontramos que la inactivación de la vía de la insulina en presencia de alimento contribuye parcialmente a la reducción de la gónada de manera similar a la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno. Las redes mitocondriales se alteran dentro de la gónada durante la ARD. Los animales sometidos a la ARD exhiben una resistencia transitoria al choque de calor. Finalmente,



encontramos que los animales sometidos a la ARD retrasan la aparición de signos del envejecimiento.

### 3 ABSTRACT

Animals have developed mechanisms to cope with harsh conditions, they adjust their reproductive and reproductive cycle in response to nutritional cues to reproduce only when food is available. *C. elegans* enters to alternate states of dormancy, termed as “diapause” during different developmental stages when unfavorable conditions are present. During these diapause animals show slowed metabolic rate and life span extension. The adult reproductive diapause (ARD) has been yet not fully described. Animals enter ARD when subjected to starvation during the L4 or adult stages, halting reproduction and extending life span. Animals halt their reproductive cycle by displaying “the oogenic germ line starvation response”, a mechanism characterized by delayed ovulations and gonad shrinkage, which preserves fertility during ARD. Here we studied the effects of ARD on embryonic lethality, as a reflect of oocyte quality. We show that ARD affects the animals’ reproductive capacity by impairing sperm and oocyte quality. We demonstrate that the oogenic germ line starvation response protects female germ cells from a prolonged meiotic arrest, therefore preserving oocyte quality. During ARD; active ovulations contribute to gonad shrinking during the oogenic germ line starvation response, germ cell apoptosis is increased and is partially regulated by the Retinoblastoma ortholog, *lin-35*. Insulin/Insulin-like growth factor pathway inactivation in the presence of food partially contributes to the oogenic germ line starvation response. We demonstrate that ARD alters the mitochondrial networks within the gonad. Finally, we found that animals subjected to ARD exhibit a transient heat-shock protection.

## 4 INTRODUCCIÓN

### 4.1 *Caenorhabditis elegans* como un excelente modelo de estudio

#### 4.1.1 Los nemátodos como organismo modelo

El **pequeño** nemátodo redondo, *Caenorhabditis elegans*, junto con la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* y la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*, se ha convertido en uno de los principales organismos modelo, haciendo posibles importantes avances en la biología celular y molecular. Este nemátodo **transparente** captó la atención de los investigadores a partir de los estudios del Dr. Sydney Brenner en la década de los 60, aunque, su estudio se ha documentado desde la década de los 40. Podría decirse que los primeros nemátodos empleados como organismos modelo pertenecen al género de nemátodos parásitos *Ascaris*. Estos animales poseen características que los vuelven excelentes modelos de estudio, pero al ser organismos parásitos, no pueden ser mantenidos en ausencia de su hospedero. Por tanto, los nemátodos de **vida libre** como *C. elegans* se consolidaron como organismos modelo [1].

#### 4.1.2 La recolección y observación morfológica de los nemátodos

Los primeros reportes de nemátodos surgieron con la invención del microscopio en el siglo XVII, de hecho, el propio Antonie van Leeuwenhoek describió unas “Criaturas pequeñas con vida que se asemejaban a unas pequeñas anguilas” en el vino añejo, posiblemente *Turbatrix aceti* [1]. La mayoría de esos estudios comprendía la comparación y descripción de muchas especies diferentes de nemátodos.

#### 4.1.3 La experimentación con nemátodos

A finales del siglo XIX, los estudios descriptivos se acompañaban con experimentos básicos, debido a la naturaleza de los nemátodos y su **facilidad** para crecer en condiciones controladas de laboratorio, estos estudios describían sus necesidades nutricionales y su **corto ciclo de vida**. Emile Maupas, fue un bibliotecario argelino quien aisló y nombró a *Rhabditis elegans*, ahora *C. elegans*. Adicionalmente, produjo dos artículos donde se

describen los cambios de cutícula y las formas de reproducción. Los hermafroditas de *C. elegans* se desarrollan estructuralmente de forma femenina, sin embargo, cuando inicia la gametogénesis producen esperma y se almacena en una estructura somática, a esta forma de reproducción se le conoce como **hermafroditismo protándrico** [1].

En la década de los 40, los investigadores Victor Nigon y Ellsworth Dougherty dieron inicio al estudio sistematizado de diversos aspectos reproductivos y nutricionales, respectivamente. Redefinieron los métodos de cultivo para los nemátodos, dando como resultado una mejor **reproducibilidad** en los experimentos. Victor Nigon y sus colaboradores condujeron experimentos acerca de las bases cromosomales para la determinación sexual en *C. elegans*, usando análisis celulares y de meiosis. A finales de los años 40, el trabajo de Dougherty y colaboradores propuso a los nemátodos del sub-orden *Rhabditina* como un organismo modelo de gran significancia debido a sus características remarcables. Años más tarde, después de experimentar y aislar muchas especies diferentes de nemátodos, Sydney Brenner eligió a *C. elegans* como modelo de estudio para sus trabajos de genética y biología del desarrollo [1, 2].

Los estudios genéticos del Dr. Sydney Brenner en *C. elegans* iniciaron formalmente a finales de 1967, empleando etil metano sulfonato (EMS) como agente mutagénico para la obtención de diferentes cepas. Después de refinar los experimentos de **mutagénesis**, Brenner confirmó la segregación mendeliana del nemátodo: Obtener una mutante y confirmar las leyes de Mendel en tan solo 2 semanas, le añadía importancia al pequeño nemátodo como un excelente modelo de estudio. En los años siguientes, el Dr. Sydney Brenner obtuvo más de 300 mutantes, desarrolló métodos para complementarlas y mapearlas [3]. Para 1974 existían dos publicaciones que definieron las bases de la investigación genética usando a *C. elegans* como modelo de estudio, una de ellas describía el ADN de *C. elegans* [4] y la otra hacía disponible una base de datos con información de 100 genes [5].

El estudio de la estructura del sistema nervioso usando al *C. elegans* como modelo dio como resultado un proyecto denominado “La mente de un gusano (The mind of a worm)”, fue publicado a finales de los 80 y dio lugar a un artículo detallado acerca de las

células del sistema nervioso, sus conexiones, estructura y fisiología. En dicho artículo se establecía la **invariabilidad** de su sistema nervioso compuesto por 302 neuronas agrupadas en 118 tipos, las cuales conforman 8,000 sinapsis a lo largo de todo un organismo hermafrodita [6].

A finales de la década de los 70, las observaciones en *C. elegans* hicieron posible la caracterización del patrón de divisiones celulares que ocurren desde el estadio larvario L1 (550 células) y determina el número total de células somáticas en el organismo adulto, el cual es diferente entre el macho (970 células) y hermafrodita (810 células), pero invariable [7]. A inicios de la década de los 80 se caracterizó el destino invariable de todas y cada una de las células desde un cigoto hasta la larva L1 [8].

Dos décadas de descubrimientos fascinantes causaron que para la década de los 90 muchos laboratorios alrededor del mundo adoptaran al *C. elegans* como modelo de estudio, algunos de ellos siendo incorporados directamente por el Dr. Sydney Brenner, mientras que otros lo hicieron de manera independiente para crear una comunidad cercana que compartía herramientas, una base de datos común, conferencias y discusiones. A mediados de la década de los 90, empleando al *C. elegans* y *E. coli* como objeto de estudio, se materializó una idea que revolucionaría el estudio de la biología. El científico americano Martin Chalfie y colaboradores lograron la expresión de una proteína, cuya secuencia proviene de un organismo acuático bioluminiscente (*Aequorea victoria*), que absorbe luz azul y emite luz verde, bajo el promotor de un gen que se expresa en algunas neuronas, esto hizo posible el estudio *In vivo* de la expresión de los genes y la localización de las proteínas. Una vez conseguida la **transgénesis** del *C. elegans* y *E. coli*, la proteína verde expresada por estos organismos se mantiene estable [9].

A finales de la década de los 90 se describe por primera vez otro avance científico de gran impacto en el laboratorio del Dr. Craig Mello. Andrew Fire y colaboradores lograron interferir la expresión de un gen blanco al introducir ARN de doble cadena (ARNdc) exógeno con la secuencia complementaria al gen blanco en un hermafrodita adulto. Este hallazgo hizo posible el análisis de muchas regiones del genoma del *C. elegans* cuya función era desconocida. Años más tarde, usando al *C. elegans* como modelo de

estudio fue posible entender el mecanismo molecular que gobierna el silenciamiento de los genes por medio de **ARN de interferencia** [10-12].

A pesar de las estimaciones hechas por Sulston y Brenner (1974) con respecto al tamaño del genoma del *C. elegans* y ser la base de muchos estudios en genética, a finales de la década de los 90, la secuenciación del genoma del *C. elegans* permanecía inconclusa [4]. En un esfuerzo bilateral por parte del Instituto Sanger en Hinxton, Inglaterra y el Instituto del Genoma McDonnell en Estados Unidos lograron secuenciar completamente el genoma del *C. elegans* en el año 2002, convirtiéndose en el primer genoma de un organismo eucariota multicelular en ser secuenciado. Su **genoma es pequeño**, comparado con el genoma humano, consta de 100 Mb y codifica para más de 22,000 proteínas. Aproximadamente el 35% de los genes del *C. elegans* están estrechamente relacionados a sus equivalentes en humano (genome.wustl.edu).

Actualmente, el *C. elegans* sirve como modelo de estudio para entender procesos biológicos relacionados con el envejecimiento, estrés, metabolismo, patogénesis, ecología, entre muchos otros. En 2002, Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz compartieron el premio Nobel en Fisiología y Medicina por sus aportaciones hechas en *C. elegans*. En 2006, Andrew Fire y Craig Mello compartieron el premio Nobel en Fisiología y Medicina por su trabajo trascendental con relación a la interferencia por medio de ARN en *C. elegans*, un proceso con posibles aplicaciones terapéuticas. Finalmente, Martin Chalfie recibió el premio Nobel en Química en 2008 por el uso de la proteína verde fluorescente como un reportero fluorescente para el estudio de múltiples fenómenos *In vivo* en *C. elegans* y muchos otros organismos modelo.

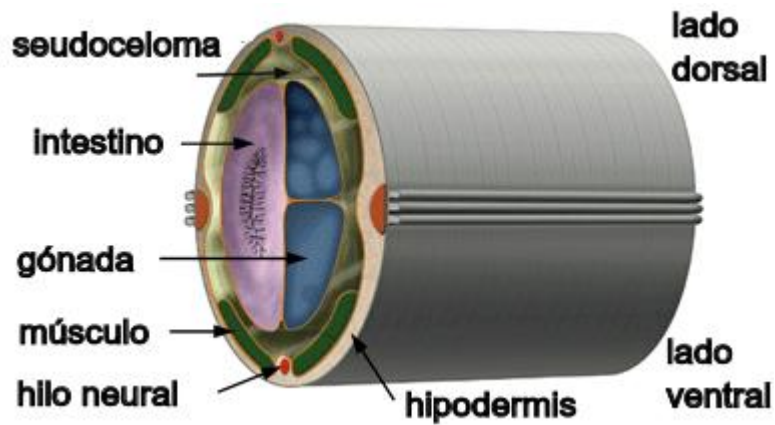
#### **4.2 Anatomía de *C. elegans***

*C. elegans* es un nemátodo de estructura relativamente simple, es fácil de mantener en condiciones de laboratorio y sus etapas del desarrollo se encuentran bien definidas [13, 14]. Las larvas que recién eclosionan miden 0.25 mm y el nemátodo adulto llega a medir 1 mm de largo. Presenta dos formas sexuales, macho y hermafrodita. En el laboratorio se

mantiene en cajas Petri con medio NGM (por sus siglas en inglés, Nematode Growth Medium) al cual, una vez solidificado, se le adiciona una suspensión de bacterias *Escherichia coli* OP50 como alimento para el nemátodo. La suspensión de *E. coli* se deja secar durante una noche y las cajas con alimento se almacenan a 4°C. *E. coli* OP50 presenta una mutación que le impide colonizar la superficie del medio de cultivo, de esta manera se facilita la manipulación y observación de los nemátodos sobre el medio de cultivo.

Los nemátodos hermafroditas son la forma sexual predominante en condiciones de laboratorio, se propagan por autofertilización y dan lugar a 300 nuevos organismos. Los machos se originan espontáneamente en condiciones de laboratorio con una frecuencia muy baja. Al cruzar constantemente un hermafrodita con machos se pueden generar hasta 1,000 nuevos organismos. Su tamaño permite el uso de microscopía de contraste interdiferencial, (DIC) Nomarski y al ser animales transparentes, se pueden observar sus estructuras internas y procesos biológicos *In vivo* sin necesidad de preparaciones especiales [15].

*C. elegans* tiene estructuras muy bien definidas. Es un nemátodo redondo que puede ser descrito como una serie de tubos concéntricos, las células externas conocidas como hipodermis conforman una cavidad que se encuentra llena de un fluido pseudocelómico donde se embeben los demás sistemas del nemátodo, estas células producen la cutícula, que le confiere su forma y resistencia al medio en el que se desarrolla. Las células del músculo se encuentran unidas a la hipodermis y controlan los movimientos del nemátodo. El sistema digestivo comprende la faringe y las células del intestino. El sistema nervioso se compone de 302 neuronas, la mayoría de ellas se encuentran en la cabeza, el cordón ventral y la cola. Finalmente, el tejido reproductivo se conforma de la gónada somática y las células germinales.

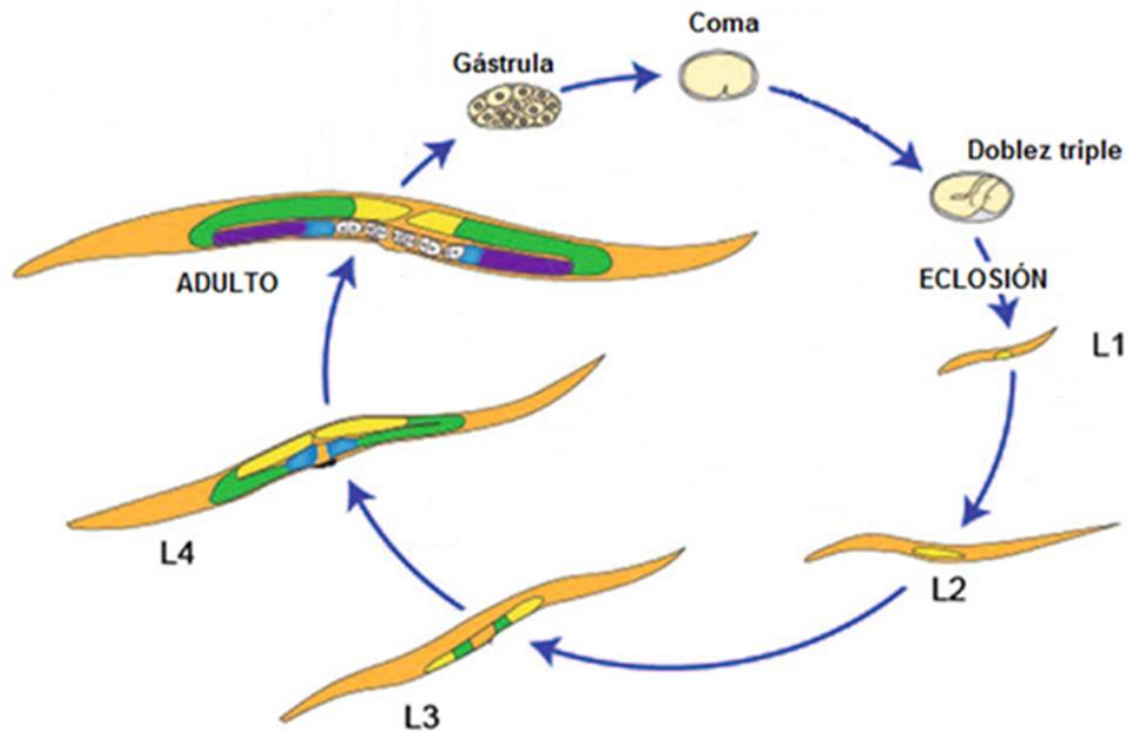


**Figura 1. La anatomía del *C. elegans*.** Esquema que muestra los diferentes tejidos que conforman la anatomía de un hermafrodita adulto en un corte transversal, indicando con una flecha los principales tejidos dispuestos en un eje dorso/ventral. Imagen modificada de [16].

### 4.3 El ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*

El crecimiento de *C. elegans* es rápido en condiciones de laboratorio. Su ciclo de vida depende de las condiciones del ambiente donde se desarrolla, en condiciones controladas a 20°C y sin límite de alimento, se necesitan solo 3.5 días para que un ovocito recién fertilizado llegue a ser un adulto capaz de reproducirse. Su desarrollo comprende la embriogénesis, cuatro etapas larvarias (L1-L4) que son definidas por un cambio de cutícula o muda y la etapa adulta. Estos nemátodos viven 20 días en promedio y su crecimiento poblacional es rápido [17].





**Figura 2.** El ciclo de vida del *C. elegans*. Se esquematiza el ciclo de vida de un hermafrodita en condiciones controladas de laboratorio y que comprende su desarrollo embrionario, las etapas larvarias y la etapa adulta. Imagen modificada de [18].

#### 4.3.1 El desarrollo embrionario

La embriogénesis comienza cuando un ovocito es fertilizado por un espermatozoide. Una vez fertilizado, el ovocito desarrolla una capa hecha principalmente de quitina y se forma un huevo o embrión resistente e impermeable al medio. Las primeras divisiones celulares del desarrollo embrionario ocurren dentro del útero, sin embargo, puede llevarse a cabo completamente fuera del hermafrodita. Este proceso puede dividirse en dos etapas, a la primera etapa se le conoce como etapa de proliferación, donde el cigoto se divide mitóticamente para originar cientos de células; en la segunda etapa, conocida como organogénesis, ocurre la morfogénesis, la elongación y se adquiere la forma de una larva. Durante la embriogénesis, una célula zigótica da lugar a una larva L1 de 558 células en 16 h a 20°C; sin embargo, durante este proceso se generan más células por medio de múltiples

divisiones mitóticas (628 células) y una quinta parte de ellas (113 células) son eliminadas por medio de apoptosis [19].

### **4.3.2 El estadio larvario**

El desarrollo post-embionario comienza cuando el embrión eclosiona y la larva L1 empieza a alimentarse. A partir de este momento comienza nuevamente la división de algunas células, aproximadamente el 10 por ciento de las células de un hermafrodita se dividen subsecuentemente para desarrollar los sistemas nervioso y reproductivo. Esta etapa tiene una duración de 14 h a 20°C. Al final de ésta y cada una de las siguientes etapas larvarias, la larva detiene el bombeo faríngeo, entra en breve letargo y lleva a cabo el cambio de cutícula o muda. En la etapa L2 ocurren un cuantas divisiones celulares en los sistemas nervioso y reproductivo. De manera paradójica, el desarrollo del sistema nervioso requiere de la eliminación de algunas neuronas recién generadas por medio de apoptosis. Esta etapa larvaria dura 10 h a 20°C hasta el siguiente letargo y cambio de cutícula. Durante la etapa larvaria L3 ocurren únicamente cambios en el sistema reproductivo; es posible observar la formación de la gónada y la especificación las células que darán lugar a la vulva. Durante la transición del estadio larvario L3/L4 las células germinales inician la meiosis y se diferencian en gametos masculinos. Esta etapa larvaria dura 10 h a 20°C hasta el siguiente letargo y cambio de cutícula. En la etapa L4 se concluye la formación de la gónada. Durante la muda del estadio larvario L4/adulto concluye la diferenciación de los gametos masculinos y las células germinales remanentes se diferencian a gametos sexuales femeninos. En la gónada somática ocurren cambios en neuronas y células del músculo para formar el aparato de ovoposición. Esta etapa dura 10 h a 20°C.

### **4.3.3 La etapa adulta**

En esta etapa se completa el ciclo de vida. Los hermafroditas adultos tienen un sistema reproductivo completamente desarrollado y producen únicamente ovocitos. Los ovocitos maduros producen un nuevo organismo por medio de autofertilización o fertilización con esperma de los machos. El periodo reproductivo continúa durante los

próximos 3-4 días de la etapa adulta y una vez que concluye los animales viven aproximadamente 10-15 días más.

#### **4.4 Anatomía de la gónada y la ovogénesis**

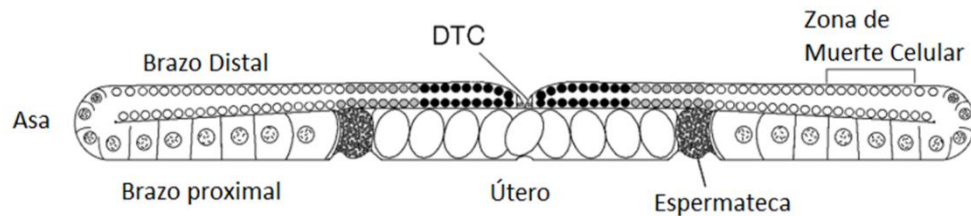
El sistema reproductivo del hermafrodita se conforma de dos estructuras tubulares o brazos de la gónada, en forma de U y dispuestos en un eje distal a proximal donde se unen ambos brazos de la gónada por medio de un útero común (Fig. 1). En la etapa L4, se producen aproximadamente 150 espermatozoides por cada brazo y son confinados en una estructura somática conocida como espermateca, subsecuentemente ocurre un cambio en la producción de gametos y se producen únicamente ovocitos durante el resto del ciclo vital. La mayor parte de la gónada se encuentra formando un sincicio, es decir, cada núcleo tiene membranas parciales que lo separa del resto de los núcleos, sin embargo, se conectan por un conducto citoplasmático llamado raquis o “core” de la gónada [20]. Por convención a cada núcleo, el citoplasma que lo rodea y sus membranas parciales en el sincicio se le denomina célula germinal [18]. En la parte distal de cada brazo de la gónada se encuentra una célula somática llamada célula de la punta distal (DTC), ésta mantiene a un grupo de células proliferando en mitosis por medio de una señal tipo Notch, es decir, una señalización que mantiene el destino celular por medio de la interacción de un receptor con su ligando. Conforme estas células se dividen y se alejan del nicho, pierden la señal de la DTC y entran en meiosis. Posteriormente algunas células completan su membrana celular de manera individual y dan lugar a un ovocito [21].

Durante la ovogénesis, en condiciones normales, más del 50 por ciento de las células que entran en meiosis son eliminadas por apoptosis en la salida de paquíteno. Se cree que las células excedentes, al ser eliminadas por apoptosis sirven para proveer material citoplasmático, organelos y otros componentes a aquellas células destinadas a ser ovocitos maduros [18, 22].

Los ovocitos más proximales al útero se encuentran en arrestados en diacinesis y se organizan en una hilera de uno a uno hasta celularizarse completamente. Antes de completar la celularización los ovocitos aumentan la cantidad de componentes celulares,

como ARNm, proteínas y organelos, por medio de un flujo citoplasmático dependiente de actina que introduce el vitelo producido en el intestino hacia los ovocitos. Finalmente, el ovocito más próximo a la espermateca lleva a cabo la maduración meiótica y es fertilizado cuando atraviesa la espermateca, este proceso ocurre cada 23 minutos aproximadamente (el rango oscila de 11 a 42 minutos) durante todo el ciclo reproductivo [23, 24].

Existe una regulación en la gónada del hermafrodita durante la ovogénesis, la cual responde a señales provenientes del medio como la presencia de alimento y de los espermatozoides, asegurando la producción de ovocitos únicamente en presencia de espermatozoides y condiciones favorables de alimentación [25]. Una vez que un ovocito es fertilizado, forma una cutícula rápidamente para evitar que otro espermatozoide se fusione, posteriormente se depositará en el útero y luego será expulsado al medio donde concluirá el desarrollo embrionario en aproximadamente 10 h a 20°C, eclosionando para dar lugar a una larva L1 y completar el ciclo de vida [18, 26, 27]. El éxito de la embriogénesis es el reflejo de la calidad de los ovocitos producidos [26].

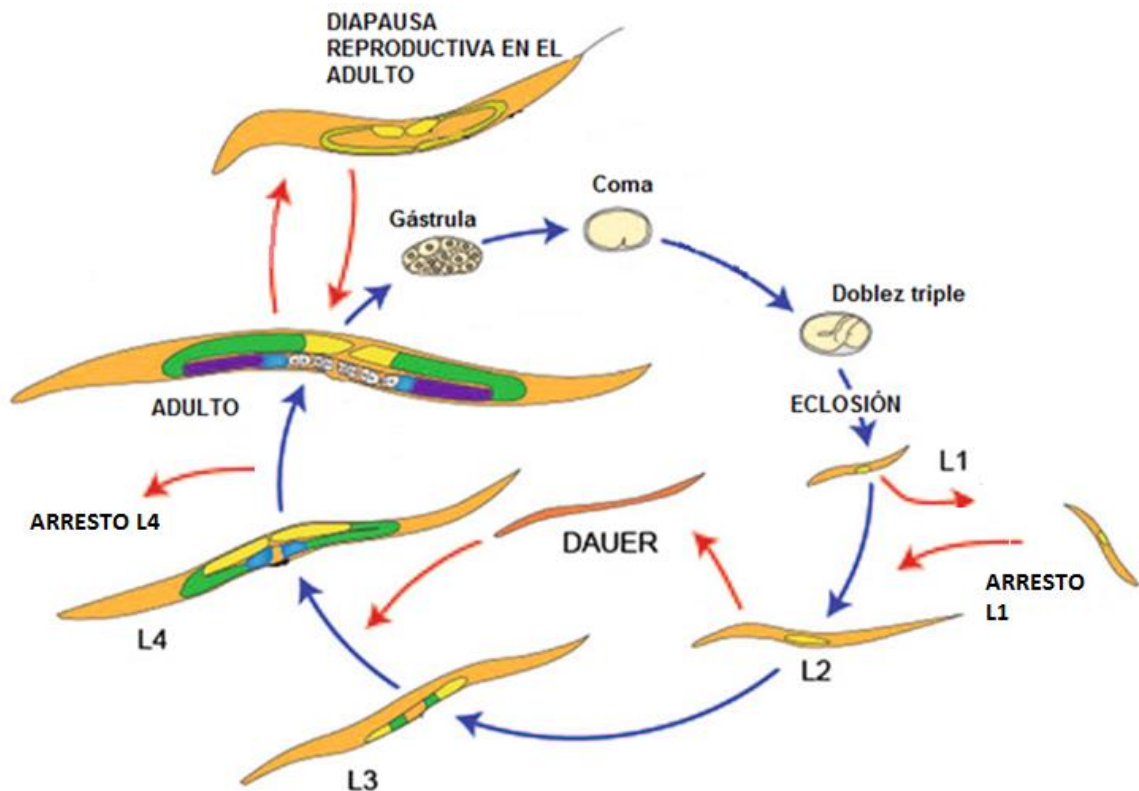


**Figura 3. La gónada del hermafrodita adulto de *C. elegans* esquematizada.** Los dos brazos de la gónada se encuentran unidos a un útero común. En la parte distal se encuentra un nicho de células proliferando en mitosis mediante una señal proveniente de la célula de la punta distal (DTC). Los núcleos entran en la zona de transición a meiosis I y progresan a paquíteno de la meiosis I. La diacinesis y la celularización comienzan en el asa. Los espermatozoides se encuentran en la espermateca. Imagen modificada de [28].

#### 4.5 Estados de diapausa y arrestos del ciclo de vida del *C. elegans*

Todos los organismos vivos se enfrentan a variaciones en la disponibilidad de nutrientes y han desarrollado mecanismos que les permiten adaptarse cuando los nutrientes

escasean. Particularmente, los organismos multicelulares han logrado coordinar respuestas adaptativas al ayuno y la realimentación por medio de respuestas sistémicas, en lugar de mecanismos celulares autónomos. Debido a ello, la disponibilidad de nutrientes impacta enormemente el ciclo biológico de los organismos (Ej., tasa de crecimiento, tamaño, comportamiento, fertilidad, entre otros) [29]. *C. elegans* tiene la capacidad de detener la progresión de su ciclo vital de manera reversible si las condiciones del medio son desfavorables. Ante estas condiciones disminuye sus funciones metabólicas y aumenta la resistencia al estrés [30]. A esas etapas alternas del desarrollo se les conoce como diapausa y arresto del ciclo vital. Las diapausas en el desarrollo de un organismo poseen tres características que las definen: el arresto del ciclo vital sucede en una etapa específica; el arresto en el ciclo vital y su recuperación son desencadenadas por señales ambientales; y los animales se preparan para el arresto previamente, modificando su metabolismo (Revisado a detalle [31]).



**Figura 4. Las etapas del desarrollo alternas al ciclo reproductivo.** Se esquematizan las diferentes etapas alternas y los arrestos del ciclo reproductivo. Un arresto del ciclo

reproductivo implica la detención en una etapa del ciclo reproductivo sin alterar significativamente las características morfológicas y fisiológicas de los animales; una diapausa implica dichos cambios y una regulación genética detallada. Imagen modificada de [18].

#### **4.5.1 El arresto en L1**

Los embriones que eclosionan en ausencia de alimento detienen su desarrollo larvario en la etapa L1 volviéndose resistentes al ayuno y aunque no exhiben cambios morfológicos evidentes, pueden vivir arrestadas en L1 varias semanas y continuar con su desarrollo si las condiciones del medio son re-establecidas. Con base en la clasificación Kostal (2006), el arresto en L1 no es una diapausa; el ayuno no es una señal ambiental, los embriones completan su desarrollo a expensas de las reservas maternas y las larvas recién eclosionadas no adaptan su metabolismo previamente para el arresto. La inducción al arresto en L1 al depender únicamente de la disponibilidad de alimento nos permite el entender el control nutricional del desarrollo de un organismo completo, independientemente de otros factores ambientales. El arresto en L1 es una característica importante del *C. elegans* como modelo de estudio debido a que se emplea como un método muy conveniente para sincronizar las poblaciones de animales [29]. Adicionalmente, la esperanza de vida de los animales es normal incluso después de haber sido arrestados en L1 por varias días, extendiendo su esperanza de vida total [32]. El ayuno en las larvas L1 causa una disminución en la función y tamaño de las mitocondrias individuales y una disminución en el número de copias de ADN mitocondrial dependiente de la autofagia no selectiva. En estas condiciones la fisión y fusión mitocondrial no desempeñan un rol en la supervivencia de los animales [33].

Las larvas L1 son resistentes al estrés y pueden ser almacenadas por años en congelación usando un medio amortiguado con glicerol [32]. Durante el arresto en L1 se incrementa la resistencia al choque de calor, estrés oxidativo, osmótico y anoxia. La resistencia a estos tipos de estrés depende de genes que promueven la supervivencia al

ayuno, mutantes de genes maestros para la respuesta al estrés, como el supresor de tumor *lin-35/Rb* [34], *daf-16/FoxO* [35, 36], el factor de choque de calor *hsf-1* [35], el ortólogo de *p53/cep-1* [37] y una metiltransferasa que repara proteínas dañadas *pcm-1/PCMT1* [38] exhiben menor supervivencia durante el arresto L1. Los análisis globales de expresión génica durante el arresto L1 sugieren que Rb sostiene la expresión de un “transcriptoma inducido por ayuno” e inhibe la expresión del “transcriptoma inducido por la re-alimentación” en neuronas e intestino. Su actividad afecta la expresión de otros genes implicados en diversos procesos celulares, dependientes e independientes de la vía de señalización de la insulina (IIS) y promueve la supervivencia parcialmente a través de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial [34].

#### **4.5.2 La diapausa Dauer**

La diapausa “Dauer” (por el alemán, duradero) fue descrita por primera vez en 1975 [39]. Es una etapa alterna al desarrollo reproductivo que ocurre si las larvas en etapa L1 tardía se exponen a diferentes condiciones de estrés, resultando en cambios morfológicos y fisiológicos que las vuelven resistentes al estrés, pudiendo vivir por varios meses [30]. Existen tres factores ambientales determinantes para inducir la entrada y mantenimiento de la diapausa dauer; alta densidad de población, fuente de alimento limitada y temperatura elevada, siendo la densidad de población la más importante, ya que en estas condiciones se acumula una feromona constitutiva producida por los animales y es la responsable de los cambios de comportamiento y metabólicos que ocurren durante esta diapausa [40].

Antes de la muda a larva dauer, los animales se alimentan y almacenan lípidos y carbohidratos. Durante la morfogénesis no se alimentan y llevan a cabo los cambios que las diferencian de las larvas que se desarrollan en condiciones de alimento. Exhiben constricciones radiales y poseen una cutícula especializada con una estructura denominada “ala”. Sus orificios se encuentran cerrados por medio de un tapón interno, su faringe está contraída y no exhibe bombeo. Una vez en diapausa, los animales obtienen energía de sus reservas, convierten los lípidos en glucosa a través del ciclo del glioxilato. La respiración aeróbica es suprimida para favorecer a la glicólisis y el metabolismo fermentativo. Los cambios que acompañan a esta diapausa son reversibles, una vez que las condiciones se re-

establecen, las larvas dauer pueden retomar el ciclo reproductivo, sin alterar su esperanza de vida a pesar de haber permanecido en diapausa por días o meses [30, 40, 41].

La entrada a la diapausa dauer está controlada por más de 30 genes. Existen genes que al ser mutados causan la entrada en diapausa independientemente de las condiciones del medio y se les conoce como mutantes constitutivas (Daf-c; por sus siglas en inglés *Dauer formation*), por otra parte, hay mutantes que son defectuosas para la entrada a la diapausa (Daf-d). El estudio de la regulación de la diapausa dauer ha identificado una serie de vías metabólicas que gobiernan distintos procesos durante la entrada, el mantenimiento y la salida de la diapausa dauer, así como sus cambios morfogénicos. Las vías identificadas incluyen componentes de las neuronas sensoriales, la señalización del GMPc y la neurotransmisión serotoninérgica, que a su vez tienen un efecto en la vía del TGF- $\beta$  y la vía de la insulina (IIS). Finalmente, estas vías convergen en las cascadas transcripcionales de los receptores hormonales esteroideos que definen la decisión de la diapausa dauer [30].

El sistema nervioso desempeña un rol muy importante durante la diapausa dauer, la ablación de algunas neuronas de la cabeza del *C. elegans* durante la etapa L1 da como resultado la entrada a dauer aún en presencia de alimento, sin embargo, el mantenimiento en la diapausa es limitado. Existen más de 1,000 receptores acoplados de proteína-G (GPCRs) y se cree que algunos de ellos detectan la feromona dauer, así como señales provenientes de los nutrientes, lo que determina la entrada a dauer. La señalización del GMPc es crítica para la transducción neurosensitiva, induciendo la entrada a dauer cuando los niveles de GMPc son bajos. La vía de señalización del TGF- $\beta$  es una de las vías que regulan la entrada a dauer y se encuentra relacionada con la vía de la insulina (IIS) para promover la supervivencia y la resistencia a estrés durante esta diapausa [30].

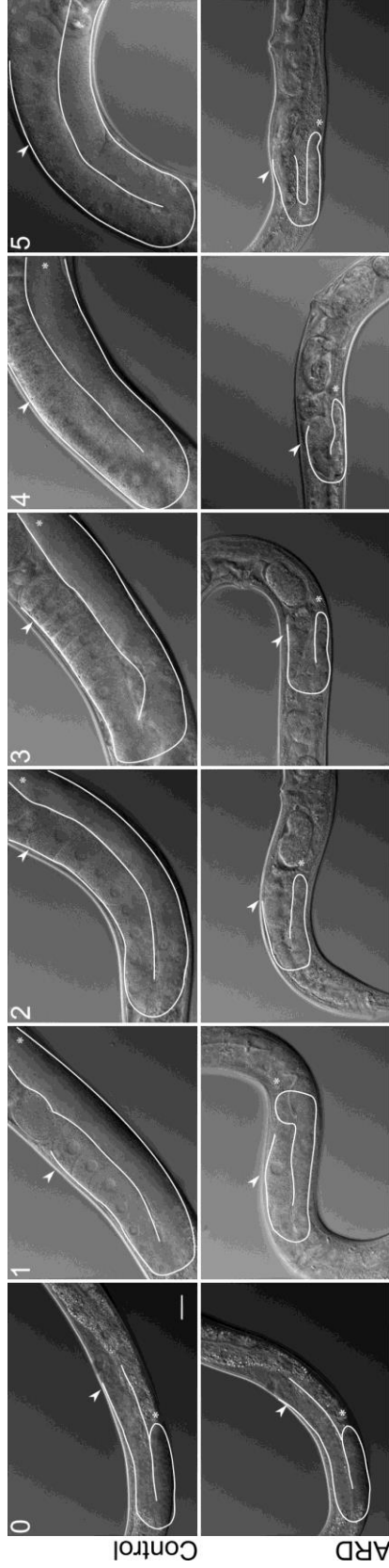
Las larvas dauer exhiben mayor resistencia a todos los tipos de estrés, como el ayuno, choque de calor y oxidativo. Esta respuesta se asocia íntimamente con la extensión en la esperanza de vida durante la diapausa dauer, es decir, algunos animales mutantes con un aumento en su esperanza de vida son también resistentes a muchos tipos de estrés, como el choque de calor, estrés oxidativo, radiación UV, entre otros [30].



### 4.5.3 La diapausa reproductiva del adulto

La diapausa reproductiva del adulto (ARD) fue descrita por primera vez en 2009 por Angelo y van Gilst mientras estudiaban la respuesta al ayuno durante la etapa L4 [42]. Ocurre cuando se priva de alimento a los hermafroditas en la etapa L4 intermedio o adulto por periodos prolongados, ocasionando una infertilidad reversible y la extensión de la esperanza de vida [42, 43]. A diferencia de la diapausa dauer, el ayuno es el único factor ambiental necesario para inducir la entrada a esta etapa alterna del desarrollo, no se requiere la producción de una feromona específica para entrar o mantener esta respuesta [43]. Por otra parte, para inducir la entrada a esta etapa alterna del desarrollo es necesario que los hermafroditas hayan iniciado la ovogénesis; al ayunar hermafroditas en etapa L4 temprana se induce un arresto en esta etapa, adicionalmente, al ayunar hermafroditas en etapa L4 tardía o adultos se produce una retención de embriones *In Utero*, los cuales eclosionan dentro del hermafrodita ocasionando su muerte, sin embargo, si la viabilidad de los embriones se compromete (química o genéticamente), se favorece la entrada a esta etapa alterna del desarrollo incluso en los hermafroditas de la etapa L4 tardía o adultos [43].

Durante esta etapa alterna del desarrollo, los animales exhiben cambios morfológicos y fisiológicos que los distinguen de los hermafroditas bien alimentados. Los hermafroditas ayunados exhiben signos de envejecimiento a nivel somático y detienen la producción de embriones, a pesar de ello es posible observar algunos embriones dentro del útero, cuya viabilidad se encuentra comprometida. Los animales ayunados lucen traslúcidos y más delgados, además, sus gónadas se encogen y el total de células germinales disminuye progresivamente conforme transcurre el ayuno hasta llegar a un número mínimo que permanece aparentemente constante en estas condiciones. El ayuno ocasiona una disminución en la proliferación de las células germinales que se dividen mitóticamente, éstas entran en una fase de quiescencia independiente de la señalización GLP-1/Notch, la progresión de la meiosis se ralentiza y afecta la producción de embriones, en conjunto, estos procesos dan como resultado la reducción en el tamaño de la gónada (Fig. 5).



**Figura 5. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno durante la ARD.** En la fila superior se muestra el desarrollo normal de un brazo de la gónada en condiciones control con comida a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 5 días. En la fila inferior se muestra el tamaño de la gónada en ayuno a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 5 días. Fotografías Nomarski 40x, la escala indica 20  $\mu\text{m}$ . Se muestra delineado el contorno de un brazo de la gónada. La cabeza de flecha indica la gónada proximal. El asterisco muestra la gónada distal. Carranza-García y Navarro, 2019.

Estos efectos son reversibles cuando las condiciones se vuelven favorables, dando lugar a la recuperación del tamaño de la gónada y la fertilidad [25, 44-46]. Adicionalmente, los animales lucen completamente rejuvenecidos, es decir, llevan a cabo procesos fisiológicos como la motilidad o el bombeo faríngeo de manera comparable a los animales que nunca fueron ayunados y cumplen normalmente con el ciclo de vida post-reproductivo, independientemente del tiempo que hayan pasado en diáspausa [42, 47].

La entrada en esta etapa alterna del desarrollo depende del receptor del factor nuclear de hepatocitos 4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ /NHR-49), el cual es necesario para la inducción de genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos y gluconeogénesis en respuesta al ayuno [42, 48]. La recuperación de los animales sometidos a la ARD al ser realimentados no depende de las divisiones celulares somáticas, de la replicación mitocondrial, la activación del ciclo celular ni de señales provenientes de las células germinales. Al realimentar a una cepa de animales mutantes que carecen de células germinales y que fueron sometidos a la ARD, éstos son capaces de re-establecer su tamaño corporal, la motilidad y el bombeo faríngeo de manera habitual ya que dicha recuperación es controlada a nivel molecular por medio del metabolismo del ARN, la reactivación de las funciones del nucléolo, síntesis de ARN ribosomal y la expansión del ARN total dentro de las células. Los animales tratados con 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUDR) no son capaces de recuperarse después de la ARD, debido a la inhibición de la reactivación del nucléolo, el procesamiento del ARN ribosomal y la biosíntesis del ARN total causada por el FUDR [47].

La resistencia a otros tipos de estrés en los hermafroditas durante esta etapa alterna al desarrollo no ha sido estudiada.

#### **4.6 La regulación de la apoptosis de las células germinales**

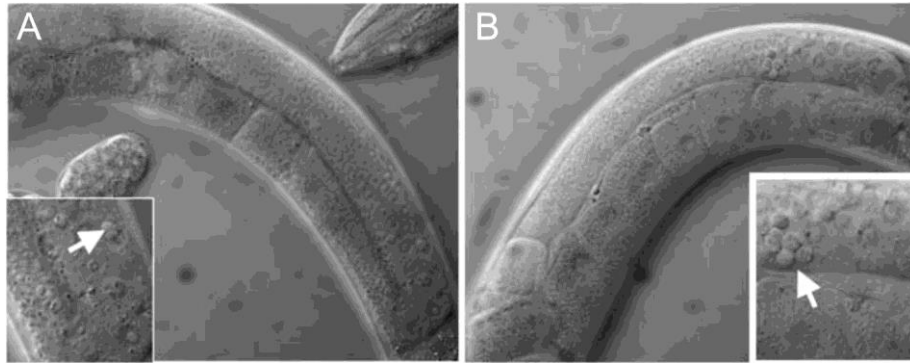
La apoptosis de las células germinales en la gónada del *C. elegans* hermafrodita fue descrita por primera vez en 1999 por Gumienny y colaboradores. Este proceso es ejecutado por la maquinaria central de la apoptosis, CED-3, CED-4 y CED-9. CED-9/Bcl-2 se encuentra formando un complejo con CED-4/Apaf-1. Este complejo evita la actividad

proapoptótica de CED-4. Al existir una señal de apoptosis, este complejo se disocia y se lleva a cabo la activación de CED-3, la única caspasa efectora conocida en *C. elegans* [26, 49] ocasionando la muerte de la célula, la cual es aislada del resto de las células, formando un cuerpo apoptótico. Los cuerpos apoptóticos en la gónada de los hermafroditas son estructuras condensadas altamente refráctiles que pueden observarse en la región de paquíteno de la meiosis I. Una vez que una célula será eliminada por medio de apoptosis, se forma un cuerpo apoptótico en 20 minutos aproximadamente y es fagocitado completamente una hora después de haber aparecido gracias a la actividad de invaginaciones de la membrana celular de la gónada somática [28].

En condiciones normales es posible observar de 1 a 5 cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada de los hermafroditas adultos, este número aumenta con la edad del gusano. A este tipo de apoptosis se le conoce como fisiológica y ocurre en condiciones normales una vez que inicia la ovogénesis, por consiguiente, es exclusiva de los hermafroditas adultos. Mutaciones en los genes *ced-4* o *ced-3* evitan la formación de cuerpos apoptóticos [49]. La apoptosis fisiológica es necesaria para mantener la calidad de los ovocitos. Los animales mutantes en *ced-3* no eliminan células por apoptosis en la gónada, producen ovocitos de tamaño y aspecto normal al inicio de la ovogénesis, después producen ovocitos pequeños, dando como resultado un menor número en la progenie y mayor letalidad embrionaria [26]. Algunos autores sugieren que la apoptosis promueve la distribución correcta de los recursos producidos por todas las células germinales durante la ovogénesis. La ausencia de apoptosis resulta en un aumento gradual del número de células germinales dentro del sincicio y menor disponibilidad de recursos para aquellas que deben llegar a ser ovocitos [26, 28].

La apoptosis de la gónada puede ser inducida por distintos tipos de estrés, 6 horas de ayuno ocasionan un aumento del doble en el número de cuerpos apoptóticos debido a un incremento en la expresión de *lin-35*, el ortólogo de retinoblastoma (Rb), lo cual resulta en la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica *ced-9/Bcl-2*. Se sabe que durante el ayuno existe una disminución en la traducción de muchos ARNm, incluido el de

*ced-9*, sin embargo, el de *lin-35* es traducido de manera eficiente, acumulando LIN-35 y disminuyendo CED-9, resultando en el aumento de la apoptosis (Fig. 6) [50].



**Figura 6. El ayuno induce la apoptosis de las células germinales.** Imágenes Nomarski de un brazo de la gónada de hermafroditas adultos en condiciones control con comida (A) y sometidos a un ayuno de 6 h (B). Las flechas indican los cuerpos apoptóticos en la región de interés amplificada. Modificada de [46].

Angelo y van Gilst [42] reportaron que al ayunar animales mutantes de la caspasa *ced-3(n1286)*, éstos no reducen el tamaño de la gónada durante la diapausa. Adicionalmente, cuando los animales *ced-3(n1286)* son ayunados por periodos prolongados y re-alimentados, no son capaces de recuperar la fertilidad, atribuyéndole a la apoptosis un papel esencial durante la reducción de la gónada y la recuperación de la fertilidad [42].

#### 4.7 La regulación genética de la calidad de los ovocitos

La calidad de vida es el reflejo de las funciones biológicas, la edad es un factor que contribuye a la disminución progresiva de dichas funciones. La fertilidad es una de las primeras funciones biológicas que se ven afectadas por la edad en muchos organismos, en las mujeres existe una pérdida progresiva de folículos en los ovarios que resulta en el término del periodo reproductivo o menopausia entre los 45 y 55 años, sin embargo, el riesgo de infertilidad, defectos de nacimiento o abortos espontáneos comienza a aumentar desde una década antes [51]. En *C. elegans*, al igual que en humanos, la calidad de los ovocitos disminuye con la edad; aumentando los errores en disyunción en los cromosomas

somáticos y sexual, dando como resultado letalidad embrionaria y alta incidencia de machos, respectivamente. Además, la capacidad de los ovocitos para ser fertilizados, su resistencia a estrés y morfología también se ven alterados con la edad [52].

La disponibilidad de nutrientes es de suma importancia para el proceso reproductivo debido al gasto energético que involucra. La restricción calórica ocasiona una reducción en el número de prole pero retrasa la senescencia reproductiva (Hughes *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2009). Los mecanismos moleculares por medio de los cuales se regula la fertilidad y la esperanza de vida son complejos y no se han descrito totalmente. Se sabe que las vías de la insulina, mTOR y AMPK desempeñan un papel importante en la regulación de la fertilidad. La vía de la insulina (IIS) regula el envejecimiento en muchas especies, desde gusano hasta humano, la reducción de la actividad de esta vía retrasa el término del ciclo reproductivo [53-56]. La señalización del TGF- $\beta$  también desempeña un papel importante en la duración del ciclo reproductivo, mediante un mecanismo molecular independiente de la vía de la insulina, la restricción calórica, la contribución de los espermatozoides y la tasa de ovulación. La disminución de la actividad de cualquiera de ambas vías da como resultado no solo una extensión del ciclo reproductivo, sino un incremento en la calidad de los ovocitos y el mantenimiento de la proliferación en la gónada distal, reflejo de un menor número de anormalidades en la disyunción de los cromosomas somáticos y sexual, mayor capacidad de fertilización y mejor morfología. La regulación de la calidad de los ovocitos mediante la vía de la insulina o el TGF- $\beta$  ocurre de manera no-autónoma, desde los tejidos somáticos hacia la línea germinal [52].

## **5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Diversos tipos de estrés afectan la fertilidad y modifican la respuesta a otros tipos de estrés en distintos organismos. En el nemátodo *C. elegans* adulto, el ayuno prolongado causa la reducción del número de células germinales en la gónada y retrasa la reproducción. Sin embargo, al realimentar a los animales ayunados, se recupera el número de células germinales y la fertilidad pero se desconocen los efectos que tiene el ayuno prolongado en la calidad de los ovocitos. Adicionalmente, el ayuno altera la respuesta al estrés durante el arresto L1 y la etapa Dauer. Sin embargo, se desconoce si el ayuno prolongado a partir de la etapa L4 intermedia modifica la resistencia a otros tipos de estrés.

## **6 HIPÓTESIS**

Proponemos que cuando el *C. elegans* es sometido a la diapausa reproductiva del adulto, la calidad de los ovocitos se verá afectada, mientras que se modificará su resistencia al choque de calor o al estrés oxidativo.

## **7 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto de la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno durante la diapausa reproductiva del *C. elegans* sobre el éxito de un ovocito para dar lugar a un embrión capaz de completar su desarrollo, como reflejo de la calidad de un ovocito y su regulación molecular.

### **7.1 Objetivos particulares**

- Estudiar el efecto de la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno en la producción de células germinales.
- Determinar la contribución de la apoptosis durante respuesta ovogénica de la gónada al ayuno.
- Estudiar la respuesta a otros tipos de estrés durante la ARD.
- Elucidar el mecanismo molecular por medio del cual se reduce la gónada durante la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno.



## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Cepas

Todas las cepas de *C. elegans* fueron mantenidas de acuerdo con los procedimientos estándar [57]. Todas las cepas fueron mantenidas a 20°C o a la temperatura permisiva usando *Escherichia coli* OP50 como alimento. Se emplearon las siguientes cepas: silvestre N2 var. Bristol. Para los experimentos de *daf-2*, 15°C y 25°C fueron usados como las temperaturas permisiva y restrictiva, respectivamente. Los animales heterócigos de la cepa EU31 *skn-1(zu135)* segregan animales Unc y silvestres, los animales Unc fueron seleccionados para el mantenimiento y los animales que se mueven de manera silvestre producen embriones que no eclosionan. Para los experimentos con la cepa *fog-1(q253)* las temperaturas de 15°C y 25°C fueron usadas como las temperaturas permisiva y restrictiva, respectivamente. Los animales *fog-1(q253)* se mantuvieron a 15°C, posteriormente, los animales en la etapa L1 fueron incubados a 25°C para feminizar su línea germinal. Los siguientes alelos fueron empleados durante el presente trabajo: JK560 *fog-1(q253)*, CB4108 *fog-2(q71)*, JK987 *tra-2(q276)/mmC1*, MD701 *ced-1::gfp(bcIs39)*, *cep-1(gk138);ced-1::gfp(bcIs39)*, MT3002 *ced-3(n1286)*, RB2071 *ced-3(ok2734)*, MT1522 *ced-3(n717)*, CB1370 *daf-2(e1370)*, DR1574 *daf-2(e1391)*, DR1942 *daf-2(e979)*, DR608 *daf-2(m212)*, DR1565 *daf-2(m596)*, DR1567 *daf-2(m577)*, DR1564 *daf-2(m41)*, DR1568 *daf-2(e1371)*, DR1309 *daf-16(m26);daf-2(e1370)*, MT10430 *lin-35(n745)*, GR1307 *daf-16(mgDf50)*, EU31 *skn-1(zu135)*, SM190 *pha-4(zu225)*, VC446 *alg-1(gk214)*, RB1206 *rsk-1(ok1255)*, SS712 *ife-1(bn127)*, WS2973 *gla-3(op212)*, RN083 *daf-2(e1370);ced-1::gfp*, RN084 *lin-35(n745);ced-1::gfp*, CF1553 *sod-3::gfp(muIs84)*, TJ375 *hsp-16.2::gfp(gpIs1)*, RN69 *mai-2::gfp(xmSi26)*, DG3922 *tiar-1::gfp(tm1545)*, RB794 *nhr-49(nr2041)*. Todas las cepas fueron obtenidas del Centro de Genética del Caenorhabditis (CGC).

El medio de cultivo NGM lite se preparó de acuerdo con la siguiente fórmula: 2 g de NaCl, 4 g de bacto triptona, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.008 g de colesterol y 20 g de agar. Estos componentes se mezclaron y fueron aforados a 1 L de agua. Se esterilizó

en autoclave por 20 minutos, 120°C y 15 lb de presión. Una vez estéril, el medio de cultivo se vertió en cajas Petri desechables estériles de 10, 5 y 2.5 cm de diámetro.

Una vez solidificadas se adicionó una suspensión de bacterias *E. coli* OP50 en medio Luria-Bertani (LB). La composición del medio líquido LB fue la siguiente: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Esta solución se esterilizó en autoclave usando el ciclo descrito anteriormente. Una vez estéril, el medio LB se adicionó con 50 µg/ml de estreptomicina y fue inoculado con *E. coli* OP50. El cultivo se incubó en agitación constante a 37°C toda la noche.

La solución tamponada M9 empleada tiene la siguiente composición: 6 g de NaHPO<sub>4</sub>, 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g de NaCl y 0.25 de MgSO<sub>4</sub> • 7 H<sub>2</sub>O en un litro de agua y se esterilizó en autoclave usando el ciclo descrito anteriormente.

## **8.2 Ensayos de ayuno**

Los animales se propagaron en medio sólido NGM lite y *Escherichia coli* OP50 como alimento. Para obtener una población sincronizada de animales se llevó a cabo la lisis de hermafroditas grávidos con una solución de 12:2:1 de M9: NaHClO comercial: NaOH 5M y se extrajeron los embriones intactos. Se lavaron 5 veces con medio M9 por centrifugación para eliminar los agentes químicos [43]. Los embriones se suspendieron en tubos cónicos con 5 ml de M9 y se incubaron a 20°C sobre una plataforma de agitación toda la noche. Una vez que eclosionaron en ausencia de alimento las larvas permanecen como L1, obteniendo así una población sincronizada.

Las larvas L1 se hicieron crecer en cajas con medio NGM sólido y *E. coli* OP50 hasta que alcanzaron la etapa L4 intermedia, aproximadamente en 60 h a 15°C; 48 h a 20°C y 36 h a 25°C. Las larvas L4 intermedio fueron colectadas con M9 y centrifugadas a 200 g por un minuto para eliminar el sobrenadante que contenía a las bacterias, este

procedimiento se repitió 6 veces usando 15 ml de M9 en cada lavado. Las larvas fueron colocadas en cajas sin comida, para el ayuno y en cajas con alimento como control [44].

### **8.3 Cuantificación de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada**

Para cuantificar los cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada y determinar el tamaño de la gónada se empleó el transgénico *ced-1::gfp(bcIs39)*, el cual expresa la proteína verde fluorescente junto a la proteína CED-1 bajo el promotor de *lim-7*, lo cual resulta en la expresión de la proteína verde fluorescente durante la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos formados en la gónada al ser eliminados por la maquinaria de degradación de las células de la gónada somática [58].

Se emplearon poblaciones de animales de cada fondo genético y condición y fueron montados sobre colchones de agarosa 2% usando 20  $\mu$ l de tetramizol 10 mM disuelto en M9 como anestésico.

### **8.4 Cuantificación de células germinales por brazo de la gónada**

Los animales de cada condición fueron montados en un cubreobjetos para tinciones con 30  $\mu$ l de M9 adicionado 1  $\mu$ l de tetramizol para diseccionarlos. Una vez diseccionados se colocaron sobre un portaobjetos con polilisina bien etiquetado, los cuales se preparan previo al experimento con 20  $\mu$ l de una solución de polilisina y dejados secar por 10 min sobre una parrilla eléctrica a temperatura media. Los cubreobjetos colocados sobre un portaobjetos con polilisina se introducen inmediatamente a una cuba de nitrógeno líquido para ser congelados. Después se sacan de la cuba, se remueve el cubreobjetos y se ponen en contacto con la solución fijadora (5 ml de formol 37%, 300  $\mu$ l de una solución de  $K_2HPO_4$  1M y 40 ml de metanol) dentro de un tarro para tinciones por 5 min a  $-20^\circ C$ . Se sacan de la solución fijadora y se secan cuidadosamente a partir de las orillas del portaobjetos sin remover la muestra, se tiñen con cloruro de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda protegida de la luz y al transcurrir 10

min se lavan en otro tarro con solución amortiguadora de fosfatos + Tween® 20 por 10 min. Finalmente se retira el exceso de líquido cuidadosamente, se colocan 10 µl de VectaShield®, un cubreobjetos nuevo y se sellan con barniz.

### **8.5 Visualización del proceso de degradación de cuerpos apoptóticos en la gónada**

Se determinó el tiempo que tardan en ser degradados los cuerpos apoptóticos empleando una técnica de inmovilización mecánica con microesferas de poliestireno, evitando el uso de anestésicos que pudieran interferir con dicho proceso [59]. Para conseguirlo, se ayunó una población de animales en etapa L4 intermedia, como se describió anteriormente y se colocaron en cajas con comida y sin comida. Se colectó una población de animales control y en diapausa a las 0, 24, 48 y 72 h post-L4 intermedio. Se prepararon colchones de agarosa 10%, se colocaron 0.5 µl de la suspensión de microesferas de poliestireno al colchón de agarosa y 20 animales para visualizarlos. Una vez que se encontró un cuerpo apoptótico en la gónada, se tomó una imagen en intervalos de 10 minutos hasta que el cuerpo apoptótico fue degradado.

### **8.6 Cuantificación de progenie, letalidad embrionaria e incidencia de machos**

Se determinó el número de progenie producida por autofertilización y cruza siguiendo el método descrito en [60].

Para las condiciones control, se sincronizó una población de animales silvestres y se alimentaron hasta llegar a L4 intermedio, se transfirieron de manera individual a cajas Petri con comida, se transfirieron diariamente a cajas frescas con comida hasta que dejaron de producir embriones. Para determinar la calidad de los ovocitos producidos después de la diapausa, se sincronizó una población de animales y las larvas L1 fueron crecidas en cajas con comida hasta llegar a L4 intermedio. Los animales fueron ayunados por 5 días. Posteriormente, los animales fueron colocados de manera individual en cajas Petri con comida, se transfirieron diariamente a cajas frescas hasta que dejaron de producir

embriones. 24 h después de transferir los animales a la caja nueva con comida se cuantificaron los embriones que no eclosionaron y se consideraron como embriones muertos. 48 h después de transferir los animales a la caja nueva con comida se cuantificaron las larvas vivas y el número de machos presentes para establecer el porcentaje de letalidad embrionaria y machos con respecto al total de progenie producida por cada animal.

### **8.7 Ensayo de choque de calor**

Para inducir estrés por choque de calor se empleó la metodología descrita en [61]. Los animales fueron sometidos al estrés en cajas de 35 mm con NGM selladas con una película de parafina flexible en un baño de agua a 31°C por 3 h. Los animales del grupo control permanecieron en cajas de NGM a 20°C el mismo periodo que el choque de calor. En cada ensayo se emplearon al menos 30 animales por placa, los cuales fueron visualizados bajo microscopía de epifluorescencia a la misma exposición.

La supervivencia al choque de calor se determinó en cajas Petri de 35 mm selladas con una película de parafina flexible dentro de una incubadora previamente atemperada a 36°C, cada intervalo de tiempo se retiraron de la incubadora un grupo de cajas con animales en ayuno y control, se determinó la supervivencia de los animales en cada caja Petri, tocando la cabeza de cada animal y observando su respuesta, los animales que no respondían al estímulo fueron considerados muertos.

### **8.8 Ensayo de resistencia al SDS**

Se empleó el método descrito en [39] con algunas modificaciones. Se emplearon hermafroditas L4 intermedio ayunadas por 5 días y hermafroditas de 5 días de edad que nunca fueron ayunadas como control, ambos grupos fueron puestos en contacto con 200 µl de una solución que contenía dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% en placas de NGM sin comida por 20 minutos. Posteriormente, se verificó el número de animales sobrevivientes bajo el microscopio de disección. Adicionalmente, una población de larvas dauer obtenidas

a partir de la mutante termosensible *daf-2(e1370)* fue sometida a las mismas condiciones como control positivo.

### **8.9 Tasa de ovulación**

Seguimos la metodología descrita en [62]. Los animales fueron montados individualmente en colchones de agarosa sin anestesia en el microscopio Nomarski para determinar el número de embriones presentes dentro del útero de cada animal, después se transfirieron a cajas Petri con comida por un periodo definido y finalmente, se montaron en colchones de agarosa para determinar el número de embriones dentro del útero al final del periodo indicado y los embriones depositados en la placa Petri. La tasa de ovulación por brazo de la gónada por h = (embriones al final del intervalo – embriones al inicio) / (2 x número de animales analizados x intervalo).

### **8.10 Silenciamiento de genes por ARNi**

Llevamos a cabo experimentos de silenciamiento por medio de ARNi de acuerdo a los métodos estándar descritos por [63, 64]. Las clonas de interés fueron obtenidas a partir de la biblioteca de ARNi (OpenBiosystems) y confirmadas por secuenciación. El silenciamiento fue llevado a cabo por alimentación de los animales con bacterias que expresan las clonas de interés. Brevemente, el plásmido pPD129.36 (PV) y las clonas de interés fueron crecidas en la cepa de *E. coli* HT115 (DE3). Las clonas fueron cultivadas toda la noche en un caldo LB suplementado con 50mg/ml de ampicilina y 2.5 mg/ml de tetraciclina.

### **8.11 Microscopía**

Los animales fueron anestesiados con 10 µl de tetramizol al 0.01% sobre colchones de agarosa al 2% y observados bajo un microscopio Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara AxioCam MRc (Zeiss). Las imágenes fueron obtenidas por medio del software Axio Vision (Zeiss).

## **8.12 Análisis estadístico**

Se empleó la prueba de t para comparaciones entre los animales silvestres en condiciones control y recuperados en los ensayos de progenie, letalidad embrionaria, incidencia de machos y esperanza de vida. Para comparaciones múltiples en los ensayos de apoptosis, progenie, letalidad embrionaria, incidencia de machos y tiempo de degradación de cuerpos apoptóticos, los datos obtenidos como valores de la media por grupo fueron comparados usando el análisis de varianza ANOVA unidireccional. La prueba de Dunn fue usada para ajustar las comparaciones múltiples. Para las curvas de supervivencia al choque de calor se empleó la prueba de rango logarítmico en conjunto con la prueba de Holm-Sidak para comparaciones múltiples.

## **9 RESULTADOS**

### **9.1 El ayuno prolongado afecta la fertilidad**

Los nutrientes desempeñan un papel vital para todos los procesos biológicos como el crecimiento, la reproducción y el mantenimiento de la homeostasis [53]. Muchos organismos han desarrollado estrategias para contender las condiciones ambientales adversas, como la escasez de alimento, hasta que dichas condiciones sean reestablecidas [65]. En *Drosophila*, se ha documentado la reducción en la producción de óvulos en respuesta a la falta de alimento, debido a una disminución en la proliferación de las células germinales y progenitoras foliculares y a un aumento en la apoptosis dentro del ovario [66, 67]. *C. elegans* reduce el tamaño de su gónada en respuesta al ayuno y detiene la producción de embriones, este fenómeno es reversible si las condiciones se reestablecen [42, 43], sin embargo, se desconoce el efecto de esta respuesta en la calidad de los ovocitos que se producen después de este tipo de estrés.

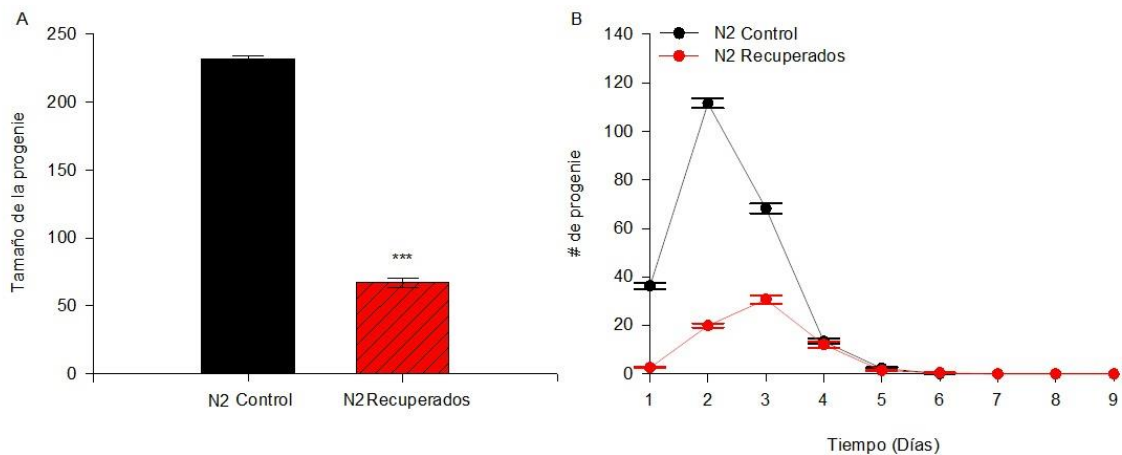
#### **9.1.1 Los animales que experimentan la ARD no recuperan la fertilidad completamente debido a que esta condición afecta la calidad de las células germinales**

En el presente trabajo estudiamos cómo se afecta la fertilidad y la calidad de las células germinales después de someter a los animales a la diapausa reproductiva del adulto. Aunque se ha reportado que los animales silvestres sobreviven hasta 30 días en la ARD, su fertilidad se afecta enormemente después de permanecer 15 días en ayuno [42]. Por consiguiente, decidimos estudiar el efecto de la ARD cuando los animales son expuestos a 5 días de ayuno ya que este periodo es suficiente para reducir la fertilidad de un hermafrodita hasta en un 50% [42].

Para llevar a cabo estos experimentos, usamos poblaciones sincronizadas de animales silvestres a partir de la etapa L4 intermedio que fueron ayunadas (sin alimento) por 5 días y realimentadas, para fines prácticos nos referiremos a estos animales como



“recuperados”. Como control se utilizaron animales a partir de la etapa L4 intermedio que fueron alimentados por 5 días. Se determinó el tamaño de progenie producida por autofertilización de los animales recuperados y se comparó con la de los animales control. Encontramos que los animales recuperados producen 29% menos hijos que los animales control (Tabla 1, Fig. 7A). Posteriormente, analizamos el número de hijos producidos por autofertilización por día en ambas condiciones. Observamos que los animales recuperados producen menos progenie que el control. Después de los primeros dos días de ser realimentados la producción de progenie llega a su máximo y finalmente cesa al quinto día (Fig. 7B). Dicho fenómeno parece deberse al tiempo que toma la regeneración de la gónada, lo cual ocurre en aproximadamente 2 días después de la realimentación.



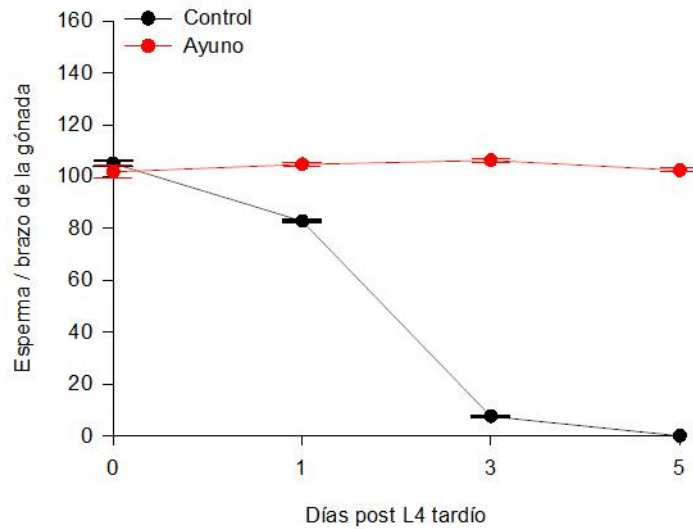
**Figura 7. El ayuno prolongado afecta la fertilidad.** (A) Conteos de progenie total producida por autofertilización de animales control (barra negra) y animales recuperados (barra roja). La gráfica muestra el promedio de la progenie producida en 8 experimentos independientes, las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba t-student (\*\* P<0.01). (B) Análisis de la producción de hijos día a día producida por autofertilización de animales control (línea negra) y recuperados (línea roja).

Tabla 1. Ensayos de fertilidad en diferentes fondos genéticos usados en el presente trabajo.

Genotipo	Tamaño de la progenie		Embriones muertos	N	Machos (%)	N
N2	231.8 ± 2.3		2.1 ± 0.1	144	0.01	34
N2 recuperados	67.0 ± 2.9	***	3.8 ± 0.3	***	0.29	* 33
N2 control x machos N2	424.9 ± 8.3		2.6 ± 0.3	22		
N2 recuperados x machos N2	344.8 ± 26.3	n.s.	2.8 ± 0.6	n.s.		17
<i>fog-2(q71)</i> Control x machos N2	324.5 ± 6.5		2.4 ± 0.3	46		
<i>fog-2(q71)</i> recuperados x machos N2	183.2 ± 5.6	*	4.0 ± 0.3	*		42
<i>fog-2(q71)</i> diacinesis prolongada x machos N2	55.8 ± 2.3	*	4.8 ± 0.2	*		51
<i>fog-1(q253)</i> Control x machos N2	302.3 ± 7.0		2.5 ± 0.1	31		
<i>fog-1(q253)</i> recuperados x machos N2	177.1 ± 3.3	*	4.4 ± 0.2	*		35
<i>fog-1(q253)</i> diacinesis prolongada x machos N2	65.0 ± 1.6	*	5.6 ± 0.1	*		39
<i>ced-3(n717)</i> control	141.0 ± 2.6		8.1 ± 0.7	43		
<i>ced-3(n717)</i> recuperados	53.1 ± 1.8	*	7.3 ± 0.5	*		41
<i>ced-3(n1286)</i> control	143.8 ± 3.2		7.5 ± 0.4	88		
<i>ced-3(n1286)</i> recuperados	52.0 ± 2.3	***	12.3 ± 0.8	*		58
<i>ced-3(n717)</i> control x machos N2	315.6 ± 8.6		19.8 ± 3.0	11		
<i>ced-3(n717)</i> recuperados x machos N2	248.9 ± 12.3	**	19.3 ± 1.9	n.s.		20
<i>fog-2(q71)</i> control x machos <i>tra-2(q276)</i>					0.04	56
<i>fog-2(q71)</i> recuperados x machos <i>tra-2(q276)</i>					0.12 n.s.	55

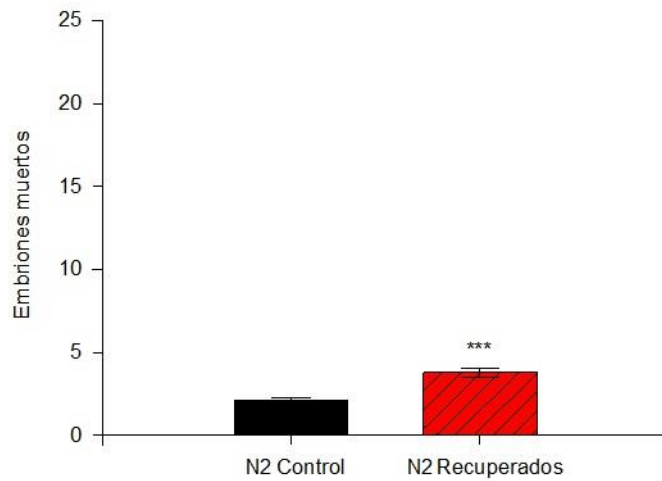
Hermafroditas de distintos fondos genéticos fueron seleccionados de manera individual en la etapa L4 intermedio y transferidos a cajas frescas con comida cada 24 h hasta que dejaran de depositar embriones. Para los hermafroditas recuperados, se sometieron a la ARD, después de 5 días se transfirieron a cajas frescas con comida diariamente hasta que dejaran de depositar embriones. Se empleó la prueba T-student (control vs recuperados) \*\*  $P < 0.01$ . Los animales control mutantes en *fog-1* y *fog-2* se seleccionaron individualmente en la etapa L4 intermedio, cruzados con machos. Para los animales mutantes en *fog-1* y *fog-2* recuperados, se sometieron a 5 días en ARD después fueron cruzados con machos. Para el arresto en diacinesis prolongado, los animales mutantes *fog-1* y *fog-2* se mantuvieron en cajas con comida desde Le intermedio hasta 6 días después, posteriormente fueron cruzados. Los embriones que no eclosionaron después de 24 h de haber sido depositados se contabilizaron como embriones muertos. Se empleó la prueba de Dunn. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , n.s. no significativa.

Los defectos observados en la progenie de los animales recuperados podrían deberse a que el ayuno inicia en la etapa L4 intermedia, cuando la espermatogénesis no ha concluido (aprox. 4 h después de la muda L4) y que al someter a los animales al ayuno cause problemas en la producción de espermias. Para descartar esta posibilidad, cuantificamos los espermatozoides por medio de una tinción DAPI en animales ayunados y control. Esto se realizó una vez que los animales se encontraban cerca del término de la etapa L4, cuando los animales ya han finalizado la espermatogénesis e inician la ovogénesis. Los animales control produjeron en promedio  $105.11 \pm 1.1$  espermátidas (n=36) mientras que los animales ayunados produjeron un número similar,  $101.89 \pm 2.5$  (n=37). También observamos que 5 días después de la muda L4, los animales control ya no contienen espermatozoides dentro de la espermateca, en cambio, los animales ayunados contienen en promedio  $102.5 \pm 0.68$  (n=28) espermatozoides (Fig. 8). Estos resultados sugieren que durante el ayuno la producción de esperma no se ve afectada, por consiguiente, no es un factor que pudiera explicar la baja fertilidad después de la ARD. Además, estos datos sugieren que el ayuno podría afectar la capacidad reproductiva de los espermatozoides, causando defectos en la progresión del desarrollo embrionario.



**Figura 8. El número de espermátidas en los animales silvestres permanece constante durante la diapausa.** Cuantificación de espermátidas producidas por animales silvestres en condiciones control (línea negra) y sometidos a la diapausa reproductiva del adulto (línea roja) a partir de la etapa L4 tardía, 1, 3 y 5 días después. Los animales fueron seleccionados en la etapa L4 tardía y 1,3 y 5 días post-L4 intermedio en ambas condiciones, diseccionados, sus gónadas fueron teñidas con DAPI y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Los datos graficados se muestran como el promedio de espermátidas en un brazo de la gónada ( $\pm$ SEM) en cada punto de tiempo analizado.

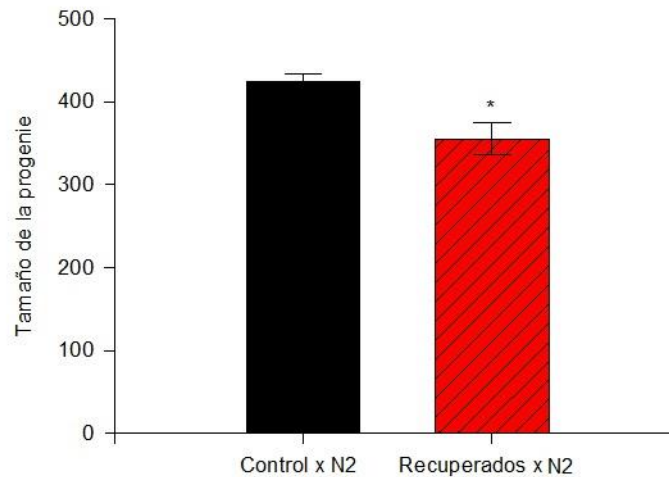
La calidad de un ovocito puede ser medida como el éxito que éste tiene para completar el desarrollo embrionario después de haber sido fertilizado [26, 68]. Para determinar la calidad de los óvulos después de la diapausa, se cuantificó la letalidad embrionaria dentro de la progenie producida por animales recuperados y se comparó con la de los animales control que nunca fueron ayunados. Al comparar la letalidad embrionaria de la progenie producida por autofertilización de los animales recuperados contra la de los animales control, encontramos que los animales recuperados exhiben 1.8 veces mayor letalidad embrionaria que su control ( $3.8 \pm 0.3$  embriones muertos/animal recuperado vs.  $2.1 \pm 0.1$  embriones muertos/ animal control) (Tabla 1, Fig. 9).



**Figura 9. La letalidad embrionaria es mayor en animales que pasaron por ARD.** Se cuantificó el número de embriones muertos dentro de la población producida por autofertilización en condiciones control (barra negra) y después de 5 días de ayuno (barra roja). La gráfica muestra el promedio del número de embriones muertos dentro de la progenie ( $\pm$ SEM) de cada animal. Se comparó la diferencia entre ambas medianas empleando la prueba t-student ajustada a Mann-Whitney (\*\*\*)  $P < 0.01$ .

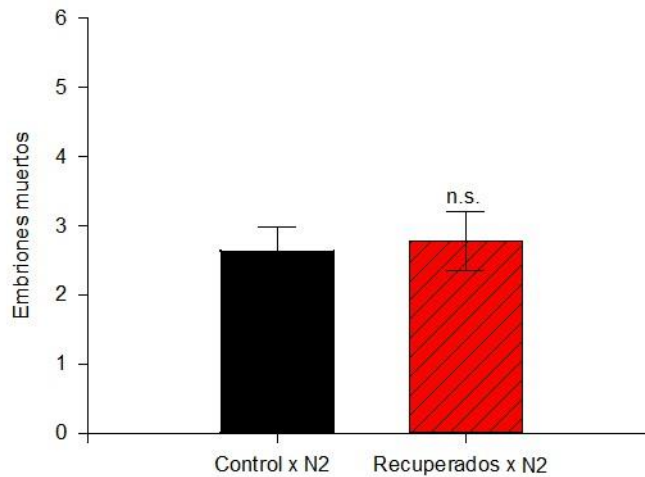
Para contrarrestar el efecto que tiene la ARD en los espermatozoides, cuantificamos la progenie y la letalidad embrionaria de animales silvestres recuperados de la ARD y posteriormente cruzados con machos silvestres que nunca fueron ayunados. Para las condiciones control, una población de hermafroditas en la etapa L4 intermedio fueron cruzados individualmente en presencia de 4 machos silvestres que nunca fueron ayunados por 24 h, posteriormente se transfirieron individualmente a placas Petri frescas con comida diariamente hasta que terminaran de producir embriones. Para las condiciones de ayuno, una población de hermafroditas L4 intermedio fueron sometidos a la diapausa reproductiva del adulto por 5 días, recuperados en cajas con comida y cruzados individualmente en presencia de 4 machos silvestres bien alimentados por 24 h, posteriormente los hermafroditas se transfirieron individualmente a placas Petri frescas con comida diariamente hasta que terminaran de producir embriones. Observamos que la fertilidad de los animales silvestres recuperados mejoraba considerablemente al ser cruzados (producían

81% de la progenie de su control) aunque nunca alcanzaron el tamaño de la progenie de su control (Tabla 1; Fig. 10).



**Figura 10. Los animales recuperados de la ARD y cruzados no restablecen completamente su fertilidad.** Conteos de progenie total producida al cruzar animales control (barra negra) y animales recuperados de la diapausa (barra roja). Hermafroditas en condiciones control y recuperados de la ARD fueron con cruzados con machos bien alimentados por 24 h. Los hermafroditas fueron transferidos individualmente a cajas frescas con comida hasta que dejaron de producir embriones. La gráfica muestra el promedio de la progenie ( $\pm$ SEM). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba t-student (\*  $P < 0.05$ ).

Adicionalmente, no observamos diferencias significativas en la letalidad embrionaria producida por los hermafroditas que fueron cruzados en condiciones control y después de la ARD ( $2.6 \pm 0.3$  embriones muertos/animal en condiciones control vs.  $2.8 \pm 0.6$  embriones muertos/animal de los recuperados; Fig. 11, Tabla 1). Estos resultados indican que la ARD afecta la fertilidad y la supervivencia embrionaria debido a defectos en las células femeninas, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la calidad del esperma se afecte en condiciones de ayuno.



**Figura 11. La letalidad embrionaria después de la ARD se rescata al cruzar a los animales silvestres recuperados con machos.** Número de embriones muertos dentro de la población producida al cruzar hermafroditas en condiciones control (barra negra) y después de la diapausa reproductiva del adulto (barra roja). La gráfica muestra el promedio del número de embriones muertos dentro de la progenie ( $\pm$ SEM) de cada animal. La significancia fue determinada por medio de la prueba U de Mann-Whitney y no hay diferencia significativa.

### **9.1.2 Los animales con la línea germinal feminizada son más sensibles a la ARD que los animales los silvestres**

Para probar el efecto que tiene la ARD directamente en las células germinales que dan lugar a ovocitos, empleamos las cepas mutantes *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)*, las cuales presentan feminización de la línea germinal. Para fines prácticos nos referiremos a estos animales como hembras, aunque en realidad son hermafroditas con la línea germinal feminizada. Los animales mutantes *fog-2(q71)* son incapaces de producir esperma, son considerados hembras ya que solamente producen ovocitos pero pueden reproducirse por medio de cruza con machos [69]. Los hermafroditas *fog-1(q253)* son sensibles a la temperatura, cuando se incuban desde L1 en la temperatura restrictiva (25°C) se impide la diferenciación de esperma y exhiben gónadas feminizadas. En cambio, si estos animales se

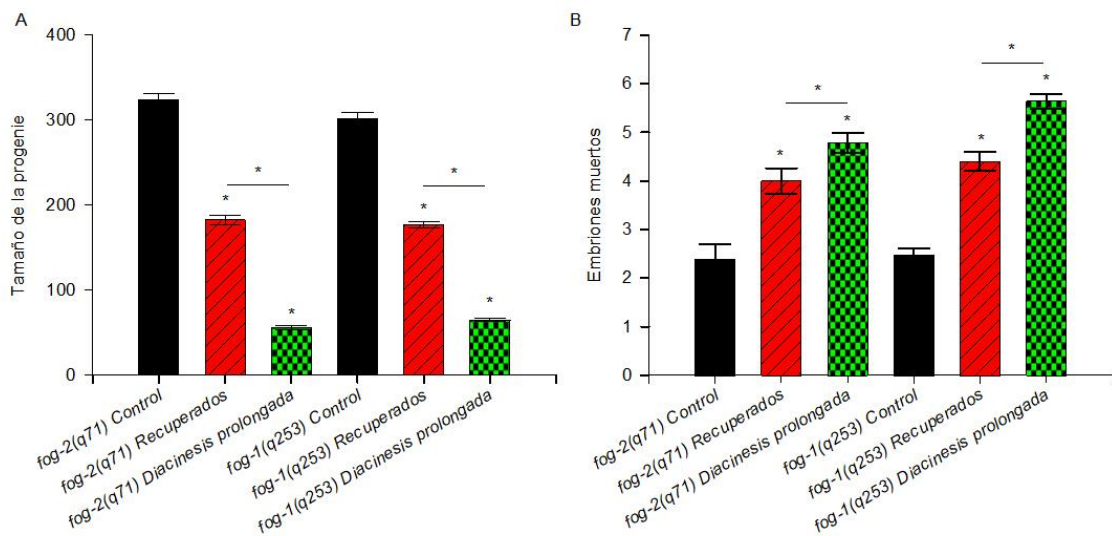
crecen a 15°C, sus células germinales se diferencian de manera normal, dando lugar a espermatozoides durante la etapa L4 y ovocitos durante la etapa adulta [70].

Para las condiciones control, se cruzaron individualmente “hembras” vírgenes *fog-2(q71)* en la etapa L4 intermedio bien alimentadas en presencia de 4 machos silvestres bien alimentados por 24 h, posteriormente las hembras fueron transferidas individualmente a placas Petri frescas con comida diariamente hasta que terminaran la producción de embriones. Para las condiciones de ayuno, las hembras vírgenes *fog-2(q71)* en la etapa L4 intermedia fueron ayunadas por 5 días, posteriormente fueron realimentadas por 24 h y cruzadas individualmente en presencia de 4 machos silvestres bien alimentados por 24 h. Posteriormente, las hembras fueron transferidas de manera individual a placas Petri frescas con comida diariamente hasta que terminaran la producción de embriones. Cuantificamos la progenie producida y la letalidad embrionaria en ambas condiciones y encontramos que las hembras *fog-2(q71)* recuperadas producen progenies más pequeñas que las hembras control (56.5% de su control) y exhiben mayor letalidad embrionaria (1.7 veces;  $2.4 \pm 0.3$  embriones muertos/ hembra control vs.  $4 \pm 0.3$  embriones muertos/ hembra recuperada; Tabla 1, Fig. 12).

Para confirmar estos datos comparamos la progenie y letalidad embrionaria producida por animales *fog-1(q253)* en condiciones control y recuperados de la ARD. Para ello, poblaciones sincronizadas de hermafroditas *fog-1(q253)* fueron crecidas desde L1 hasta L4 intermedio a 25°C y transferidos individualmente a cajas Petri con comida y en presencia de 4 machos silvestres por 24 h, como control. Otro grupo de animales *fog-1(q253)* fueron transferidos a cajas Petri sin comida e incubados 5 días en ayuno a 25°C. Al quinto día, los animales se recuperaron en cajas con comida por 24 h y posteriormente se transfirieron de manera individual a cajas con comida y en presencia de 4 machos silvestres por 24 h. Los animales *fog-1(q253)* recuperados exhibieron menor progenie que los animales control (Fig. 12A). Adicionalmente, los animales *fog-1(q253)* recuperados mostraron mayor letalidad embrionaria que los animales control (1.7 veces;  $2.5 \pm 0.1$  embriones muertos/animal en los animales *fog-1(q253)* control vs.  $4.4 \pm 0.2$  embriones



muertos /animal en los animales *fog-1(q253)* recuperados) (Fig. 12B). Estos resultados demuestran que la ARD afecta a las células germinales que dan lugar a los ovocitos a tal grado que interfiere con la supervivencia embrionaria aun cuando ha pasado tiempo después de que el ayuno ha concluido. Debido a que observamos que el efecto de la ARD fue mayor en las mutantes feminizadas, sugerimos que algunos fondos genéticos parecen ser más sensibles al ayuno que otros.



**Figura 12. Los animales con la línea feminizada son más susceptibles a la ARD.** (A) Progenie producida a partir de cruces de machos silvestres que nunca fueron ayunados con hembras *fog-1* y *fog-2* de los fondos genéticos indicados en condiciones control (barra negra), recuperados (barra roja) y animales que fueron expuestos a un arresto en diacyesis prolongada (barra verde). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba ANOVA y Dunn ( $P \leq 0.05$ ). (B) Se muestra la letalidad embrionaria dentro de la progenie producida a partir de la cruce con machos silvestres que nunca fueron ayunados con hembras *fog-1* y *fog-2* de los fondos genéticos indicados en condiciones control (barra negra), recuperados (barra roja) y diacyesis prologada (barra verde). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba ANOVA y Dunn ( $P \leq 0.05$ ).

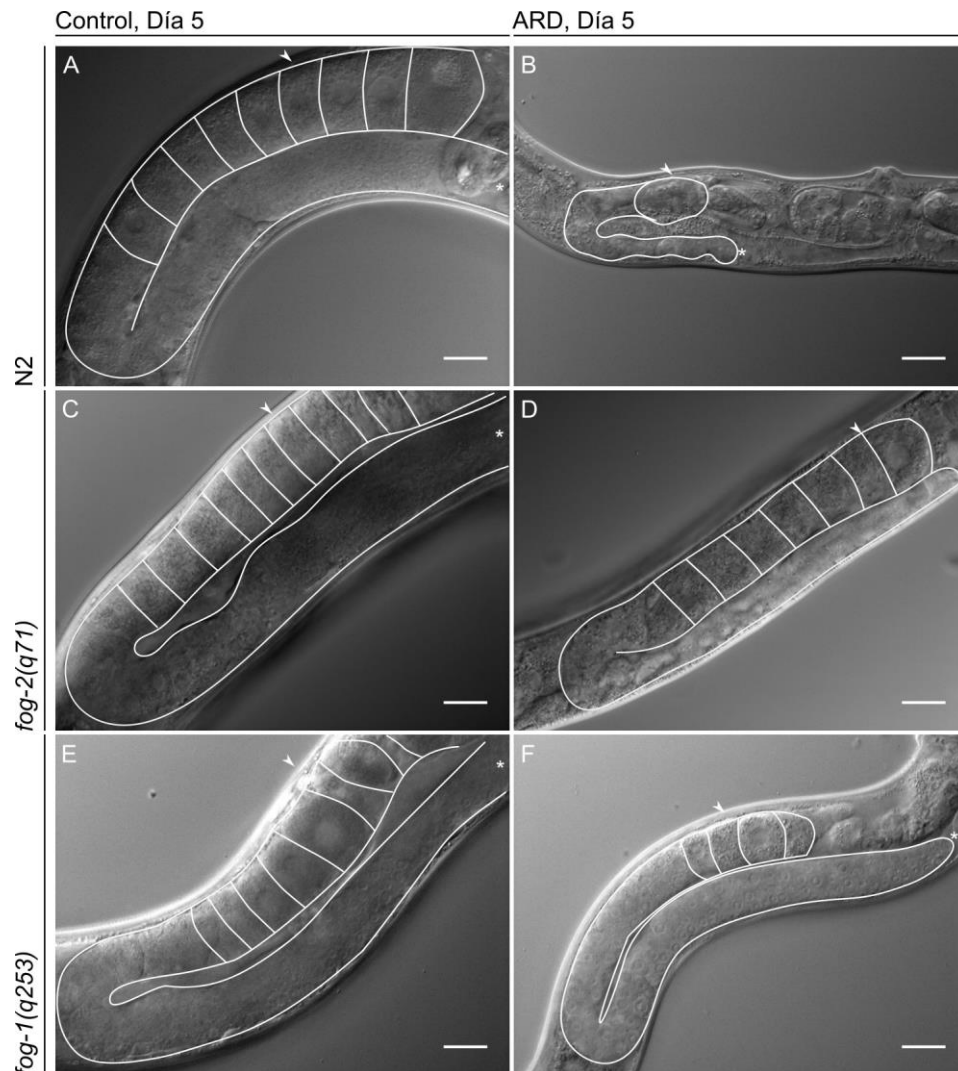
## **9.2 La respuesta de la gónada al ayuno durante la diapausa del adulto confiere protección a las células germinales contra el arresto prolongado en diacinesis**

En *C. elegans* la ovulación responde a una señal proveniente de los espermatozoides, cuando todos los espermias son utilizados para fertilizar a los ovocitos y se acaban, los siguientes óvulos permanecen arrestados en diacinesis de la profase I de la meiosis en espera de la señal proveniente de los espermatozoides. Los animales mutantes *fog-2* no producen esperma, todas sus células germinales se diferencian a ovocitos y en condiciones control con comida es posible ver hasta 14 ovocitos completamente formados y apilados en la gónada proximal, arrestados en diacinesis a la espera de una señal proveniente de los espermatozoides para ser fertilizados, activados y ovulados ([69]y Fig. 13A). Cuando los animales mutantes *fog-2(q71)* se mantienen bien alimentados sin cruzarse sus ovocitos se arrestan en diacinesis por un periodo más largo de lo habitual, si estos animales son cruzados, es posible observar defectos en la fertilidad y la viabilidad de los embriones producidos [26].

En condiciones control, los hermafroditas producen un embrión cada 20 min. Cinco días después de la muda de L4 a adulto, los animales silvestres han utilizado todos los espermatozoides que se encontraban almacenados en la espermateca y es posible observar ovocitos sin fertilizar arrestados en diacinesis apilados en la gónada proximal (aprox. 9 ovocitos) (Fig. 13A). En la diapausa del adulto (ARD), los animales silvestres retrasan su periodo reproductivo pero aparentemente la ovogénesis no se detiene, como resultado no se apilan ovocitos arrestados en diacinesis en la gónada proximal, en cambio, se produce un solo ovocito por cada brazo de la gónada y se comienza la producción de un nuevo ovocito hasta que ocurre una ovulación, aprox. cada 8 h ([43] y Fig. 13B). Nos preguntamos si los animales *fog-2(q71)* retrasan la producción de óvulos durante el ayuno. Para ello, sincronizamos una población de animales *fog-2(q71)* y se crecieron desde L1 hasta L4 intermedio, una parte de la población se mantuvo en cajas con comida y la otra se ayunó por 5 días. Al quinto día contamos los ovocitos presentes en cada brazo de la gónada. A diferencia de los animales silvestres en diapausa, los animales *fog-2(q71)* sin cruzar

presentan ovocitos apilados en la gónada proximal (aprox. 7 ovocitos, Fig. 13C). Sin embargo, el número ovocitos es menor que los animales *fog-2 (q71)* sin cruzar bien alimentados (aprox. 11 ovocitos, Fig. 13D).

Estos resultados fueron confirmados empleando otro fondo genético con la gónada feminizada *fog-1(q253)*. Durante el quinto día después de la muda L4, los animales *fog-1(q253)* en ARD presentaron ovocitos apilados en su gónada (aprox. 4, Fig. 13F) aunque fueron menos que los ovocitos apilados de los animales *fog-1(q253)* bien alimentados (Aprox. 8, Fig. 13E).

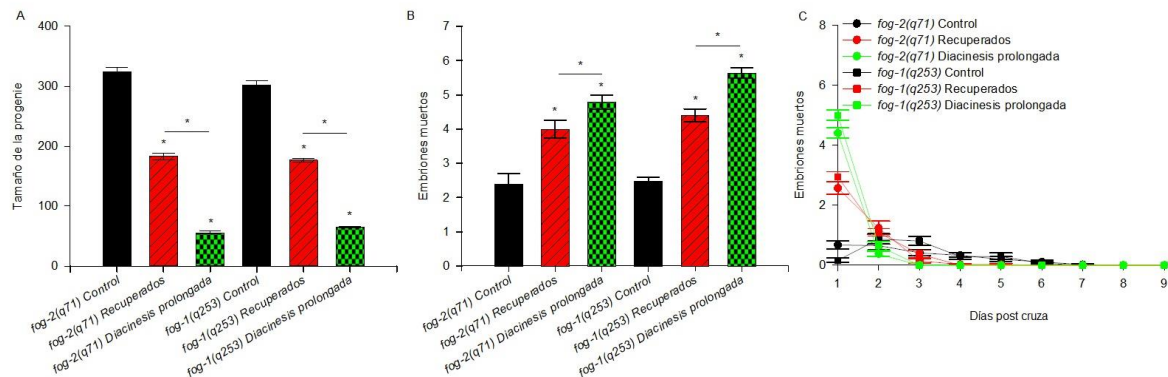


**Figura 13. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno previene el arresto prolongado en diacinesis de los ovocitos.** Fotografías representativas Nomarski del brazo de la gónada de (A) un hermafrodita adulto bien alimentado 5 días después de la etapa L4 intermedia. (B) El brazo de la gónada de un hermafrodita ayunado por 5 días a partir de la etapa L4 intermedia. (C) Imagen de un brazo de la gónada de un animal *fog-2(q71)* sin cruzarse y bien alimentado 5 días después de la etapa L4 intermedia. (D) Imagen del brazo de la gónada de un animal *fog-2(q71)* sin cruzarse ayunado por 5 días a partir de la etapa L4 intermedia. (E) Imagen representativa del brazo de la gónada de un adulto *fog-1(q253)* bien alimentado 5 días post L4 intermedio. (F) Imagen representativa del brazo de la gónada de un animal *fog-1(q253)* ayunado a partir de la etapa L4 intermedio por 5 días. En

todas las imágenes se delinea un brazo de la gónada y los ovocitos presentes; la parte distal de la gónada se indica con un asterisco (\*), la flecha indica la gónada proximal. La barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

Para continuar investigando si la respuesta de la gónada al ayuno durante la diapausa reproductiva del adulto confiere un efecto protector en las células germinales, comparamos la calidad de las células germinales expuesta a un arresto prolongado en diacinesis durante las condiciones control con comida con respecto a las células germinales de animales que estuvieron expuestos a la ARD cuantificando la letalidad embrionaria. Para ello, cruzamos animales vírgenes bien alimentados *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* de seis días de edad con machos silvestres y comparamos el tamaño de su progenie y la letalidad embrionaria de animales con la de los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* control y recuperados de la diapausa del adulto. Encontramos que los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* de seis días de edad bien alimentados producen progenies más pequeñas que sus controles (17% y 22%, respectivamente) y exhiben aún menos progenie (30.5 y 36.7%, respectivamente) que los animales recuperados de la ARD (Tabla 1, Fig. 14A).

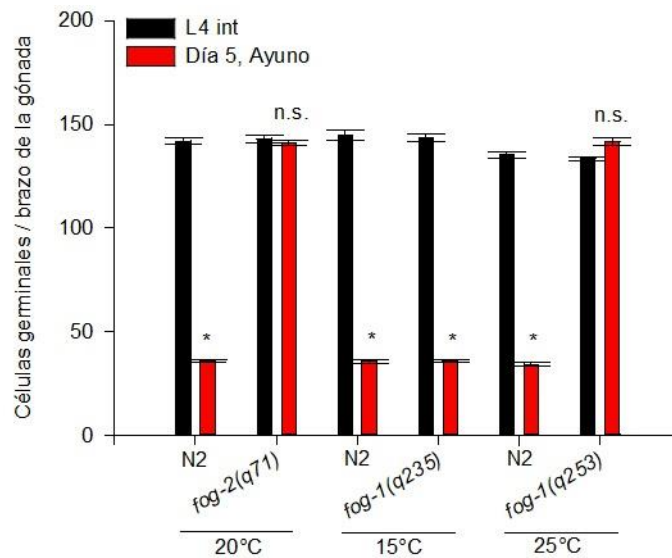
Adicionalmente, los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* de seis días de edad bien alimentados exhiben mayor letalidad embrionaria que los animales control (2- y 2.2-veces, respectivamente) y que los recuperados de la ARD (1.2- y 1.3-veces, respectivamente) (Tabla 1, Fig. 14B). Observamos que los embriones muertos se presentan principalmente durante el primer día después de la cruce (Fig. 14C). De manera similar, los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* recuperados producen un pico en el número de embriones muertos en el primer día después de la cruce (Fig. 14C). Aparentemente, los embriones muertos son producidos principalmente a partir de ovocitos que permanecieron arrestados por un periodo prolongado en diacinesis durante la ARD. Con estos resultados, concluimos que la ARD previene la entrada en diacinesis y el arresto prolongado de las células germinales que dan lugar a los ovocitos al disminuir la producción de ovocitos y las ovulaciones, lo cual mantiene su calidad. Nuestros resultados sugieren que esto podría explicar por qué las mutantes con la gónada feminizada son más sensibles a la ARD que los animales silvestres.



**Figura 14. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno protege a los ovocitos del arresto prolongado en diacinesis, el cual es muy perjudicial para el ovocito.** (A) La gráfica muestra el tamaño de la progenie producida al cruzar animales *fog-1* y *fog-2* de los fondos genéticos mencionados en distintas condiciones con machos silvestres bien alimentados. Las barras indican el promedio del tamaño de la progenie producida ( $\pm$ SEM) de cada animal. La significancia estadística se determinó empleando un análisis ANOVA en rangos seguido de una prueba de Dunn ( $P < 0.05$ ). (B) Se muestra el número de embriones muertos dentro de la progenie producida por animales *fog-1* y *fog-2* de los fondos genéticos mencionados en diferentes condiciones al ser cruzados con machos silvestres bien alimentados; control (barra negra), recuperados (barra roja) y diacinesis prolongada (barra verde). Las barras representan el promedio de embriones muertos ( $\pm$ SEM) de cada animal. La significancia estadística se determinó empleando un análisis ANOVA en rangos seguido de una prueba de Dunn ( $P < 0.05$ ). (C) Cuantificación diaria de los embriones muertos dentro de la progenie producida al cruzar animales *fog-1* y *fog-2* de los fondos genéticos mencionados en condiciones control (línea negra), recuperados (línea roja) y diacinesis prolongada (línea verde). Se muestra el promedio de embriones muertos ( $\pm$ SEM) en cada punto analizado.

Durante los experimentos de fertilidad después de la ARD, observamos que las gónadas de los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* no reducen su tamaño (Fig. 13F y D). Nuestros resultados, al igual que otros trabajos similares reportados por otros autores [71]

sugieren que la ovulación contribuye para reducir el volumen de la gónada ya que la producción de ovocitos requiere de una gran cantidad de citoplasma que aparentemente no se está produciendo en estas condiciones. Para comprobar que los animales mutantes en *fog-1* y *fog-2* no reducen el tamaño de sus gónadas durante el ayuno prolongado, cuantificamos las células germinales por cada brazo de la gónada usando una tinción DAPI, la cual se utiliza para teñir los núcleos de las células, en animales control y animales que pasaron 5 días en ARD de la cepa silvestre y las mutantes feminizadas. Durante las condiciones control, los animales silvestres muestran un aumento en el número de células germinales por brazo de la gónada de  $141.9 \pm 1.8$  (L4 intermedio) a  $468.23 \pm 2.0$  (5 días post L4 intermedio) (Tabla 2). Adicionalmente, el número de células germinales por brazo de la gónada disminuyó progresivamente durante el ayuno, de  $141.9 \pm 1.8$  (L4 intermedio) a  $36.0 \pm 0.5$  (5 días post L4 intermedio, Fig. 15 y Tabla 2). Encontramos que el número de células germinales por brazo de la gónada de los animales *fog-2(q71)* que fueron ayunados por 5 días permanece sin cambios con respecto al número de células germinales por brazo de la gónada en la etapa L4 intermedio ( $143.1 \pm 2.0$  vs.  $141.0 \pm 1.5$ ; Fig. 15 y Tabla 2). Confirmamos estos resultados usando animales mutantes *fog-1(q253)* (Fig. 15 y Tabla 2). En contraste, cuando los animales *fog-1(q253)* fueron mantenidos a la temperatura permisiva ( $15^{\circ}\text{C}$ ) desde L1 a la etapa adulta, y por consiguiente no se feminiza su línea germinal y producen espermatozoides, y fueron sometidos a la ARD, sus gónadas se reducían de manera similar a la de los animales silvestres (Fig. 15 y Tabla 2). Nuestros resultados sugieren que durante la ARD la reducción de la gónada se debe por una parte; a la ovulación y a la disminución de la proliferación de las células mitóticas en la gónada distal.



**Figura 15. La ovulación contribuye a la reducción de la gónada durante la ARD.** Animales silvestres y *fog-2* fueron crecidos en cajas con comida hasta la etapa L4 intermedio y se ayunaron para inducir la ARD. Animales silvestres y *fog-1* fueron crecidos en la temperatura permisiva y restrictiva en cajas con comida desde L1 hasta L4 intermedio y se ayunaron para inducir la ARD. 5 días después se cuantificaron las células germinales en cada brazo de la gónada usando una tinción DAPI. En la gráfica se muestra el número de células germinales por brazo de la gónada en animales de distintos fondos mutantes en la etapa L4 intermedio y 5 días después de ayuno prolongado. Las barras negras indican el promedio de células germinales ( $\pm$ SEM) en la etapa L4 intermedio. Las barras rojas indican el promedio de células ( $\pm$ SEM) al haber pasado 5 días en ARD.



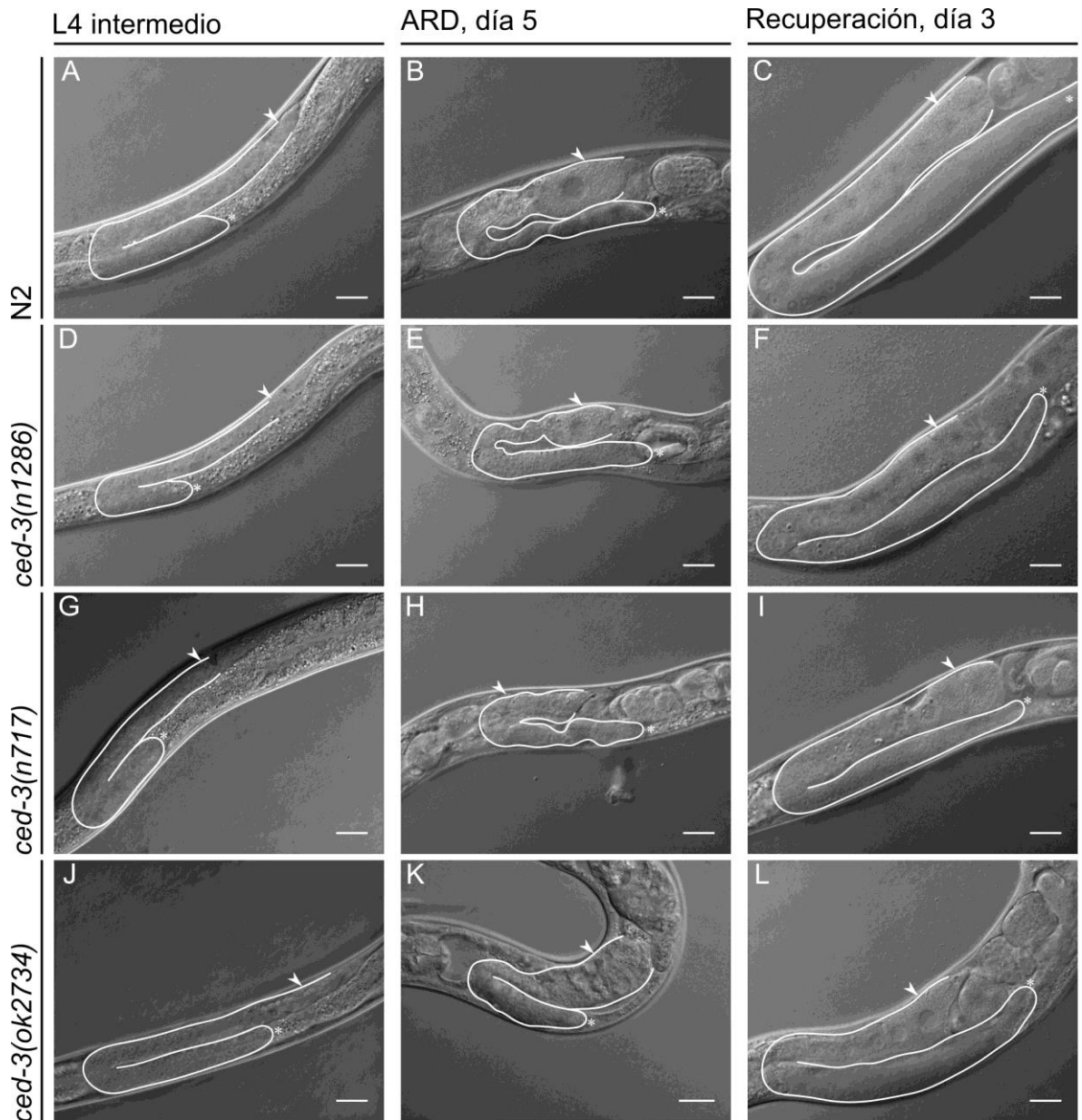
**Tabla 2. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en distintos fondos genéticos en condiciones control y ayuno.**

	L4 int	N	5 Días post L4 int			
			Control	N	Ayuno	N
20°C						
N2	141.9 ± 1.8	49	468.2 ± 2.0	38 **	36.0 ± 0.5	54 **
<i>fog-2(q71)</i>	143.1 ± 2.0	42	315.9 ± 2.6	47 **	141.0 ± 1.5	48 **
15°C						
N2	144.7 ± 2.2	30	386.9 ± 1.6	20 **	35.5 ± 0.8	24 **
<i>fog-1(q253)</i>	143.5 ± 1.8	30	386.2 ± 1.6	30 **	36.0 ± 0.6	25 **
25°C						
N2	135.3 ± 1.5	20	388.5 ± 1.8	25 **	34.2 ± 0.7	25 **
<i>fog-1(q253)</i>	133.5 ± 0.8	30	338.5 ± 1.8	30 **	141.8 ± 1.6	25 n.s.

Los animales control permanecieron en cajas con comida. Para el ayuno, los animales fueron crecidos desde L1 a L4 intermedio en cajas con comida y ayunados por 5 días. Los animales fueron seleccionados y disecados. Las gónadas disecadas fueron teñidas usando DAPI y los núcleos fueron cuantificados bajo el microscopio de epifluorescencia.

### 9.3 La reducción del tamaño de la gónada durante el ayuno prolongado no depende de la apoptosis de las células germinales

Angelo y van Gilst (2009) observaron que al ayunar animales mutantes en *ced-3(n1286)*, los cuales no exhiben apoptosis, no reducían el tamaño de su gónada y sugirieron que la apoptosis es indispensable para la reducción de la gónada durante el ayuno prolongado [42]. Sin embargo, al reproducir las condiciones experimentales reportadas por otros autores [42] encontramos resultados diferentes. Al someter a animales mutantes en *ced-3* (alelos *n1286*, *n717* y *ok2734*) desde la etapa L4 intermedio (Fig. 16A, D, G y J) a un ayuno prolongado de 5 días observamos que estos animales reducían el tamaño de su gónada (Fig. 16E, H y K) de manera similar a los animales silvestres (Fig. 16B).

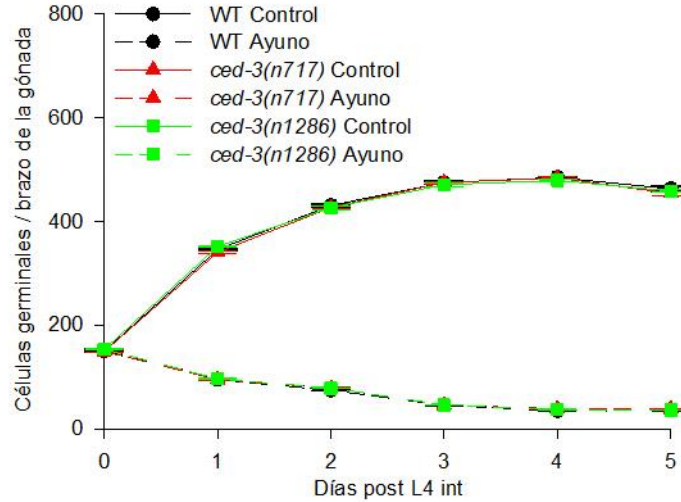


**Figura 16. La apoptosis no contribuye a la reducción del tamaño de la gónada durante el ayuno ni para la recuperación de su tamaño al realimentarse.** Imágenes representativas Nomarski de animales silvestres y diferentes mutantes de la caspasa que fueron sometidos a un ayuno de 5 días a partir de la etapa L4 intermedio y posteriormente fueron realimentados por 3 días. Se muestra el brazo de la gónada en la etapa L4 intermedio de los animales silvestres y *ced-3(n1286, n717 y ok2734)* (A, D, G y J); 5 días después en condiciones de ayuno (B, E, H y K) y 3 días después de ser realimentados (C, F, I y L).

Fotografías Nomarski 40x, la escala indica 20  $\mu\text{m}$ . Se muestra delineado el contorno de un brazo de la gónada. La cabeza de flecha indica la gónada proximal. El asterisco muestra la gónada distal.

Para corroborar que las gónadas de los animales mutantes de *ced-3* reducían el tamaño de su gónada como los animales silvestres cuantificamos las células germinales por brazo de la gónada usando una tinción DAPI. Animales silvestres y mutantes en *ced-3* fueron crecidos en cajas con comida desde L1 hasta la etapa L4 intermedio y sometidos a la ARD, tomando como el número inicial de células germinales por brazo de la gónada. Las células germinales fueron cuantificadas durante los siguientes 5 días en condiciones control y ayuno. Encontramos que durante el ayuno, los animales mutantes de *ced-3* mostraban una reducción progresiva en el número de células germinales por cada brazo de la gónada, similar a los animales silvestres (Fig. 17 y Tabla 3).

Posteriormente, los animales que pasaron 5 días en ARD fueron transferidos a cajas con comida por 3 días, transcurrido este tiempo se observaron sus gónadas en el microscopio Nomarski y se cuantificaron sus células germinales por brazo de la gónada usando una tinción DAPI. Encontramos que las gónadas reducidas de los animales *ced-3* se recuperaban cuando los animales eran realimentados, de la misma forma que los animales silvestres, como se puede observar por microscopía Nomarski (Fig. 15C, F, H y L) y por la tinción DAPI (Tabla 3). Nuestros resultados demuestran que la apoptosis de las células germinales no es un requisito para reducir el tamaño de la gónada durante el ayuno, ni para recuperar su tamaño cuando las condiciones se reestablecen.



**Figura 17. Los animales mutantes en *ced-3* reducen el tamaño de su gónada durante la ARD.** Poblaciones de animales silvestres y dos distintas mutantes de la caspasa del genotipo indicado fueron sometidos a un ayuno de 5 días a partir de la etapa L4 intermedio (líneas punteadas). Como control, se emplearon animales bien alimentados de cada fondo genético (líneas sólidas). Animales de cada condición y fondo genético fueron seleccionados diariamente, disecados y sus gónadas fueron teñidas usando DAPI. Se muestra el número de células germinales por brazo de la gónada ( $\pm$ SEM).

**Tabla 3. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en condiciones control, ayuno y recuperación de animales de diferentes fondos genéticos.**

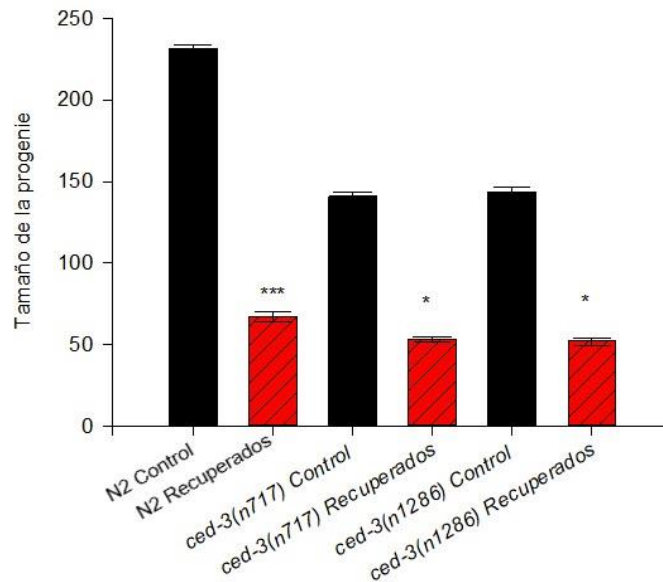
N2								
Días post L4 int	Control		N	Ayuno		N	Recuperación	N
0	150.4 ± 2.5		36	150.4 ± 2.5		36	339.2 ± 3.5	25
1	346.1 ± 2.0		35	95.1 ± 1.0		36		
2	431.3 ± 1.9		35	74.5 ± 0.9		36		
3	475.6 ± 2.7		25	45.6 ± 0.7		35		
4	485.3 ± 1.4		30	35.0 ± 0.6		36		
5	463.7 ± 4.7		24	35.5 ± 0.9		35		
<i>ced-3(n717)</i>								
Días post L4 int	Control		N	Ayuno		N	Recuperación	N
0	145.5 ± 4.6		35	145.5 ± 4.6		35	342.9 ± 2.8	30
1	340.9 ± 1.9		36	93.7 ± 1.9		35		
2	427.8 ± 1.7		36	78.9 ± 1.2		35		
3	475.8 ± 2.7		24	46.1 ± 0.8		35		
4	484.6 ± 2.4		25	38.6 ± 0.8		36		
5	454.7 ± 3.7		25	38.1 ± 0.8		35		
<i>ced-3(n1286)</i>								
Días post L4 int	Control		N	Ayuno		N	Recuperación	N
0	153.7 ± 2.1		36	153.7 ± 2.1		36	342.6 ± 2.7	30
1	351.8 ± 1.8		25	96.8 ± 1.3		35		
2	427.1 ± 3.3		26	78.8 ± 0.9		36		
3	471.2 ± 3.9		25	46.1 ± 0.6		35		
4	479.7 ± 2.2		25	37.7 ± 1.0		36		
5	459.2 ± 2.9		25	36.7 ± 0.8		35		

Las gónadas de animales con los genotipos indicados crecidos en condiciones control, ayuno y recuperación fueron disecadas, teñidas usando DAPI para cuantificar los núcleos de las células germinales por brazo de la gónada en el microscopio de epifluorescencia.

Angelo y van Gilst (2009) también reportaron que los animales mutantes de la caspasa *ced-3(n1286)* eran incapaces de producir progenie después de haber experimentado un ayuno de 15 días y sugirieron que la apoptosis era importante para recuperar la fertilidad al reestablecer las condiciones[42]. De manera inesperada, observamos que ni los animales silvestres, ni los mutantes *ced-3(n717)* y *ced-3(n1286)* produjeron progenie después de haber sido sometidos a la ARD por 15 días (N=37, 39 y 42, respectivamente). Incluso estos

animales fueron incapaces de recuperar su fertilidad después de ser cruzados con machos silvestres (N=27, 29 y 30, respectivamente).

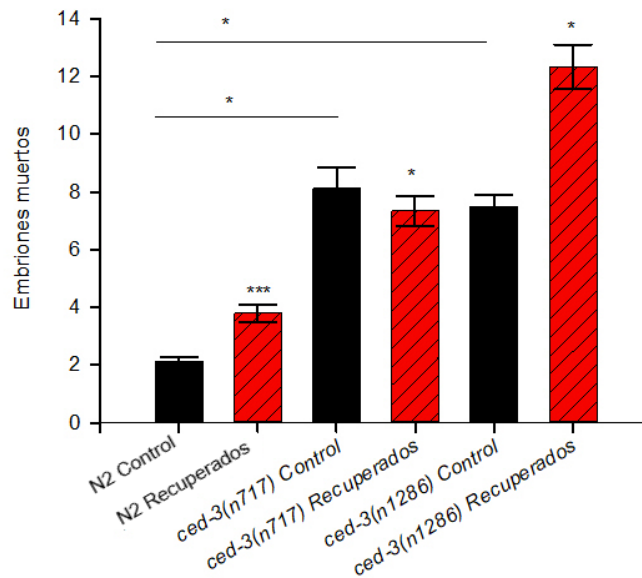
Decidimos entonces cuantificar la progenie de animales mutantes para la caspasa *ced-3(n717)* y *ced-3(n1286)* bien alimentados y de animales recuperados después de 5 días en la ARD y compararla con la progenie de los animales silvestres en las mismas condiciones. Observamos que los animales *ced-3(n717)* y *ced-3(n1286)* exhibían en promedio 40% menos progenie que los animales silvestres en condiciones control (Fig. 18 y Tabla 1). Cuando comparamos el número de progenie producida por los animales silvestres recuperados con la de los *ced-3* recuperados encontramos que los animales mutantes *ced-3* (*n717* y *n1286*) producen en promedio 20-24% menos progenie que los animales silvestres recuperados (Fig. 18 y Tabla 1).



**Figura 18. Los animales mutantes de la caspasa producen menos progenie que los animales silvestres después de un ayuno prolongado.** Progenie producida por autofertilización de animales silvestres y mutantes *ced-3(n717)* y *ced-3(n1286)* en condiciones control con comida (barras negras) y recuperados de la ARD (barras rojas). Para las condiciones control, hermafroditas L4 intermedio fueron transferidos

individualmente a cajas frescas con comida cada 24 h hasta que dejaran de producir progenie. Para los animales recuperados, hermafroditas L4 intermedio fueron ayunados por 5 días, posteriormente se transfirieron individualmente a cajas con comida cada 24 h hasta que dejaran de producir progenie. Las gráficas muestran el promedio de la progenie ( $\pm$ SEM) de cada animal. Se comparó la diferencia entre las medias de los animales recuperados empleando una prueba t-student en los animales silvestres ( $P \leq 0.001$ ) y una prueba ANOVA para múltiples comparaciones ( $P \leq 0.05$ ).

La letalidad embrionaria de los animales mutantes *ced-3* resultó mayor que la de los animales silvestres en condiciones control, ya que la apoptosis es necesaria para la calidad de los ovocitos, (3.9-veces mayor que los silvestres para el alelo *ced-3(n717)* y 3.6-veces mayor para el alelo *ced-3(n1286)*, similar a los datos reportados por otros autores ([26] Fig. 19 y Tabla 1). Después de la ARD, los animales mutantes *ced-3(n717)* exhibieron 1.9-veces mayor letalidad embrionaria que los animales silvestres recuperados, mientras que los *ced-3(n1286)* presentaron 3.2-veces mayor letalidad embrionaria que los animales silvestres recuperados (Fig. 19 y Tabla 1).

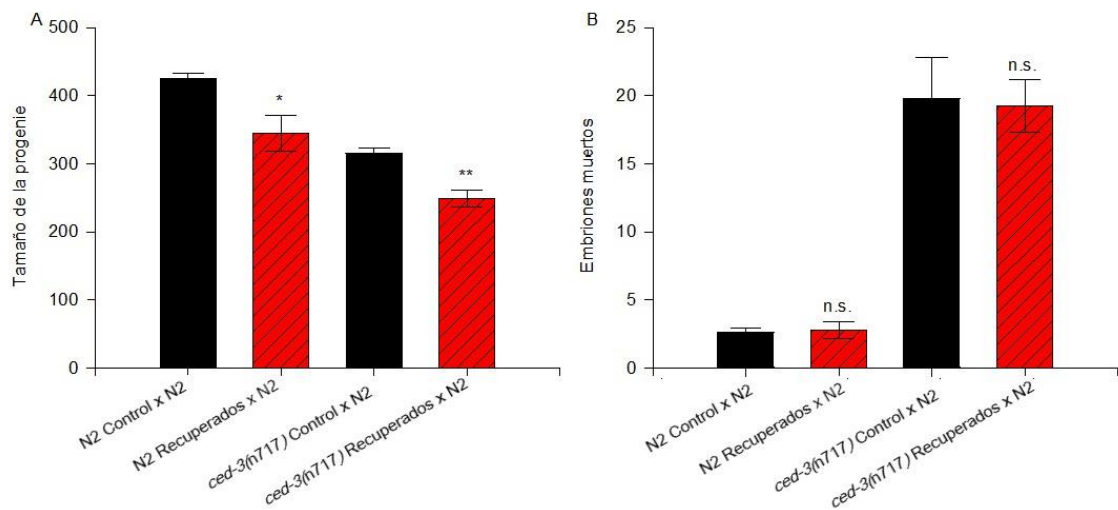


**Figura 19. La letalidad embrionaria es mayor en los animales mutantes *ced-3* en condiciones control y después del ayuno prolongado.** Animales silvestres y mutantes *ced-3* de los diferentes fondos genéticos fueron crecidos en condiciones control o recuperados de la ARD. Los animales fueron seleccionados individualmente y transferidos a cajas frescas con comida hasta que dejaron de producir embriones. Se muestra el número de embriones muertos dentro de la progenie producida por autofertilización de animales silvestres y mutantes de la caspasa en condiciones control (barras negras) y recuperados de la ARD (barras rojas). Las barras muestran el promedio de embriones muertos ( $\pm$ SEM) de cada animal. Se determinó la significancia estadística empleando una prueba t-student ( $P \leq 0.001$ ) en los animales silvestres y empleando la prueba de Mann-Whitney en los animales *ced-3* ( $P \leq 0.05$ ).

Para evitar el efecto de la ARD en los espermatozoides, cuantificamos la progenie y letalidad embrionaria de animales *ced-3(n717)* que fueron expuestos a 5 días en la ARD y posteriormente cruzados con machos silvestres bien alimentados. Encontramos que la fertilidad de los animales *ced-3(n717)* recuperados y cruzados con machos silvestres mejoró considerablemente (79% con respecto al control) aunque no alcanzó el tamaño de la progenie producida por su control (Fig. 20A). En condiciones control, los animales *ced-3(n717)* cruzados con machos silvestres exhibieron mayor letalidad embrionaria que los



animales silvestres cruzados (7-veces mayor) pero la letalidad embrionaria no se incrementa más después de la ARD ya que fue tan solo 8 veces mayor (Fig. 20B). Nuestros datos confirman que la apoptosis de las células germinales es importante para mantener la calidad de los ovocitos en condiciones control ([26] y este trabajo). Además, observamos que la apoptosis es importante para la fertilidad y preservar la calidad de los ovocitos durante la ARD.

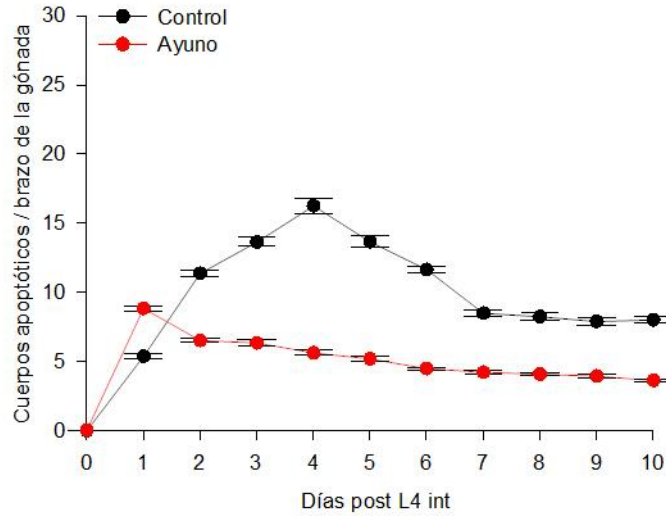


**Figura 20. La letalidad embrionaria se rescata al cruzar a los animales *ced-3* con machos, sin embargo no se recupera completamente la fertilidad de los animales después de la ARD.** Animales de los fondos genéticos indicados fueron cruzados con machos silvestres en condiciones control y recuperados de la ARD. Los animales fueron seleccionados individualmente a cajas frescas con comida diariamente hasta que dejaron de depositar embriones. (A) Progenie producida al cruzar animales control (barras negras) y animales recuperados de la ARD (barras rojas) de los fondos genéticos indicados con machos silvestres bien alimentados. La gráfica muestra el promedio de la progenie ( $\pm$ SEM) de cada animal. Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba de Mann-Whitney ( $P \leq 0.024$ ) para los animales silvestres y la prueba de t-student ( $P \leq 0.001$ ) para los animales *ced-3(n717)*. (B) Número de embriones muertos dentro de la población producida al cruzar animales control (barras negras) y animales recuperados de la ARD

(barras rojas) de diferentes fondos genéticos con machos silvestres bien alimentados. La gráfica muestra el promedio de embriones muertos dentro de la progenie ( $\pm$ SEM) de cada animal. La significancia estadística fue determinada empleando la prueba de Mann-Whitney, n.s. = no existe diferencia significativa.

#### **9.4 Durante el ayuno prolongado, la apoptosis de las células germinales aumenta y no se detiene**

Investigamos la dinámica de apoptosis de las células germinales durante la diapausa reproductiva del adulto. Para cuantificar la apoptosis empleamos la cepa reportera con el genotipo *P<sub>lim-7ced-1::gfp</sub>*, la cual se expresa a la proteína verde fluorescente en las células de la gónada somática. Este tejido se encarga de rodear a los cuerpos apoptóticos y fagocitarlos [72]. En condiciones control, el número de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada aumenta con la edad de los animales y llega a un punto máximo en el día 4 post-L4 intermedio ( $16.3 \pm 0.55$  cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada). Después del día 4, los animales presentaron en promedio  $9.65 \pm 0.98$  cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada durante el resto del experimento (Tabla 4). Después de un día de ayuno observamos un aumento de 1.6-veces en el número de cuerpos apoptóticos con respecto al control. Después de este pico, los animales presentaron 4.9 cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada en promedio durante el resto de los experimentos (Fig. 21, Tabla 4).



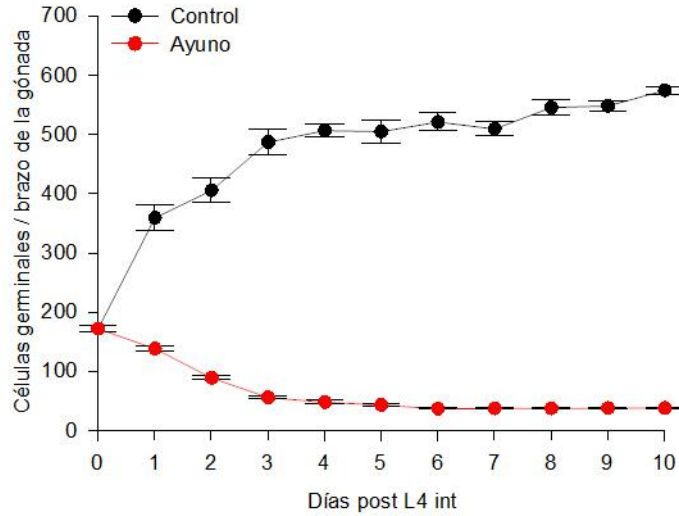
**Figura 21. La apoptosis de las células germinales permanece activa durante la ARD.** Cuantificación de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada de animales *ced-1::gfp* en condiciones control y en ARD. Se seleccionaron animales de ambas condiciones durante 10 días para visualizar los cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada durante en el microscopio de epifluorescencia. Se muestra el promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada ( $\pm$ SEM) de los animales control (línea negra) y durante la ARD (línea gris).

**Tabla 4. Dinámicas de apoptosis en condiciones control y ARD.**

Días post L4 int	<i>ced-1::gfp</i>		N	Ayuno				N
	Control							
0	0.0 ± 0.00	141	0.0 ± 0.01	n.s.	140			
1	5.4 ± 0.21	139	8.8 ± 0.20	**	140			
2	11.4 ± 0.26	129	6.5 ± 0.15	**	141			
3	13.6 ± 0.34	111	6.3 ± 0.24	**	129			
4	16.3 ± 0.55	103	5.6 ± 0.18	**	123			
5	13.7 ± 0.40	111	5.2 ± 0.16	**	143			
6	11.6 ± 0.26	121	4.5 ± 0.10	**	135			
7	8.5 ± 0.22	110	4.2 ± 0.11	**	129			
8	8.2 ± 0.25	119	4.1 ± 0.10	**	144			
9	7.9 ± 0.30	76	3.9 ± 0.11	**	124			
10	8.0 ± 0.21	72	3.6 ± 0.08	**	105			

Se cuantificaron los cuerpos apoptóticos por 10 días usando animales transgénicos *ced-1::gfp* observados bajo el microscopio de epifluorescencia en condiciones control y durante la ARD. Los animales fueron seleccionados, anestesiados, montados en colchones de agarosa y observados bajo el microscopio de epifluorescencia.  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , n.s. no significativo.

Es de llamar la atención que durante el ayuno prolongado el número de células germinales en apoptosis permanece constante, aun cuando la proliferación en las células germinales se detuvo a los 30 min de ayuno, como reportan otros autores (Seidel y Kimble, 2015). Por consiguiente, nos pareció importante determinar qué proporción de células germinales son eliminadas por apoptosis durante el ayuno, con respecto al total de células que permanecen en cada brazo de la gónada. Para determinar el número de células germinales, se tiñeron gónadas en condiciones control y ayuno con 4', 6' -diamino-2-fenilindol (DAPI) y las cuantificamos por medio de microscopía de epifluorescencia. Encontramos que en condiciones control, el número de células por brazo de la gónada incrementa gradualmente con la edad hasta el día 4 post-L4 intermedio, posteriormente, este número se mantiene sin cambios (534.2 células germinales por brazo de la gónada) (Fig. 22; Tabla 5). Durante el ayuno prolongado, el número de células germinales disminuyó gradualmente hasta llegar a un número mínimo de 38.1 células germinales por brazo de la gónada en el día 6 post-L4 intermedio y permaneció prácticamente sin cambios por el resto del experimento (Fig. 22; Tabla 5).



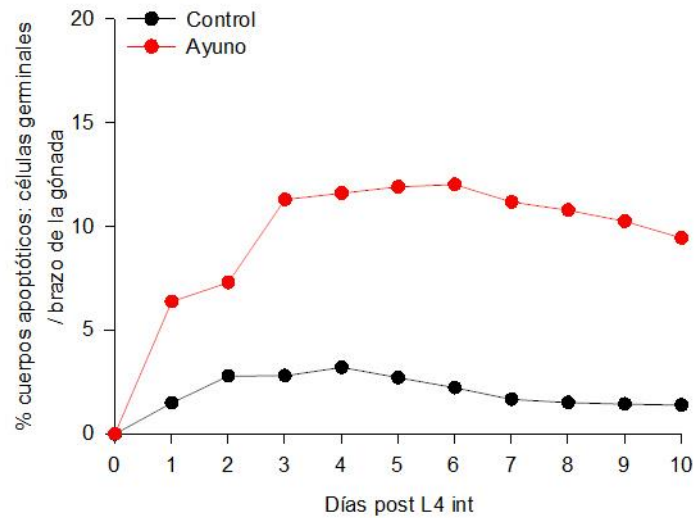
**Figura 22. El número de células germinales disminuye durante la ARD.** Cuantificación de las células germinales en cada brazo de la gónada durante 10 días de animales control (línea negra) y durante la ARD. Los animales de cada condición fueron seleccionados, disecados, sus gónadas fueron fijadas y teñidas usando DAPI para cuantificar las células germinales presentes en cada brazo de la gónada bajo el microscopio de epifluorescencia. Se muestra el promedio células germinales por brazo de la gónada ( $\pm$ SEM).

**Tabla 5. Cuantificación de células germinales por brazo de la gónada en condiciones control y durante la ARD.**

Días post L4 int	<i>ced-1::gfp</i>				
	Control		N	Ayuno	N
0	172.2 ± 4.57		45	172.2 ± 4.57	45
1	359.6 ± 21.88		15	138.4 ± 4.72	42
2	406.1 ± 21.23		15	89.4 ± 3.04	30
3	487.3 ± 20.82		17	56.0 ± 1.83	31
4	506.8 ± 10.94		15	48.4 ± 3.02	27
5	505.1 ± 19.53		18	43.6 ± 1.37	35
6	521.3 ± 14.82		18	37.2 ± 1.18	30
7	509.6 ± 11.76		16	37.8 ± 0.75	24
8	545.9 ± 13.44		17	37.8 ± 1.04	38
9	548.6 ± 8.19		17	38.4 ± 1.19	34
10	574.7 ± 6.56		15	38.4 ± 1.19	38

Las gónadas de animales en condiciones control y ARD fueron disecadas, teñidas y se cuantificaron las células germinales por brazo de la gónada en el microscopio de epifluorescencia.

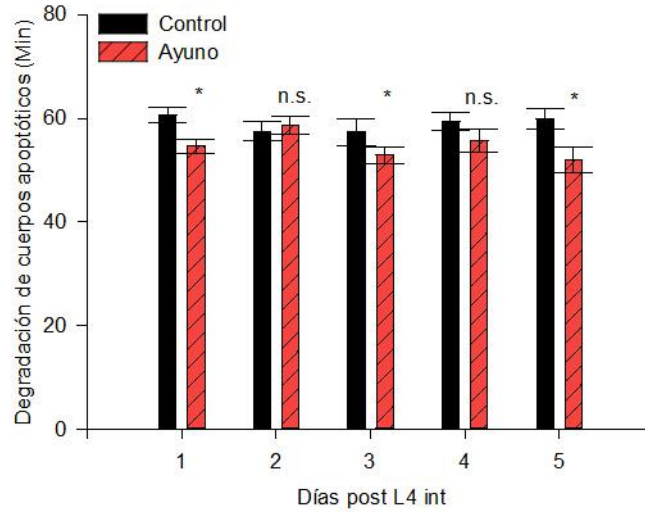
Posteriormente, establecimos la relación que existe entre las células eliminadas por apoptosis con respecto al total de células germinales que hay en cada brazo de la gónada en condiciones control y durante la diapausa reproductiva del adulto. Encontramos que en condiciones control, aproximadamente el 1.91% de las células presentes en la gónada están siendo eliminadas por apoptosis en cada día analizado. Sin embargo, durante la ARD este número es mucho mayor, esto es aproximadamente 9.27% de las células germinales se encuentran siendo eliminadas por apoptosis (Fig. 23). Estos datos demuestran que la apoptosis de las células germinales aumenta hasta 4.8 veces durante la respuesta de la gónada al ayuno y continúa bajo estas condiciones.



**Figura 23. El número de cuerpos apoptóticos es mayor durante el ayuno.** Se calculó la proporción de células germinales eliminadas por apoptosis en condiciones control con comida y durante la ARD. La gráfica muestra el porcentaje de cuerpos apoptóticos observado en los animales *ced-1::gfp* usando los datos obtenidos a partir de la cuantificación de cuerpos apoptóticos y el total de células germinales por brazo de la gónada en condiciones control con comida (línea negra) y en la ARD (línea gris).

Para probar si el aumento que observamos en el número de cuerpos apoptóticos durante la ARD se debía a que el proceso de eliminación de cuerpos apoptóticos es más lento durante el ayuno prolongado, cuantificamos el tiempo que tarda un cuerpo apoptótico en ser degradado en animales expuestos de 1 a 5 días en ayuno usando microscopía en un lapso de tiempo. Observamos que el tiempo de degradación de los cuerpos apoptóticos en condiciones control es de aprox. 58 minutos. Estos resultados son similares a los publicados por otros autores que reportan 1 h como el tiempo que tarda la de degradación de los cuerpos apoptóticos en condiciones control [28]. En cambio, durante la ARD encontramos que el tiempo de degradación de los cuerpos apoptóticos no se incrementa durante los primeros 5 días en la ARD, y es similar a las condiciones control 58 minutos) (Fig. 24; Tabla 6). Nuestros resultados demuestran que el proceso de degradación de cuerpos apoptóticos permanece activo al menos durante 5 días en la ARD.





**Figura 24. La degradación de los cuerpos apoptóticos ocurre de manera normal durante el ayuno prolongado.** El tiempo de degradación de los cuerpos apoptóticos fue medido empleando una técnica de inmovilización sin anestésicos en poblaciones de animales silvestres a partir del día 1 post L4 intermedio hasta el día 5, en condiciones control con comida (barras negras) y durante la ARD (barras rojas). Los animales de ambas condiciones fueron seleccionados individualmente y colocados sobre colchones de agarosa 10% en suspensión de esferas de poliestireno para inmovilizarlo. Se observó la gónada de los animales bajo el microscopio Nomarski a 63X. Una vez localizado un cuerpo apoptótico se tomaron fotografías cada 10 minutos hasta que el cuerpo apoptótico se degradó completamente. Se muestra el promedio del tiempo de degradación ( $\pm$ SEM) en minutos.

**Tabla 6. Degradación de cuerpos apoptóticos en condiciones control y durante la ARD.**

Días post L4 int	N2		Ayuno	
	Control	N		N
0	No cuerpos apoptóticos	25	No cuerpos apoptóticos	25
1	60.7 ± 1.51	9	54.6 ± 1.47	* 9
2	57.4 ± 1.89	9	58.7 ± 1.74	n.s. 9
3	57.3 ± 2.63	9	52.9 ± 1.61	* 9
4	59.4 ± 1.74	8	55.6 ± 2.15	n.s. 8
5	59.9 ± 1.97	8	52.0 ± 2.50	* 8

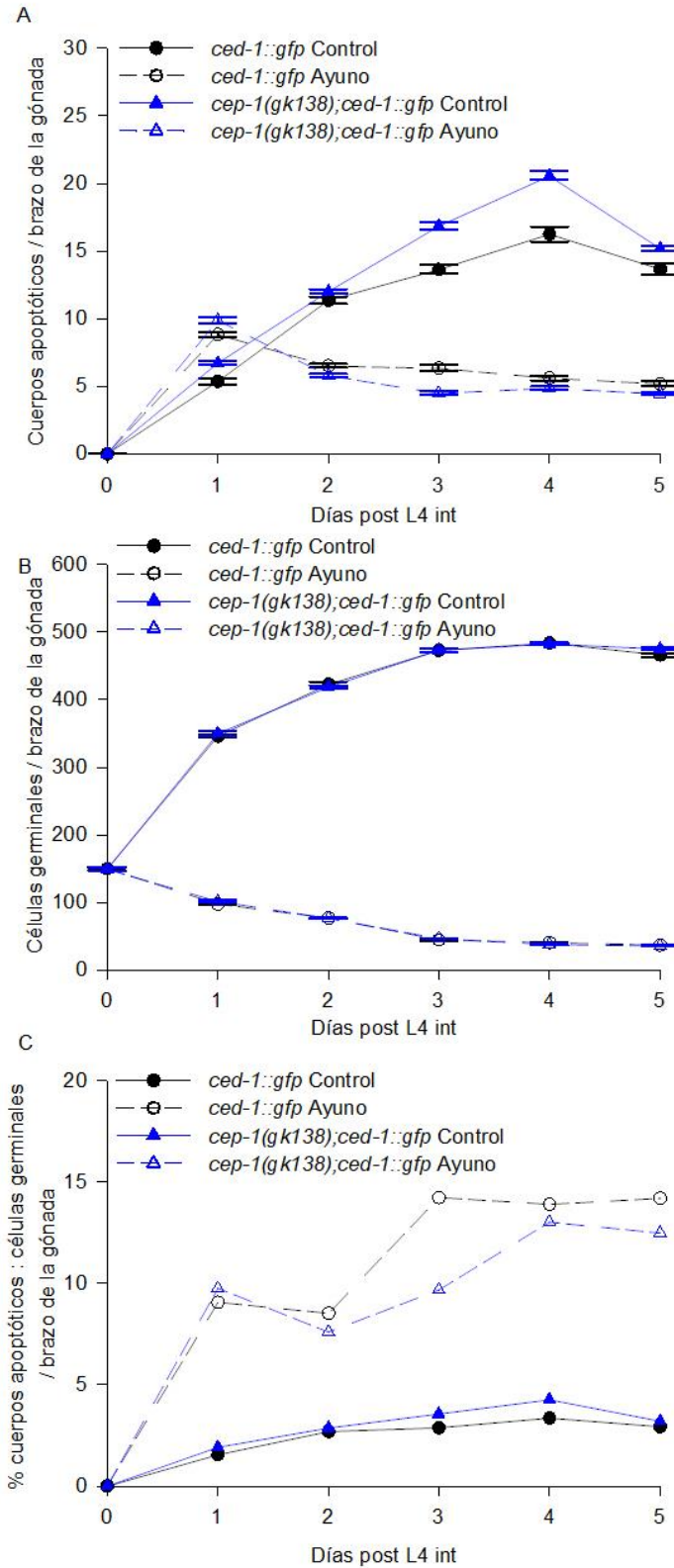
Los animales de ambas condiciones se seleccionaron diariamente durante 5 días a partir de la etapa L4 intermedio. Los animales se inmovilizaron en una suspensión de perlas de poliestireno sobre colchones de agarosa al 10%. Se observó la formación y degradación de un cuerpo apoptótico en un brazo de la gónada de manera individual y se reportó el tiempo de degradación en minutos. Se empleó la prueba de Holm-Sidak para comparar los grupos. \* P < 0.05, n.s. = no significativa.

#### **9.4.1 La proteína homóloga del retinoblastoma LIN-35 regula parcialmente la apoptosis que se induce durante el ayuno prolongado.**

La apoptosis de las células germinales puede ser inducida por el daño al ADN o defectos en la meiosis a través de CEP-1, el homólogo de p53 en *C. elegans*. Los animales mutantes *cep-1* no inducen apoptosis de las células germinales después de presentarse daños en el ADN o defectos en la meiosis [37, 49, 72, 73]. Para probar si el incremento en la apoptosis durante el ayuno prolongado es regulado por daño al ADN o defectos en la meiosis, cuantificamos los cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada en un fondo mutante *cep-1/p53*. Para ello, sometimos animales L4 intermedio *ced-1::gfp* y *cep-1(gk138);ced-1::gfp* a la ARD por 5 días, cuantificamos los cuerpos apoptóticos por cada brazo de la gónada y los comparamos con sus respectivos controles. Encontramos que los animales *ced-1::gfp* y *cep-1(gk138);ced-1::gfp* presentan niveles de apoptosis similares en ambas condiciones (Fig. 25A).

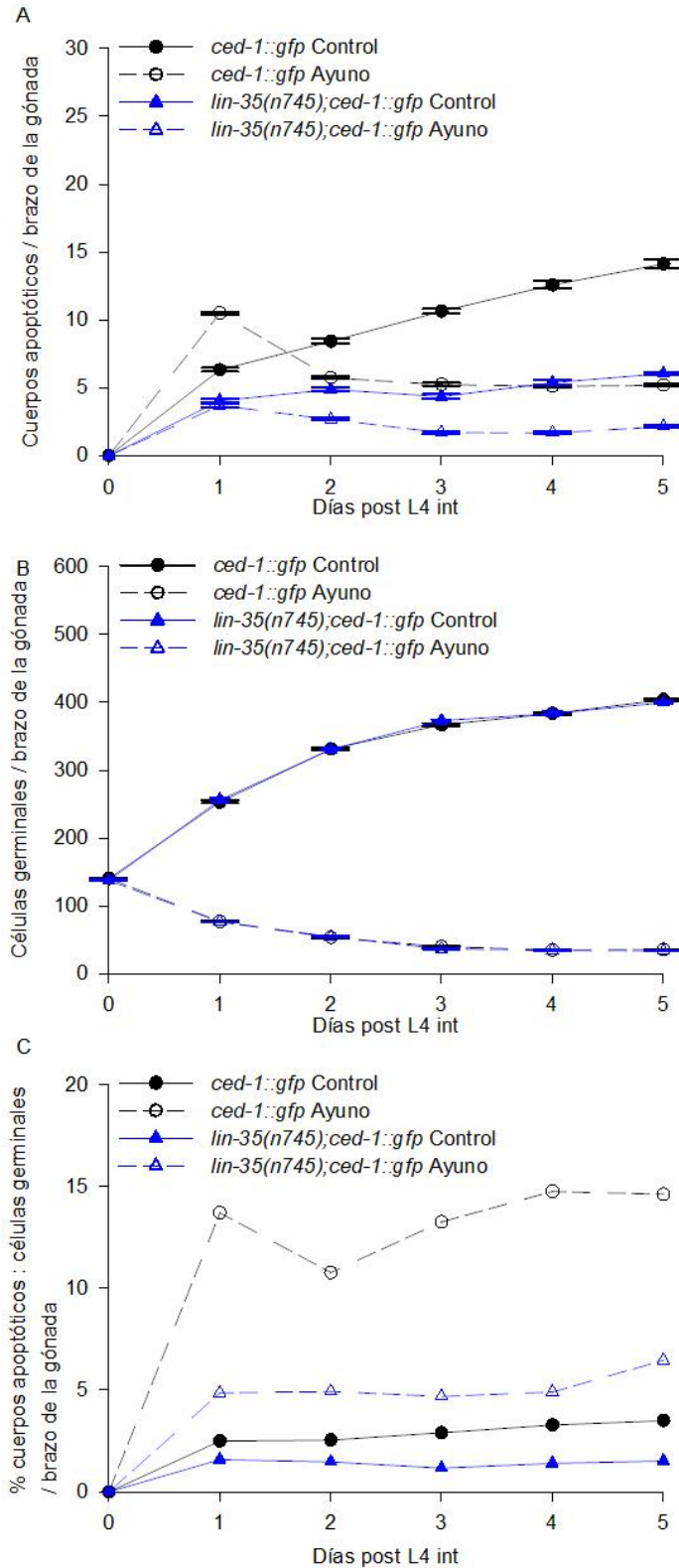
Posteriormente, cuantificamos el total de células presentes en cada brazo de la gónada por 5 días en ambas condiciones por medio de una tinción DAPI. Encontramos que los animales *ced-1::gfp* y *cep-1(gk138);ced-1::gfp* presentan una disminución en el número de células durante la ARD de manera similar a la del control (Fig. 25B).

Finalmente, decidimos calcular la proporción de células germinales eliminadas por apoptosis en cada brazo de la gónada durante la ARD. Encontramos que la proporción de células germinales eliminadas por apoptosis fue similar en los dos fondos genéticos en ambas condiciones (Fig. 25C), sugiriendo que el aumento en los niveles de apoptosis observados durante la ARD no es a consecuencia de daño al ADN o defectos en la meiosis.



**Figura 25. El aumento en la apoptosis durante el ayuno es independiente de *cep-1/p53*. (A)** Animales *cep-1(gk38);ced-1::gfp* y *ced-1::gfp* fueron usados para cuantificar los cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada durante 5 días en condiciones control (líneas sólidas) y durante la ARD (líneas punteadas). Se muestra el promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada con el SEM. (B) Se usó una tinción DAPI para cuantificar las células germinales presentes en cada brazo de la gónada en condiciones control (líneas sólidas) y durante la ARD (líneas punteadas). Se muestra el promedio de células germinales por brazo de la gónada con su SEM. (C) Se calculó el porcentaje de cuerpos apoptóticos con respecto al total de células germinales en cada brazo de la gónada en animales alimentados (líneas sólidas) y ayunados (líneas punteadas).

En un trabajo previo del laboratorio, se encontró que el homólogo del retinoblastoma *lin-35/Rb* es esencial para inducir la apoptosis de las células germinales durante el ayuno [50]. Por esta razón nos preguntamos si el aumento en la apoptosis durante la ARD dependía de este gen. Para contestar esta pregunta, sometimos a animales *ced-1::gfp* (control) y *lin-35(n745);ced-1::gfp* a 5 días en la ARD. Los animales *lin-35(n745);ced-1::gfp* mostraron niveles menores de apoptosis en la gónada que los animales *ced-1::gfp* en condiciones control, como ya había sido reportado por otros autores [72]. Después de 24 h de ayuno, los animales *lin-35(n745);ced-1::gfp* no aumentan los niveles de apoptosis tal y como se reportó previamente en el laboratorio ([50] y Fig. 26A). Calculamos la proporción de células germinales eliminadas por apoptosis con respecto a las células germinales totales como lo hicimos previamente (Figs. 23 y 25C) y observamos que en condiciones control con comida la apoptosis de los animales mutantes *lin-35(n745);ced-1::gfp* es menor que la de los animales *ced-1::gfp*. Durante la ARD, la apoptosis aumenta parcialmente, sin embargo nunca alcanza los niveles de los animales *ced-1::gfp*. Estos resultados sugieren que *lin-35/Rb* regula parcialmente la apoptosis inducida durante la ARD pero existe otro componente que contribuye al ligero incremento observado.



**Figura 26. El aumento en la apoptosis durante el ayuno depende parcialmente de *lin-35/Rb*.** Animales *lin-35(n745);ced-1::gfp* y *ced-1::gfp* fueron mantenidos por 5 días en condiciones control (líneas sólidas) y ARD (líneas punteadas). (A) Se cuantificaron los cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada durante bajo el microscopio de epifluorescencia. Se muestra el promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada con el SEM. (B) Se cuantificaron las células germinales totales en ambas condiciones usando una tinción DAPI. Se muestra el promedio de células germinales por brazo de la gónada con su SEM. (C) Se calculó el porcentaje de cuerpos apoptóticos con respecto al total de células germinales en cada brazo de la gónada ambas condiciones.

## **9.5 Mecanismo molecular que regula la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno**

En un intento para elucidar el mecanismo molecular que regula la reducción de la gónada durante la diapausa reproductiva del adulto, expusimos animales mutantes de diferentes fondos genéticos a 5 días de ayuno a partir de la etapa L4 intermedia y observamos si son capaces de reducir el tamaño de su gónada. Posteriormente, estos animales fueron re-alimentados por 3 días y observamos su capacidad para regenerar su gónada. Elegimos genes candidatos basándonos en el papel que desempeñan en la respuesta al estrés, en la proliferación de las células germinales y en otras etapas alternas al desarrollo como la diapausa Dauer, el arresto en L1 y la diapausa reproductiva del adulto. Probamos el factor nuclear *nhr-49* responsable de la entrada a la ARD y la regeneración de la gónada durante la re-alimentación [42].

Probamos el ortólogo de *C. elegans* del retinoblastoma *lin-35/Rb* debido a que es esencial para la inducción de apoptosis en las células germinales durante las primeras 6 h de ayuno [50] y parcialmente requerido para inducir la apoptosis en la ARD (este trabajo). Probamos el factor transcripcional *daf-16/FoxO* por su papel en la regulación de la diapausa dauer [74, 75]. Los factores transcripcionales *skn-1/NrF* y *pha-4/FoxA* por su implicación en la restricción calórica y la respuesta a otros tipos de estrés [76]. El ortólogo de Argonauta *alg-1* por su papel en la regulación de la vía de los ARNmi y la proliferación de las células germinales [60]. La proteína cinasa ribosomal putativa *rsks-1* debido a que ha sido descrita como una proteína de resistencia al ayuno y que, junto con *ife-1/eIF4E*, regula la progresión del ciclo celular de la línea germinal durante el desarrollo [77, 78]. *gla-3*, un gen que codifica para una proteína que contiene un dedo de zinc parecida a TIS11 y al ser mutada ocasiona un aumento en la apoptosis de las células germinales [79]. Finalmente, probamos el ortólogo en *C. elegans* p53 *cep-1*, cuya función se requiere para la respuesta a daño al ADN [80]. Ninguno de los genes probados se requiere para reducir el tamaño de la gónada durante el ayuno o regenerarla después de reestablecer las condiciones (Tabla 7).

**Tabla 7. La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno en diferentes fondos genéticos.**

Genotipo	Función relevante	Referencias	Ortólogo de humano	Respuesta al ayuno	Recuperación
N2	Control	[42, 43]	-	Gónada reducida	Gónada regenerada
<i>ced-3(n1286)</i>	La única caspasa efectora	[42, 81]	Isoforma 1 Caspasa-2	Gónada reducida No requerido	Gónada regenerada No requerido
<i>ced-3(n717)</i>	La única caspasa efectora	[42, 81]	Isoforma 1 Caspasa-2	No requerido	No requerido
<i>ced-3(ok2734)</i>	La única caspasa efectora		Isoforma 1 Caspasa-2	No requerido	No requerido
<i>nhr-49(nr2041)</i>	Regula la ARD	[39]	HNF-4 $\alpha$	No requerido	No requerido
<i>lin-35(n745)</i>	Apoptosis inducida por ayuno.	[50]	Rb	No requerido	No requerido
<i>daf-16(mgDf50)</i>	Regula la diapausa Dauer	[74]	FoxO	No requerido	No requerido
<i>skn-1(zu135)</i>	Restricción calórica y respuesta a otros estreses	[76]	Nrf	No requerido	No requerido
<i>pha-4(zu225)</i>	Restricción calórica y respuesta a otros estreses	[76]	FoxA	No requerido	No requerido
<i>alg-1(gk214)</i>	Vía de los ARNmi y proliferación celular	[60]	Argonauta	No requerido	No requerido
<i>rsk-1(ok1255)</i>	Incrementa la resistencia al ayuno	[77]	Proteína ribosomal S6K	No requerido	No requerido
<i>ife-1(bn127)</i>	Regula el número de células progenitoras germinales	[78]	eIF4e	No requerido	No requerido
<i>gla-3(op212)</i>	Aumenta la apoptosis de las células germinales	[79]	-	No requerido	No requerido
<i>cep-1(gk138);ced-1::gfp</i>	Regula la apoptosis inducida por daño al ADN	[58]	p53	No requerido	No requerido.

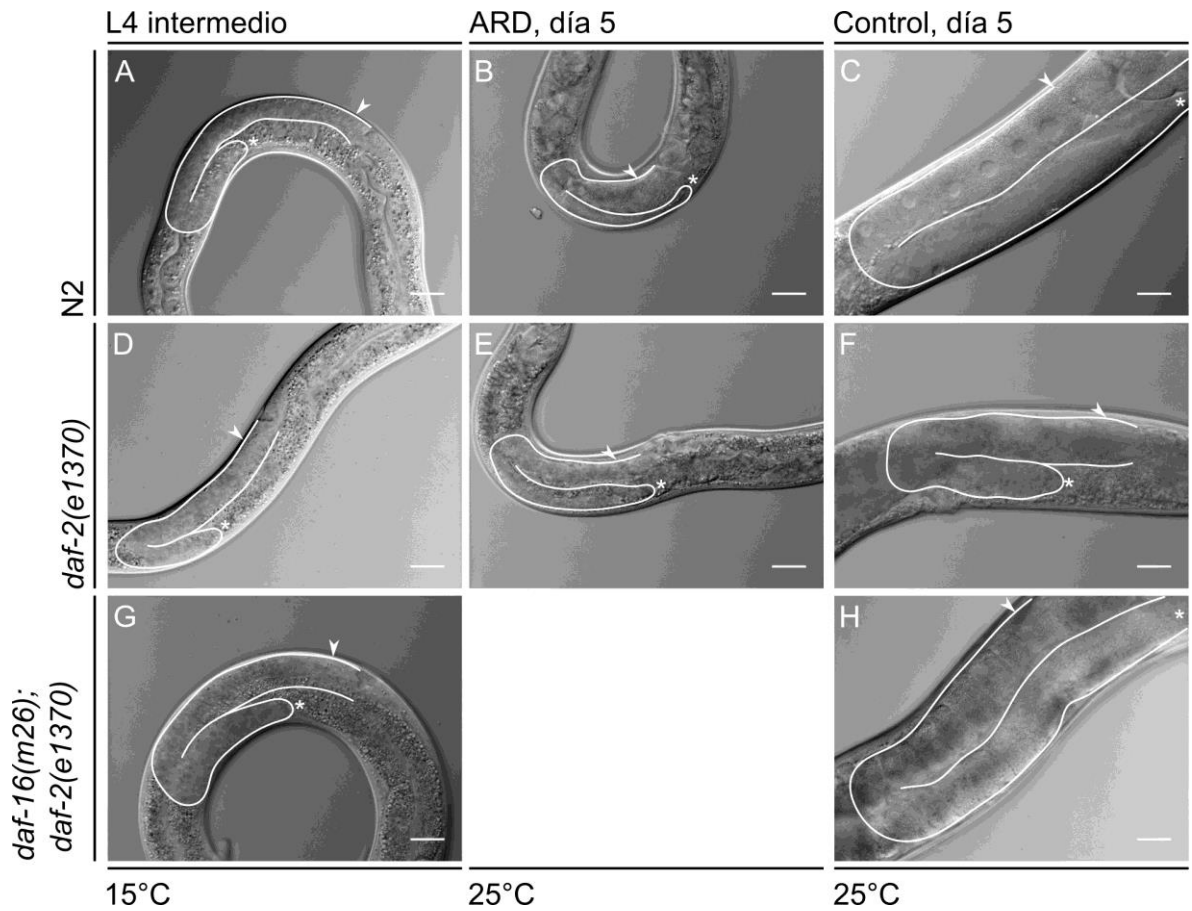
Animales hermafroditas de los diferentes fondos genéticos fueron seleccionados en la etapa L4 intermedio, ayunados por 5 días y observados diariamente en el microscopio Nomarski para comparar el tamaño de su gónada con la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno de los animales silvestres como control. Al quinto día, los animales fueron re-alimentados por 3 días y observados diariamente en el microscopio Nomarski para determinar la regeneración de su gónada con respecto a la de los animales silvestres como control.



### **9.5.1 Los animales deficientes de *daf-2* reducen el tamaño de su gónada aun en presencia de alimento**

La vía de señalización de la insulina/receptor de la insulina (IIS, por sus siglas en inglés) se ha descrito como un vínculo entre la disponibilidad de nutrientes y la homeostasis en diversos organismos, desde nemátodos hasta humanos [53]. Esta vía de señalización se mantiene activa por medio de la interacción entre moléculas de tipo insulina y su receptor. En *C. elegans* existen más de 40 péptidos relacionados a la insulina que se unen al receptor de insulina DAF-2/IR, alguno de ellos regulan negativamente al factor de transcripción DAF-16/FoxO [82, 83]. Por lo tanto, la inactivación del receptor de insulina promueven la transcripción de genes blanco mediante la activación de DAF-16 para contender con la falta de nutrientes y otros tipos de estrés [53]. Esta vía de señalización también regula la entrada a la diapausa dauer, que ocurre entre las etapas larvarias L1-L2 en respuesta a diferentes señales, entre ellas la falta de alimento [84].

Para probar el papel de *daf-2* en la respuesta de la gónada durante la diapausa reproductiva del adulto usamos la mutante termosensible *daf-2(e1370)* [85]. Poblaciones sincronizadas de animales silvestres o mutantes *daf-2(e1370)* fueron crecidas en cajas con comida e incubadas a la temperatura permisiva (15°C) hasta alcanzar la etapa L4 intermedio (Fig. 27A y D, respectivamente), después fueron incubadas a la temperatura restrictiva (25°C) y ayunados por 5 días (Fig. 27B y E). Encontramos que los animales mutantes *daf-2(e1370)* incubados en la temperatura restrictiva y ayunados por 5 días encogieron el tamaño de su gónada de manera similar a los animales silvestres (Fig. 27E) sugiriendo que *daf-2* no se requiere durante la respuesta de la gónada al ayuno.



**Figura 27.** Los animales mutantes *daf-2(e1370)* reducen el tamaño de su gónada aun en presencia de alimento a través de DAF-16/FoxO. Se muestran imágenes representativas de animales silvestres, *daf-2(e1370)* y *daf-16(m26);daf-2(e1370)* en etapa L4 intermedia crecidos en presencia de alimento a 15°C (A, D y G, respectivamente). Las animales silvestres y *daf-2(e1370)* en la etapa L4 intermedia fueron ayunados por 5 días a 25°C (B y E, respectivamente). Animales silvestres, *daf-2(e1370)* y *daf-16(m26);daf-2(e1370)* fueron crecidos desde que eclosionaron hasta la etapa L4 intermedia en presencia de alimento, posteriormente fueron incubados a 25°C por 5 días en presencia de alimento (C, F y H, respectivamente). En todas las imágenes se muestra delineado un brazo de la gónada; la gónada distal se indica con un asterisco (\*), la flecha indica la gónada proximal. Barra de escala = 20µm.

De manera inesperada, observamos que en presencia de alimento los animales mutantes *daf-2* incubados en la temperatura restrictiva reducen su gónada (Fig. 27F). Para corroborar la reducción en el tamaño de la gónada, se cuantificaron las células germinales por brazo de la gónada en las cepas *daf-2(e1370)* y silvestres teñidas con DAPI en condiciones de alimento abundante, iniciando desde la etapa L4 intermedio y 5 días después de la inactivación de la vía de la IIS. Encontramos que los animales silvestres incrementan el número de células de  $140.6 \pm 1.2$  en la etapa L4 intermedio a  $380 \pm 3.4$  5 días post L4 int. Los animales mutantes *daf-2(e1370)* no aumentaron el tamaño de su gónada, el número de células germinales por brazo de la gónada se redujo de  $137.6 \pm 1.0$  a  $77.2 \pm 1.5$  5 días post L4 intermedio (Fig. 27F, Tabla 8).

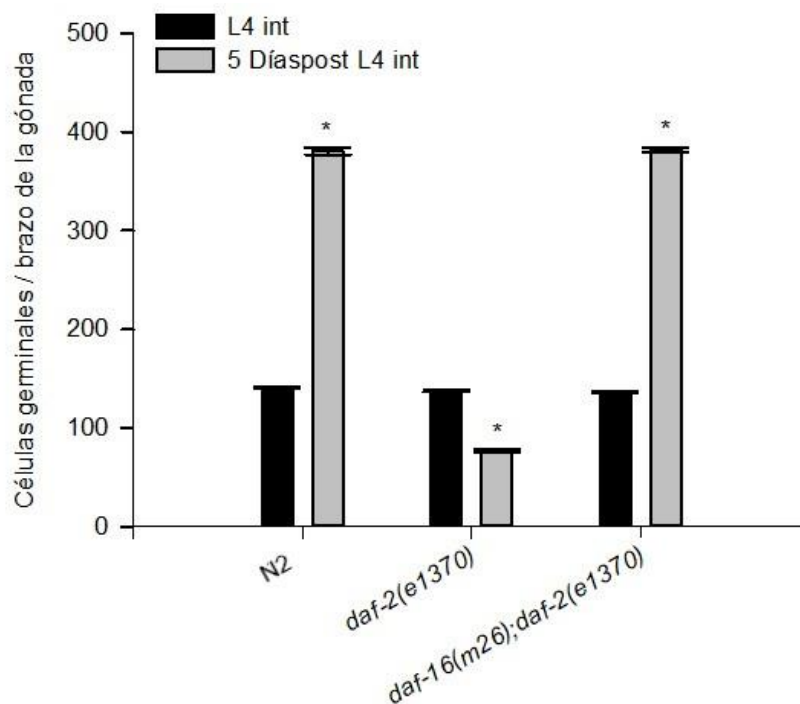
**Tabla 8. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en distintos fondos genéticos en condiciones control con comida.**

	L4 int	N	5 Días post L4 int			
			15°C	N	25°C	N
N2	$140.6 \pm 1.2$	37	$339.0 \pm 2.0$	35	$380.8 \pm 3.4$	20
<i>daf-2(e1370)</i>	$137.6 \pm 1.0$	42	$337.0 \pm 1.4$	44	$77.2 \pm 1.5$	41
<i>daf-16(m26);daf-2(e1370)</i>	$136.4 \pm 0.7$	43	$342.3 \pm 1.7$	43	$382.2 \pm 2.5$	22

Las gónadas de los animales fueron disecadas, teñidas y se cuantificaron las células germinales presentes en cada brazo de la gónada bajo el microscopio de epifluorescencia. Los animales fueron crecidos en cajas con comida desde L1 hasta L4 intermedio a 15°C y posteriormente incubados en comida a 15°C o 25°C por 5 días. Los animales fueron seleccionados y disecados. Las gónadas disecadas fueron teñidas usando DAPI y se cuantificaron las células germinales por cada brazo de la gónada bajo el microscopio de epifluorescencia.

El factor de transcripción *daf-16/FoxO* se activa cuando se elimina a *daf-2* lo que provoca cambios en la expresión de un sinnúmero de genes, algunos de ellos implicados en la regulación del metabolismo y la respuesta al estrés [86-88]. Como se describió anteriormente, *daf-16* no es necesario durante la respuesta ovogénica la gónada durante el ayuno, sin embargo, decidimos probar si la reducción de la gónada al inactivar *daf-2* en presencia de comida señala a través de *daf-16*. Para probarlo, crecimos animales dobles

mutantes *daf-16(m26);daf-2(e1370)* desde que eclosionaron hasta la etapa L4 intermedio en cajas con comida, incubados en la temperatura permisiva (15°C) y posteriormente se incubaron presencia de alimento en la temperatura restrictiva por 5 días (Fig. 27G y H). Observamos que los animales mutantes *daf-2* no reducen el tamaño de la gónada en presencia de alimento cuando *daf-16* no está presente. Cuantificamos por medio de una tinción DAPI las células germinales por brazo de la gónada los animales dobles mutantes *daf-16(m26);daf-2(e1370)* y encontramos que el número de células germinales se incrementó de  $136.4 \pm 0.7$  en la etapa L4 intermedio a  $382.2 \pm 2.5$  5 días después de la inactivación de la vía de la insulina en presencia de alimento, de manera similar a los animales silvestres (Fig. 28 y Tabla 8).



**Figura 28.** Los animales mutantes *daf-2(e1370)* reducen el número de células germinales aun en presencia de alimento a través de DAF-16/FoxO. Cuantificación de las células germinales por brazo de la gónada en animales de los fondos mutantes mencionados. Los animales fueron crecidos a la temperatura permisiva hasta la etapa L4 intermedia, posteriormente transferidos a la temperatura restrictiva por 5 días en presencia

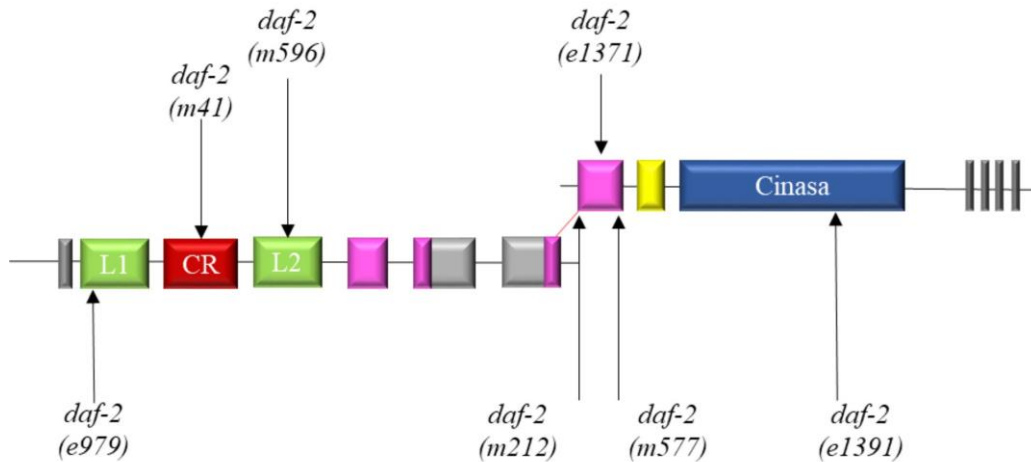
de alimento. Los animales fueron seleccionados en la etapa L4 intermedia (barras negras) y 5 días después de inactivar la vía de la IIS (barras grises) y disecados, sus gónadas fueron teñidas con DAPI y se cuantificaron las células germinales bajo el microscopio de epifluorescencia. Se muestra el promedio de células germinales con el SEM.

### **9.5.2 Algunas mutaciones en el receptor de insulina promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento**

Existe una gran variedad de alelos diferentes que modifican al locus que codifica para el receptor de insulina de *C. elegans* y afectan su función a distintos niveles [89]. *daf-2* se localiza en el cromosoma III y codifica 9 isoformas del receptor de insulina, el cual al ser traducido forma homodímeros transmembranales. En la región N-terminal posee un péptido señal que es eliminado durante el procesamiento del pro-receptor. Tiene dos regiones ricas en leucina (L1 y 2), una región rica en cisteínas (CR), dos subunidades tipo III de fibronectina (FnIII1 y 2), la región transmembranal, un dominio tirosín-cinasa y unos sitios de unión SH2 [89]. Algunos de los fenotipos de las diferentes mutaciones es la entrada constitutiva a la diapausa dauer (Daf-c) y la extensión en la esperanza de vida (Age), estos efectos varían en su intensidad y son específicos para cada alelo, lo que ha llevado a la clasificación de los alelos en dos grupos dependiendo de su interacción epistática con el receptor nuclear de hormonas, *daf-12*; aquellos alelos en los que se suprimen los fenotipos Daf-c y Age por la falta de *daf-12* pertenecen a la clase I. Los alelos clase II, no son suprimidos por la falta de *daf-12* y son más pleiotrópicos [90].

Para profundizar en el estudio de la inactivación de la vía de la insulina y saber qué dominios en el receptor de insulina se requieren para reducir el tamaño de la gónada en presencia de alimento, determinamos el efecto que tiene la inactivación de *daf-2* a partir de la etapa L4 intermedio por 5 días en presencia de alimento usando 7 alelos que presentan sustituciones de nucleótidos en el locus del gen *daf-2* y causan cambios en diferentes regiones de la proteína de manera sensible a la temperatura; 5 alelos clase I *daf-2(m212)*, (*m41*), (*m596*), (*m577*) y (*e1371*) y 2 pertenecientes a la clase II (*e1391*) y (*e979*). Todos

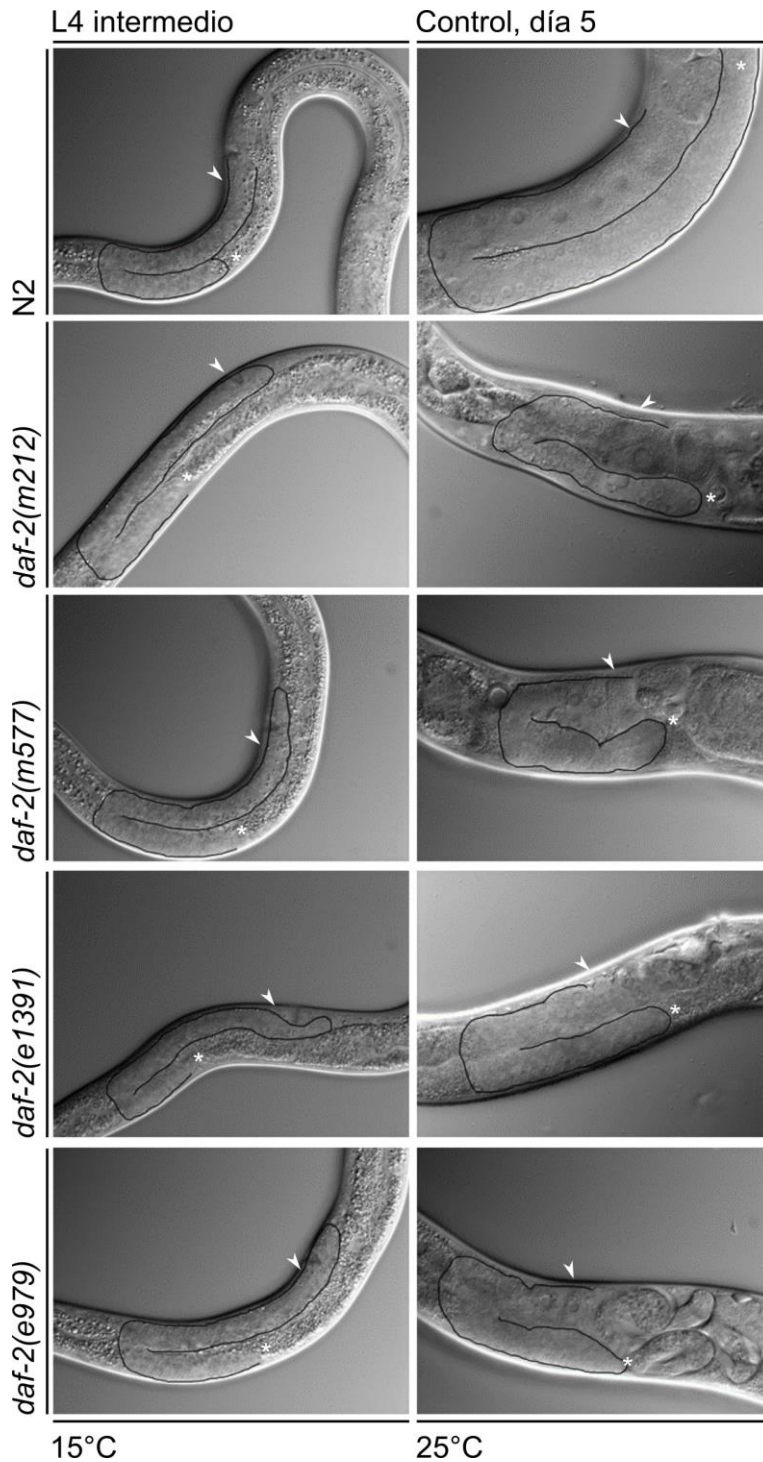
los alelos probados exhiben una disminución en la función del receptor de insulina y han sido descritos, mapeados y estudiados a detalle extensivamente por otros autores [89] (Fig. 29).



**Figura 29. Posición de las mutaciones que afectan a la proteína DAF-2 empleadas en el presente trabajo.** Se muestran los alelos empleados en el presente trabajo y las regiones en el receptor de insulina, DAF-2. Se muestra una proteína del homodímero que conforma al receptor de insulina en *C. elegans*, de derecha a izquierda el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente. En verde se muestran las regiones ricas en lisina (L1 y L2), la región rica en cisteínas (CR), en magenta los dominios tipo III de fibronectina, en amarillo el dominio transmembranal, en azul marino el dominio tirosín-cinasa y finalmente los sitios de unión SH2. En el esquema las flechas indican la posición aproximada de las mutaciones en cada alelo. Imagen modificada de [89].

Al someter a los animales mutantes *daf-2* de siete alelos distintos y comparar su respuesta con la del alelo *daf-2(e1370)* obtuvimos resultados variables, los alelos *m212*, *m577*, *e1391* y *e979* respondieron de manera equivalente al alelo *daf-2(e1370)*, reduciendo el tamaño de su gónada al inactivar la vía de la insulina a partir de L4 intermedio aun en presencia de alimento (Fig. 31). El alelo *daf-2(m212)* presenta una sustitución en el codón TGT-TAT que resulta en un cambio C883Y en el dominio FnIII2ID. El alelo *daf-2(m577)*

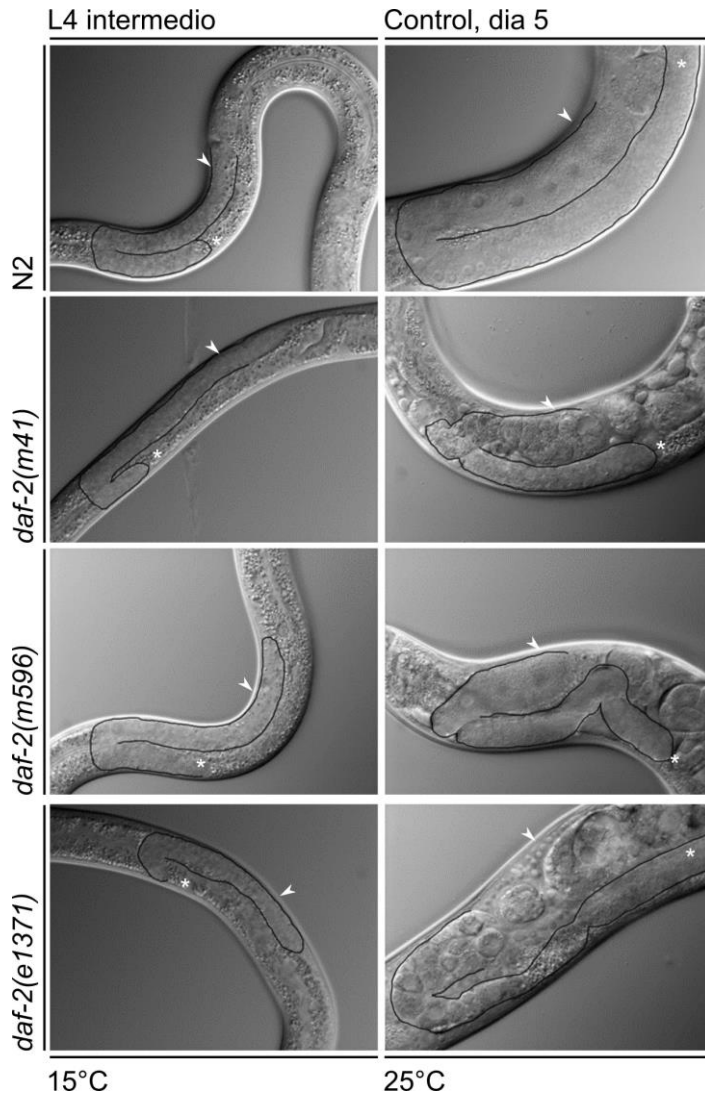
presenta una sustitución en el codón TGC-TAC que resulta en un cambio C1045Y también en el dominio FnIII2 $\beta$ . El alelo *daf-2(e1391)* presenta una sustitución en el codón CCC-CTC que resulta en un cambio P1434L en el dominio tirosín-cinasa, en una región de la proteína cercana a la mutación del alelo *daf-2(e1370)*. Finalmente, El alelo *daf-2(e979)* presenta una sustitución en el codón TGC-TAC que resulta en un cambio C146Y en el dominio L1 (Fig. 30). Estos resultados sugieren que algunas mutaciones en estos dominios (FnIII2, L1 y tirosín-cinasa) promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.



**Figura 30. Mutaciones en los dominios L1, FnIII2 y tirosín-cinasa promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.** Se muestran imágenes representativas de animales mutantes *daf-2* de diferentes alelos (*m212*, *m577*, *e1391* y *e979*) y animales silvestres como control, los cuales fueron crecidos en cajas con comida desde que eclosionaron hasta la etapa L4 intermedia incubados a 15°C. Posteriormente incubados en presencia de alimento a 25°C por 5 días. Imágenes Nomarski donde delineó el contorno de un brazo de la gónada, el asterisco (\*) indica la gónada distal, la flecha indica la gónada proximal.



Adicionalmente, los alelos *m41*, *m596* y *e1371* no respondieron como el alelo *daf-2* (*e1370*) descrito anteriormente, es decir, el tamaño de su gónada permaneció sin alteraciones en su tamaño (Fig. 32). El alelo *daf-2(m41)* presenta una sustitución en el codón CGA-GAA que resulta en un cambio G383E en la región CR del receptor de insulina. El alelo *daf-2(m596)* presenta una sustitución en el codón GGC-AGC que resulta en un cambio G547S en la región L2. Finalmente, el alelo *daf-2(e1371)* presenta una sustitución en el codón GGA-GAA que resulta en un cambio G803E en el dominio FnIII2 $\alpha$  (Fig. 31). Estos resultados indican que las alteraciones en esas regiones del receptor de insulina no promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.



**Figura 31. Mutaciones en los dominios L2, CR y una sección del *FnIII2* no promueven la reducción de la gónada en presencia de alimento.** Se muestran imágenes representativas de animales mutantes *daf-2* de diferentes alelos (*m41*, *m596* y *e1371*) y animales silvestres como control, los cuales fueron crecidos en cajas con comida desde que eclosionaron hasta la etapa L4 intermedia incubados a 15°C. Posteriormente incubados en presencia de alimento a 25°C por 5 días. Imágenes Nomarski donde delineó el contorno de un brazo de la gónada, el asterisco (\*) indica la gónada distal, la flecha indica la gónada proximal.

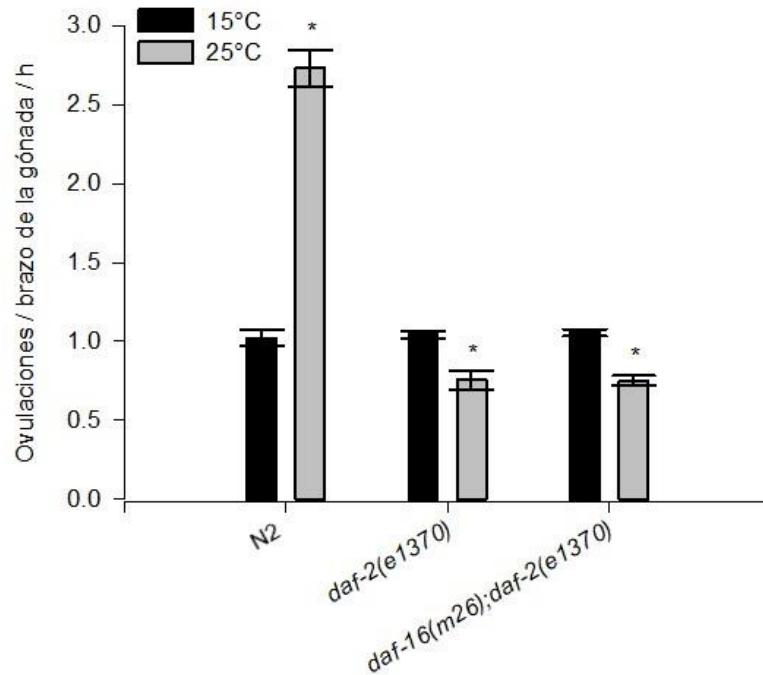
### 9.5.3 La vía de la insulina regula algunos fenómenos durante la respuesta de la gónada al ayuno

La diapausa reproductiva del adulto se caracteriza por la reducción en la fertilidad causada por la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno, caracterizada por la detención de la proliferación de las células en mitosis, la desaceleración de la progresión de la meiosis, un aumento en la apoptosis de las células germinales, la producción de un único ovocito a la vez por cada brazo de la gónada y la disminución en la tasa de ovulación, que ocasionan la reducción reversible del tamaño de la gónada ([25, 42-44, 71] y este trabajo).

Para probar si la inactivación de la vía de la insulina podría mimetizar la respuesta de la gónada al ayuno en presencia de alimento llevamos a cabo una serie de experimentos complementarios. Nos preguntamos si la inactivación de la vía de la insulina en presencia de alimento ocasiona la producción de un único ovocito a la vez. Para ello, observamos las gónadas de los animales *daf-2(e1370)* a los cuales se les inactivó la vía de la insulina en presencia de alimento desde L4 intermedio. Encontramos que estos animales no mostraban este fenotipo (Fig. 27F).

Además, determinamos la tasa de ovulación en animales silvestres, mutantes *daf-2(e1370)* y *daf-16(m26);daf-2(e1370)* adultos de 1 día que crecieron a 15°C y posteriormente incubados a 25°C en presencia de alimento. Encontramos que los animales silvestres ovulan aprox. 2.5-veces más si se transfieren a 25°C que los animales silvestres mantenidos a 15°C (N=30) (Fig. 32). Por el contrario, los animales mutantes *daf-2(e1370)* no incrementan su tasa de ovulación cuando son transferidos a 25°C (N=33). Finalmente, los animales dobles mutantes en *daf-16(m26);daf-2(e1370)* tampoco presentan un incremento en la tasa de ovulación (N=33) (Fig. 29). Con estos resultados podemos concluir que aunque DAF-2 podría participar en la respuesta de la gónada al ayuno podría no ser la única señal que participa en este fenómeno. Otra posible explicación es que debido a los

fenotipos pleiotrópicos que origina la mutación en *daf-2* resulte difícil el estudio de su papel en la respuesta de la gónada al ayuno en este fondo genético.



**Figura 32. La tasa de ovulación disminuye al inactivar la vía de la insulina.** Se determinó la tasa de ovulación por cada brazo de la gónada por h en animales silvestres, *daf-2(e1370)* y *daf-16(m26);daf-2(e1370)* adultos de un día. Los animales fueron crecidos a 15°C desde L1 hasta L4 intermedio, posteriormente fueron mantenidos por 24 h a esa 15°C o a 25°C. Los animales fueron seleccionados individualmente y se cuantificaron los embriones dentro del útero, colocados en una caja con comida por 4 h y finalmente se cuantificaron los embriones depositados en la caja y los presentes dentro del útero. La tasa de ovulación se calculó como sigue: (número final de embriones - número inicial) / (2 gónadas \* 4 h). La gráfica muestra el promedio de ovulaciones por brazo de la gónada por h ( $\pm$ SEM). Las diferencias fueron comparadas por medio de un ANOVA rangos y la prueba de Dunn. \* =  $P < 0.05$ .

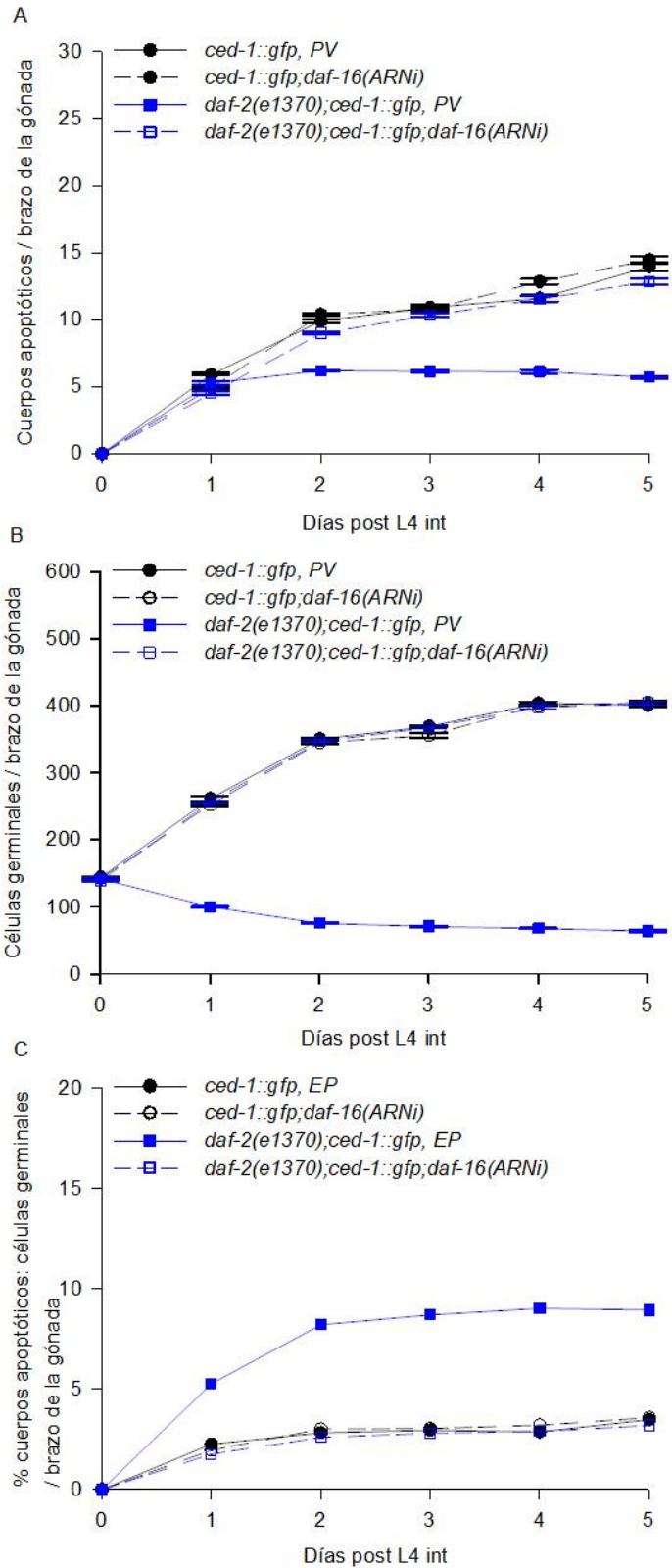
#### 9.5.4 La inactivación de la vía de la insulina causa un incremento en la apoptosis aún en presencia de alimento

Otro aspecto a evaluar para ver si la inactivación de *daf-2* promueve la respuesta de la gónada al ayuno en presencia de alimento fue evaluar los niveles de apoptosis de las células germinales. Para ello, empleamos poblaciones sincronizadas de animales *ced-1::gfp* y *daf-2(e1370);ced-1::gfp* crecidos en cajas con comida desde L1 hasta L4 intermedio a 15°C, posteriormente los animales se incubaron a 25°C para inactivar la vía de la IIS en cajas con alimento. Observamos a partir del día 1 post L4 intermedio, los animales *daf-2(e1370);ced-1::gfp* presentan niveles de apoptosis menores que los animales *ced-1::gfp* y estos niveles son constantes durante todo el experimento (Fig. 33A).

Posteriormente, cuantificamos las células germinales por brazo de la gónada al inactivar la vía de la IIS. Empleamos animales *ced-1::gfp* y *daf-2(e1370);ced-1::gfp* y una tinción DAPI para cuantificar sus células germinales. Encontramos que en los animales *daf-2(e1370);ced-1::gfp* el número de células disminuyó progresivamente hasta un mínimo de 70 células (Fig. 33B). Al comparar la proporción de células eliminadas por apoptosis con respecto al total de células germinales por brazo de la gónada encontramos que en los animales *daf-2(e1370);ced-1::gfp* los niveles de apoptosis se encuentran incrementados (Fig. 33C). Estos resultados indican que la inactivación de la vía de la IIS induce la apoptosis de las células germinales en presencia de alimento.

A continuación nos preguntamos si el factor transcripcional DAF-16/FoxO es necesario para inducir la apoptosis de las células germinales al inactivar la vía de la insulina en presencia de alimento. Para ello, Empleamos animales *ced-1::gfp* y *daf-2(e1370);ced-1::gfp* en los cuales se silenció *daf-16* por medio de ARN interferente, *daf-16(ARNi)*. Cuantificamos los niveles de apoptosis usando el microscopio de epifluorescencia y encontramos que al silenciar *daf-16(ARNi)* en los animales *ced-1::gfp* y *daf-2(e1370);ced-1::gfp* los niveles de apoptosis no presentan diferencias y aumentan conforme a la edad de los animales (Fig. 33A).

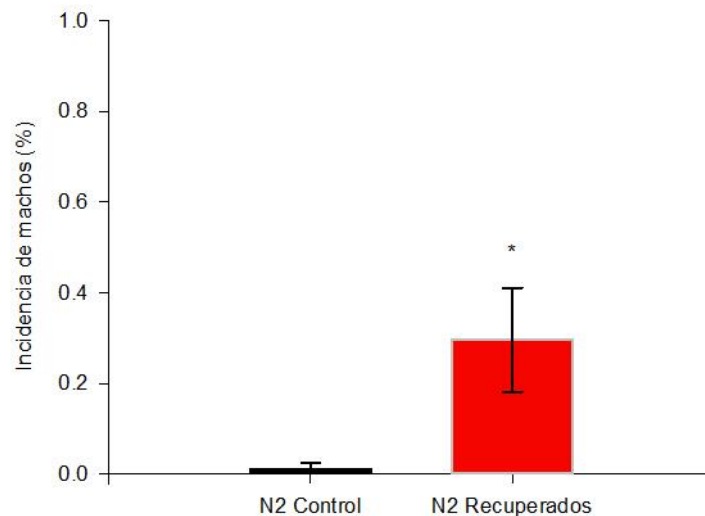
Al cuantificar las células germinales por brazo de la gónada. Al silenciar *daf-16(ARNi)* en los animales *ced-1::gfp* y *daf-2(e1370);ced-1::gfp* observamos que el número de células germinales incrementa conforme a la edad de los animales (Fig. 33B). Cuando calculamos la relación de las células germinales eliminadas por apoptosis con respecto al total de las células germinales en la gónada al silenciar *daf-16(ARNi)* en los animales *daf-2(e1370);ced-1::gfp* encontramos que los niveles de apoptosis no aumentan (Fig. 33C). Estos resultados indican que el aumento en la apoptosis de las células germinales al inactivar la vía de la IIS en presencia de alimento es dependiente de *daf-16/FoxO*.



**Figura 33. La apoptosis de las células germinales aumenta al inactivar la vía de la IIS en presencia de alimento.** (A) Animales *daf-2(e1370);ced-1::gfp* y *ced-1::gfp* fueron usados para cuantificar los cuerpos apoptóticos en cada brazo de la gónada durante 5 días al inactivar la vía de la IIS en cajas de *PV* (líneas sólidas) y *daf-16(ARNi)* (líneas punteadas). Se muestra el promedio de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada con el SEM. (B) Se usó una tinción DAPI para cuantificar las células germinales presentes en cada brazo de la gónada al inactivar la vía de la IIS en cajas de *PV* (líneas sólidas) y *daf-16(ARNi)* (líneas punteadas). Se muestra el promedio de células germinales por brazo de la gónada con el SEM. (C) Se calculó el porcentaje de cuerpos apoptóticos con respecto al total de células germinales en cada brazo de la gónada al inactivar la vía de la IIS en cajas de *PV* (líneas sólidas) y *daf-16(ARNi)* (líneas punteadas).

## 9.6 Existe una mayor incidencia de machos entre la progenie producida por animales expuestos a la ARD

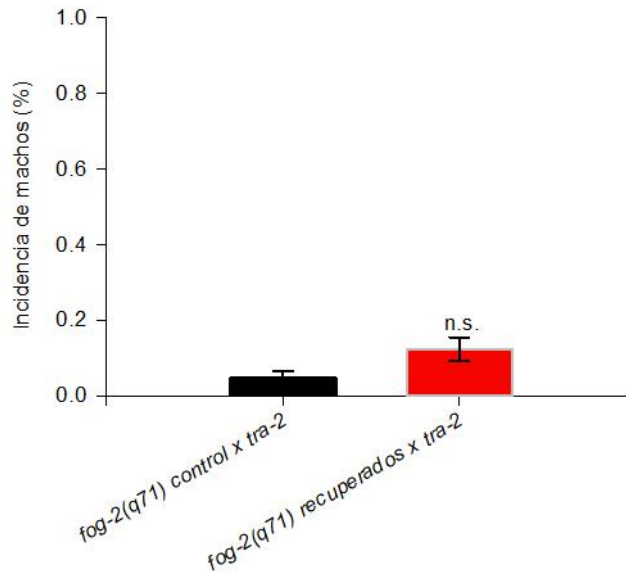
*C. elegans* puede encontrarse de manera natural como hermafroditas (XX) y machos (XO). Los hermafroditas pueden reproducirse, ya sea por autofertilización o mediante cruces empleando el esperma de los machos. En condiciones normales de laboratorio las poblaciones son casi exclusivamente de hermafroditas y los machos aparecen con una frecuencia muy baja dentro de la población (<0.5%), esto se debe a errores en la disyunción y la pérdida del cromosoma X [91]. Al realizar los experimentos con los animales recuperados de la ARD observamos que había machos dentro de la progenie por lo que cuantificamos su incidencia. Encontramos que los animales silvestres recuperados de la ARD exhiben 3 veces más machos que sus controles (Tabla 1) (Fig. 34). Este resultado nos indica que la ARD causa defectos en la segregación de los cromosomas sexuales.



**Figura 34. Los animales recuperados de la ARD presentan una mayor incidencia de machos.** La gráfica muestra el porcentaje de machos dentro de la progenie producida por animales silvestres en condiciones control y animales recuperados de la ARD. Se muestra el promedio ( $\pm$ SEM) del porcentaje de machos producido por cada animal. Los datos se analizaron empleando la prueba de Mann-Whitney ( $P= 0.019$ ).



Debido a que la aparición de machos dentro de la progenie puede ser causada por errores en la segregación de los cromosomas sexuales durante la meiosis de las células germinales, nos propusimos estudiar si los defectos que causan la aparición de machos ocurren en las células germinales femeninas. Para ello, empleamos animales mutantes *tra-2(q276)*, los cuales son genéticamente XX pero producen machos (XX) funcionales y capaces de fertilizar ovocitos [92]. En otras palabras, si ocurren defectos en la segregación de los cromosomas en los animales *fog-2(q71)* que pasaron por la ARD, éstos producirán ovocitos (X) y (O), los cuales al ser fertilizados con esperma proveniente de los machos *tra-2(q256)* (X), pondrían en evidencia los defectos en la segregación de los cromosomas en los ovocitos al producir machos (XO). Al comparar la incidencia de machos al cruzar individualmente animales *fog-2(q71)* recuperados de la ARD y animales *fog-2(q71)* en condiciones control con machos *tra-2(q276)* bien alimentados. Encontramos que los animales recuperados producen ~2.6 veces más machos que sus controles, sin embargo esta diferencia no es significativa (Fig. 35). Estos resultados sugieren que la aparición de machos dentro de la progenie de los animales recuperados de la ARD se debe a defectos en los espermatozoides que han sido expuestos al ayuno prolongado.



**Figura 35. El esperma expuesto contribuye a la aparición de machos dentro de la población de animales recuperados de la ARD.** La gráfica muestra el porcentaje de machos dentro de la progenie producida por animales *fog-2(q71)* en condiciones control y recuperados de la ARD. Para los animales control, los animales *fog-2(q71)* fueron seleccionados en la etapa L4 intermedia y cruzados por 24 h en presencia de 4 machos *tra-2(q276)* que nunca fueron ayunados, posteriormente los animales *fog-2(q71)* fueron transferidos a cajas frescas con comida diariamente hasta que dejaran de depositar embriones. Para los animales recuperados, se seleccionaron animales *fog-2(q71)* en la etapa L4 intermedia, se ayunaron por 5 días y se recuperaron en cajas con comida durante 24 h. Posteriormente fueron cruzados por 24 h en presencia de 4 machos *tra-2(q276)* que nunca fueron ayunados, transferidos a cajas frescas con comida diariamente hasta que dejaran de depositar embriones. Se muestra el promedio ( $\pm$ SEM) del porcentaje de machos producido por cada animal. Los datos se analizaron empleando la prueba de Mann-Whitney, n.s. = no hay diferencia significativa ( $P = 0.058$ ).

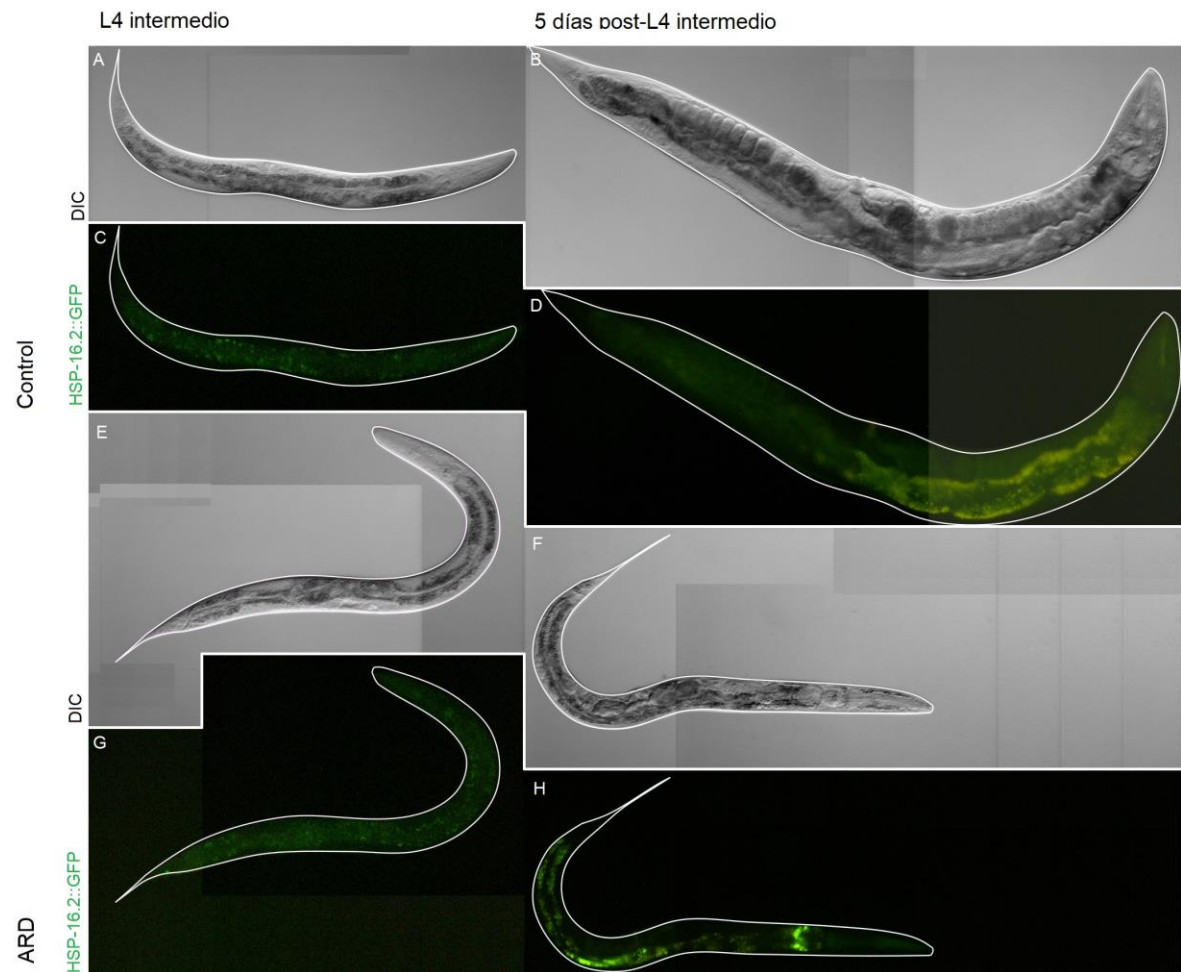
## **9.7 La diapausa reproductiva del adulto no protege a los animales de otros tipos de estrés**

Durante la diapausa Dauer, los animales se vuelven más resistentes a diferentes tipos de estrés, i.e. oxidativo, choque de calor [93, 94]. Nos propusimos evaluar si los animales en ARD presentan las mismas características. Las larvas Dauer cambian la composición de su cutícula y sellan sus orificios, volviéndose impermeable a los detergentes y la desecación [39]. Probamos si los animales en la ARD son impermeables al agente tensoactivo aniónico, dodecilsulfato de sodio (SDS). Para ello, indujimos la entrada en la ARD a una población de animales por 5 días, después los animales fueron tratados con una solución de SDS 1% por 20 minutos en placas sin comida (N= 55). Para los controles, sometimos larvas L1-L2 *daf-2(e1370)* a la temperatura restrictiva para inducir la entrada a la diapausa Dauer (N= 40) y empleamos animales silvestres adultos de 5 días bien alimentados (N= 40). Encontramos que los animales Dauer sobreviven al tratamiento con SDS, sin embargo, los animales bien alimentados o los animales ARD no sobreviven a estas condiciones. Estos resultados demuestran que la ARD no confiere resistencia al SDS como en la diapausa Dauer.

### **9.7.1 La ARD no confiere protección para sobrevivir durante el choque de calor**

Se sabe que los animales mutantes que carecen de las células germinales, pero no en las células somáticas de la gónada, exhiben cambios a nivel transcripcional que les permiten contender con el estrés [95]. Debido a que durante el ayuno prolongado ocurre una pérdida progresiva de células germinales, nos preguntamos si la reducción en el número de células germinales durante la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno tiene un efecto en la resistencia de los animales al estrés. Inicialmente estudiamos algunos cambios en la expresión de genes relacionados con la respuesta a otros tipos de estrés; choque de calor y oxidativo.

Para saber si la reducción en el número de células germinales durante la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno tiene un efecto en la resistencia de los animales al choque de calor. Para responder a esta pregunta usamos animales transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente bajo el promotor de una chaperona que aumenta su expresión durante el choque de calor, HSP-16.2. Este transgénico nos permite la visualización directa, localización y cuantificación de la proteína verde fluorescente bajo el promotor *hsp-16.2* en animales vivos cuando son sometidos a diferentes condiciones [96]. Determinamos el patrón de expresión de la proteína HSP-16.2::GFP durante los primeros 5 días posteriores a la etapa L4 intermedio (Fig. 36C y G), en condiciones control con comida y en ayuno a 20°C. Encontramos que en los animales control y los ayunados no existe una expresión significativa de dicho reportero a lo largo del experimento y hasta 5 días post-L4 intermedio en condiciones control (Fig. 36D) y en ARD (Fig. 36G). Estos resultados sugieren que la ARD no induce la expresión de una proteína necesaria para contender con el choque de calor.



**Figura 36. La ARD no induce la expresión una respuesta de protección contra el choque de calor.** Animales transgénicos  $P_{hsp-16.2}::gfp$  fueron sometidos a la ARD y mantenidos en condiciones control por 5 días. Se muestran imágenes representativas Nomarski de animales en la etapa L4 intermedia (A y E) y 5 días después en condiciones control (B) y ARD (F). Imágenes representativas de epifluorescencia de los animales en la etapa L4 intermedia (C y G) y 5 días después en condiciones control (D) y ARD (H) Se muestran delineado el contorno de los animales en microscopía 20x.

A continuación, nos preguntamos si los animales en ARD eran capaces de activar la expresión de la chaperona necesaria para contender al choque de calor. Para probarlo, sometimos a una población de animales en ARD (Fig. 37B) a 31°C por 3 h. Encontramos que el tratamiento de choque de calor induce la expresión del reportero  $P_{hsp-16.2}::gfp$  en

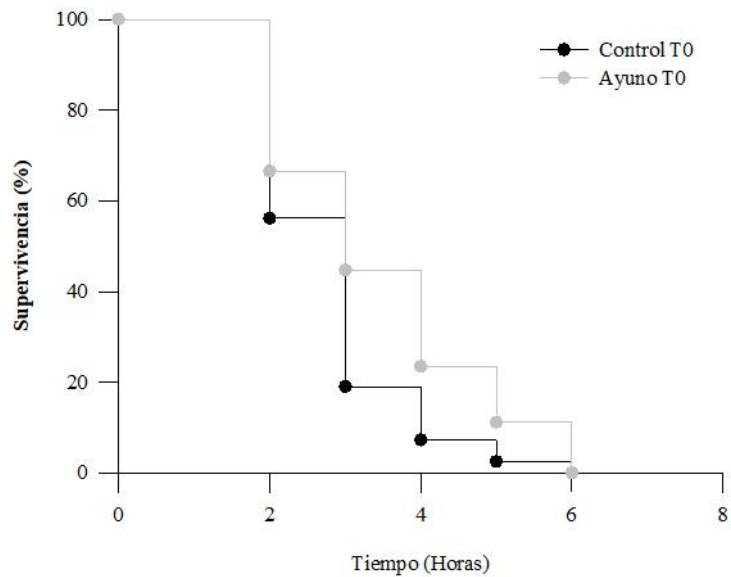
diversos tejidos como; el intestino, la faringe, entre otros (Fig. 37D). Estos resultados indican que es posible inducir la respuesta al choque de calor, activando la expresión de la proteína HSP-16.2::GFP durante la ARD.



**Figura 37. Los animales sometidos a la ARD pueden inducir una respuesta contra el choque de calor.** Animales de 5 días en ARD fueron sometidos a un choque de calor de 31°C / 3 h. Se muestran imágenes representativas Nomarski de animales transgénicos *P<sub>hsp-16.2</sub>::gfp* en ARD en la temperatura control 20°C (A) y al ser sometidos a un choque de calor de 31°C/3 h (C). Imágenes de epifluorescencia de los animales ARD a 20°C (B) y después de un tratamiento de choque de calor (D). Se muestran delineado el contorno de los animales en microscopía a 20x.

Los animales expuestos a periodos breves de ayuno (STS, por sus siglas en inglés *short-term starvation*, 48 o 60 h) son capaces de resistir al estrés sin modificar su ciclo reproductivo, esta respuesta es de gran relevancia debido a que en la vida libre los animales enfrentan estos periodos de ayuno de manera habitual. Estudios recientes han demostrado que los animales ayunados brevemente desarrollan una respuesta que les confiere protección a nivel celular contra al estrés [97, 98]. Nos preguntamos si los animales expuestos al ayuno prolongado son más resistentes al choque de calor.

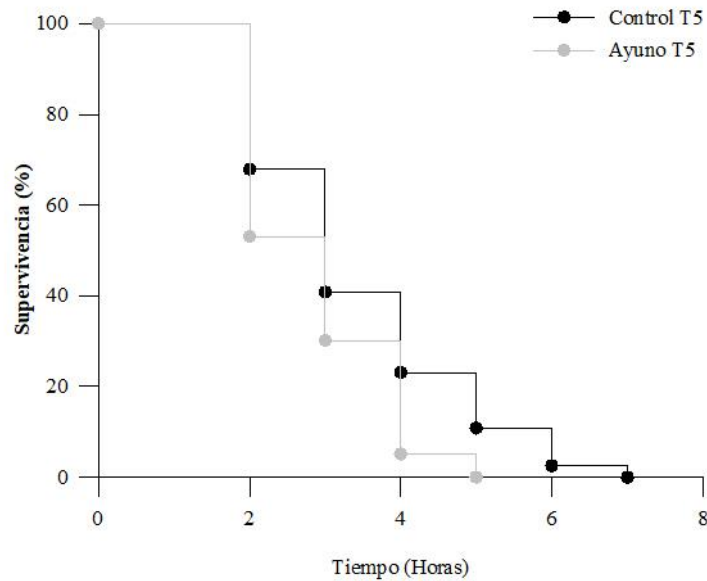
Para probar la resistencia al choque de calor, determinamos la supervivencia de animales L4 intermedio, es decir durante la entrada a la ARD y se comparó con la de los animales L4 intermedio bien alimentados como control. Los animales fueron expuestos a un tratamiento térmico de 36°C durante 7 horas. Encontramos que la población de animales en condiciones control disminuye casi en un 50% a las 2 horas del tratamiento y en un 100% a las 6 horas (Fig. 38; línea negra). Los animales en condiciones de ayuno exhiben mayor resistencia al tratamiento de choque de calor en cada punto analizado (Fig. 32; línea gris). Estos resultados sugieren que la entrada a la ARD confiere resistencia al choque de calor.



**Figura 38. La entrada en ARD promueve la resistencia al choque de calor.** Curvas de supervivencia de animales en la etapa L4 intermedia en condiciones control con comida (línea negra, N= 180) y en la entrada a la ARD (línea gris, N=165) expuestos a un choque de calor de 36°C por 7 horas. La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia en 3 experimentos independientes. Se comparó la diferencia entre ambas curvas de supervivencia empleando la prueba rango logarítmico (Kaplan-Meier) ( $P \leq 0.001$ ).

A continuación, nos preguntamos si los animales en ARD siguen siendo resistentes al choque de calor. Para ello analizamos la supervivencia a un tratamiento térmico de 37°C / 7 h en animales que de 5 días en ARD y se comparó con animales control de 5 días bien alimentados. Encontramos que los animales en ARD (Fig. 33, línea gris) sometidos al choque de calor exhiben una menor resistencia en todos los puntos analizados (Fig. 39, línea negra). Estos resultados sugieren que al transcurrir más tiempo en ARD se pierde la capacidad de los animales para contener al choque de calor.





**Figura 39. Los animales en ARD son más susceptibles al choque de calor.** Curvas de supervivencia de animales silvestres de 5 días post-L4 intermedio en condiciones control con comida (línea negra, N= 100) y en ayuno (línea gris, N=120) expuestos a un choque de calor de 36°C por 7 horas. La gráfica muestra el porcentaje de supervivencia en 3 experimentos independientes. Se comparó la diferencia entre ambas curvas de supervivencia empleando la prueba rango logarítmico (Kaplan-Meier) ( $P \leq 0.001$ ).

### 9.7.2 La ARD promueve la expresión de *sod-3*, un gen para contender contra del estrés oxidativo

En condiciones control con comida, los animales expresan la proteína superóxido dismutasa mitocondrial SOD-3::GFP de manera débil en la faringe y las células del intestino. La expresión de SOD-3::GFP puede ser inducida por medio de diversas intervenciones; al inactivar la vía de la insulina y someter a los animales a 24 h de ayuno [99]. Nos preguntamos si existen cambios en la expresión de SOD-3::GFP durante la diapausa reproductiva del adulto. Para probarlo sometimos a la diapausa a animales transgénicos que producen la proteína verde fluorescente unida a la proteína SOD-3 [100] y comparamos diariamente por 5 días su patrón de expresión con animales control con comida. Encontramos que en los animales control la expresión de la proteína SOD-3::GFP

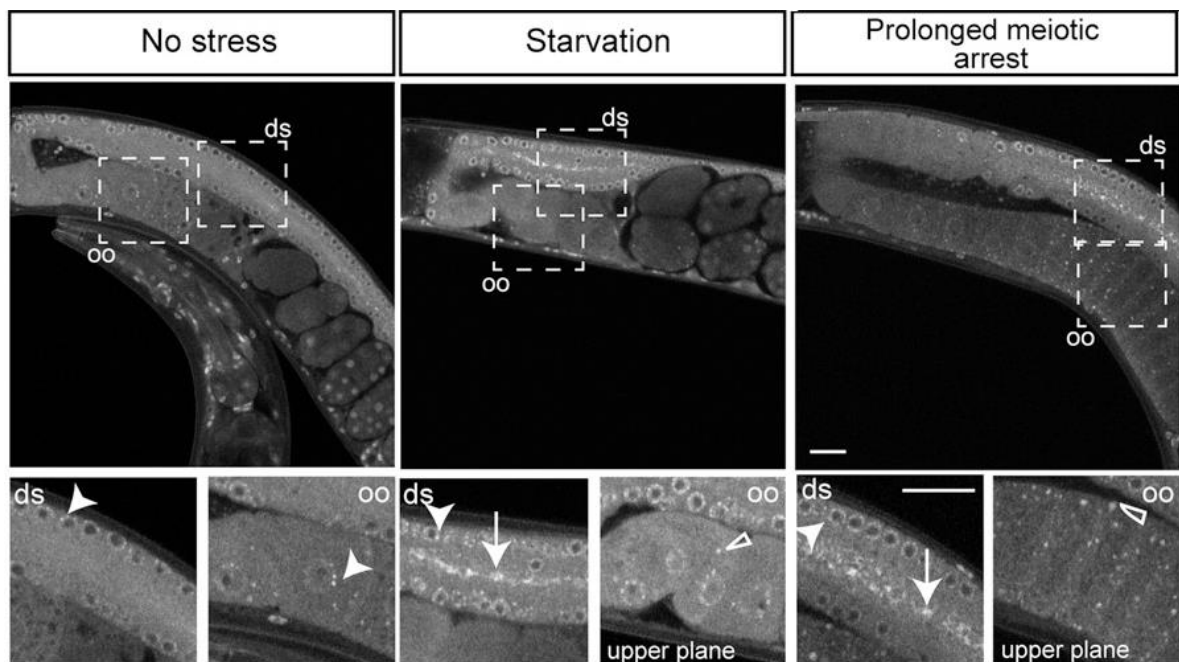
aumenta progresivamente con la edad de los animales, desde la etapa L4 intermedio hasta 5 post-L4 intermedio, en diversos tejidos como la faringe y la cabeza (Fig. 40A-D). Además, después del día 1 post-L4 intermedio aparece la expresión de SOD-3::GFP en algunas células de la cola de los animales, la cual aumenta ligeramente con la edad de los animales (Fig. 40B). Durante la ARD, la expresión de SOD-3::GFP se incrementa en las primeras 24 h de ayuno, desde la etapa L4 intermedio (Fig.40E) al tiempo 1 en la faringe y algunas neuronas a lo largo del animal y especialmente en las de la cola (Fig. 40F). Posteriormente, la expresión del reportero disminuye progresivamente conforme transcurre el ayuno manteniéndose constante su expresión en la faringe (Fig. 40G-H). Estos resultados sugieren que el ayuno ocasiona una respuesta al estrés oxidativo transitoria, desde el tiempo 0 hasta el tiempo 1, sin embargo esta respuesta no se mantiene a lo largo de todo el ayuno.



**Figura 40. La ARD promueve una respuesta transitoria contra el estrés oxidante.** Animales *sod-3::gfp* fueron sometidos a la ARD o mantenidos en condiciones con comida por 5 días. Se muestran imágenes representativas de epifluorescencia 20x de animales transgénicos *sod-3::gfp* en condiciones control con comida (A-D) y durante la ARD (E-H). La escala indica 50  $\mu\text{m}$ .

### 9.7.3 La ARD no promueve la formación de gránulos de ribonucleoproteicos estrés dentro de la gónada

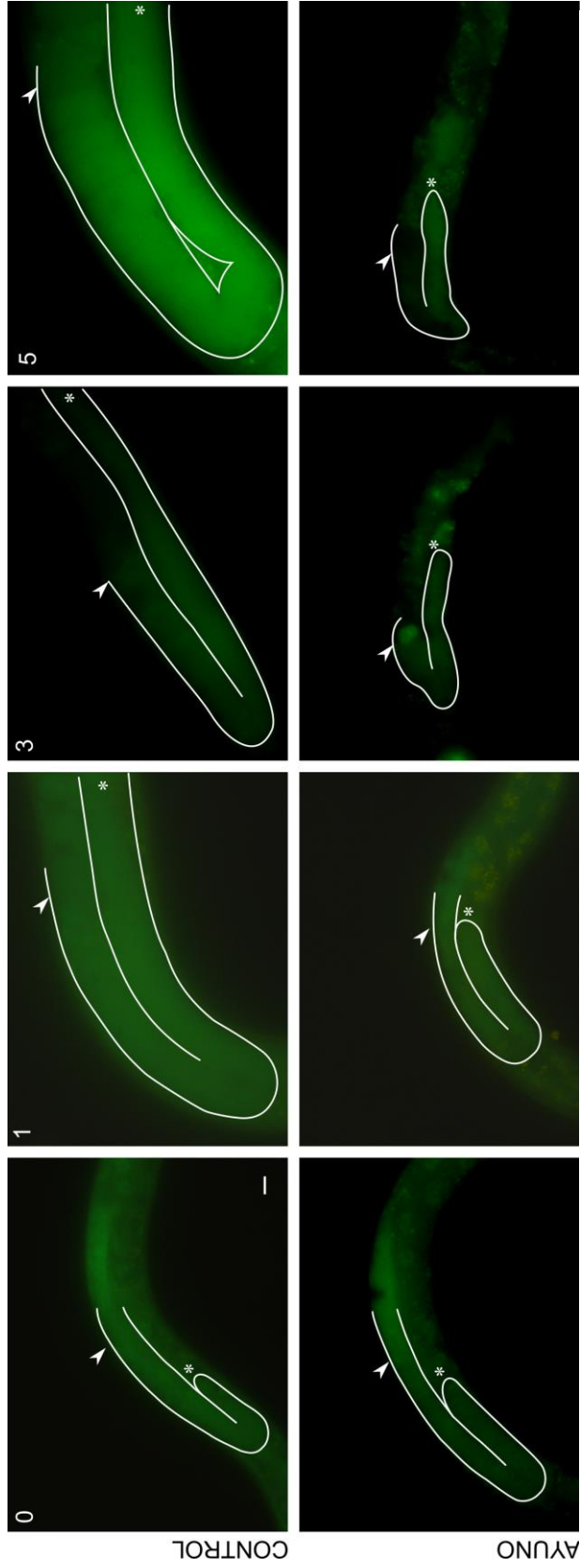
La proteína de unión a ARN, TIAR-1 es un marcador de gránulos de estrés, se sabe que 6 h de ayuno promueven la formación de gránulos ribonucleoproteicos en la gónada, estos gránulos confieren protección contra el choque de calor y el arresto prolongado en meiosis a las células germinales femeninas y la supervivencia de los embriones sometidos al choque de calor ([61] y Fig. 41).



**Figura 41. TIAR-1 se asocia en gránulos citoplasmáticos dentro de la gónada al someter a los animales a diferentes tipos de estrés.** Se muestra la localización sub-celular de TIAR-1 dentro de la gónada de adultos de 1 día en condiciones control, sin estrés; animales sometidos a 6 h de ayuno y hembras que exhiben ovocitos en arresto meiótico prolongado. Las imágenes fueron obtenidas por medio de microscopia confocal de epifluorescencia. Los recuadros punteados muestran regiones de interés dentro de la gónada. ds, gónada distal; oo, ovocitos. Las cabezas de flecha indican la formación de gránulos parecidos a gránulos P, las flechas completas indican gránulos del core y los

triángulos vacíos indican gránulos de los ovocitos. La escala indica 20  $\mu\text{m}$ . Imagen tomada y modificada de [61].

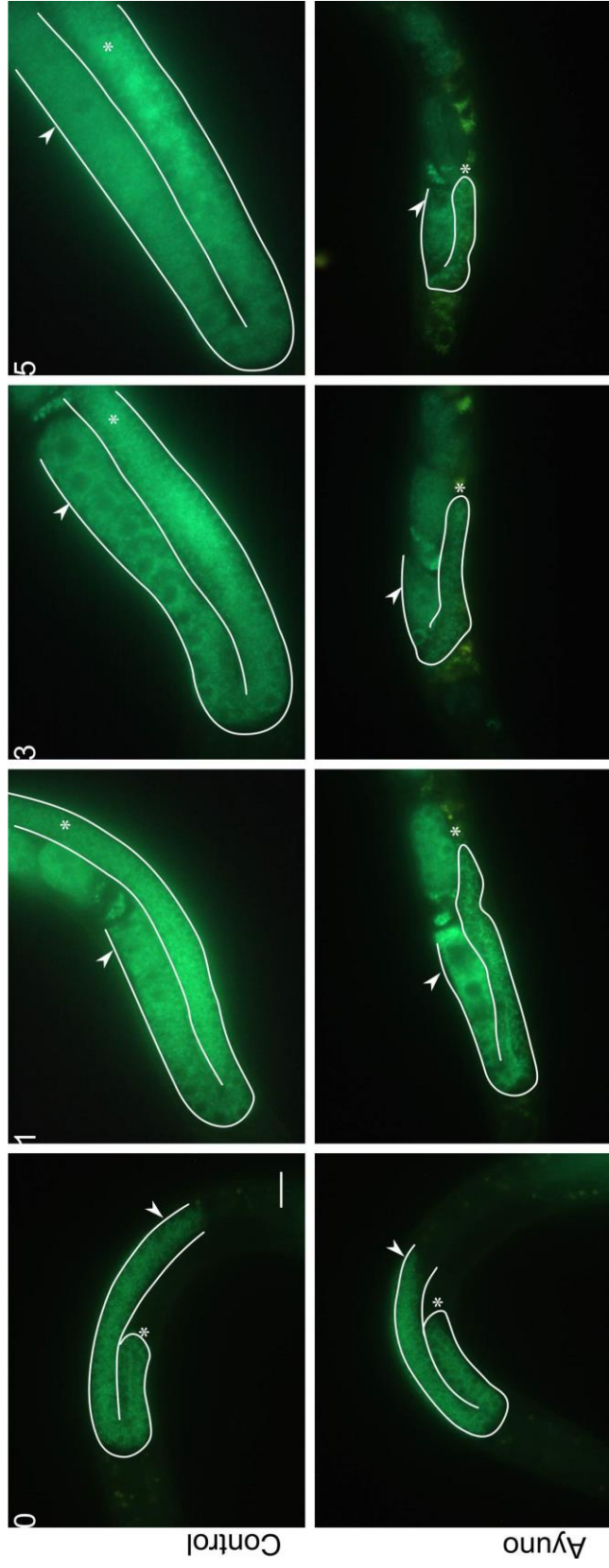
Nos propusimos estudiar si se promueve la formación de gránulos de estrés en la gónada durante la ARD. Para ello empleamos animales transgénicos *tiar-1::gfp* [61] en condiciones control con comida y sometidos a la ARD y que fueron visualizados bajo el microscopio de epifluorescencia diariamente por 5 días. Encontramos que en condiciones control, la proteína TIAR-1 se expresa de manera difusa en el citoplasma y núcleos de las células germinales, como se describió previamente por ([61] y Fig.42). Adicionalmente, fue posible observar la formación de gránulos en los ovocitos que permanecen en arresto meiótico prolongado en la gónada proximal de los animales adultos de 5 días, en los cuales se han agotado los espermatozoides y acumulan ovocitos sin fertilizar (Tiempo 5). En condiciones de ARD, la proteína TIAR-1 exhibe el mismo patrón difuso dentro de la gónada, sin embargo, hay un aumento de su expresión en las células del intestino pero no es posible observar la formación de gránulos dentro de la gónada (Fig. 42). Estos resultados indican que la ARD no promueve la formación de gránulos de estrés dentro de la gónada de los hermafroditas.



**Figura 42. Los gusanos en ARD no forman gránulos de estrés en la gónada.** Animales *tiar-1::gfp* fueron sometidos a la ARD o mantenidos en cajas con comida por 5 días. Se muestran imágenes representativas bajo el microscopio de epifluorescencia de animales transgénicos *tiar-1::gfp* en condiciones control con comida a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 5 días (Fila superior). Se muestran imágenes representativas de animales *tiar-1::gfp* durante la ARD, a partir del tiempo 0 y 5 días después (Fila inferior). En cada imagen se delinea en blanco un brazo de la gónada. La flecha indica la gónada proximal. El asterisco (\*) indica la gónada distal. La escala indica 20  $\mu\text{m}$ .

#### **9.7.4 La ARD causa alteraciones en las redes mitocondriales dentro de la gónada**

El ayuno altera significativamente la homeostasis celular, las redes mitocondriales sufren fragmentación dependiente de autofagia cuando se ayunan larvas L1 y entran al estado de arresto [33], adicionalmente, en nuestro laboratorio se ha descrito una alteración de las redes mitocondriales dentro de la gónada de animales adultos ayunados por 6 h (Campos-Martínez y Navarro, sin publicar). Decidimos investigar la morfología de las redes mitocondriales durante el ayuno prolongado. Para probarlo observamos diariamente y por 5 días a poblaciones de animales transgénicos *mai-2::gfp* [101] a partir de la etapa L4 intermedio en condiciones control con comida y ayuno. Encontramos que en condiciones control las redes mitocondriales aparecen bien estructuradas en el citoplasma dentro de la gónada de los hermafroditas, es posible observar agregados mitocondriales perinucleares que resultan más evidentes en los ovocitos próximos a celularizarse. Durante el ayuno prolongado observamos que las mitocondrias presentes en la gónada se posicionan alrededor de los núcleos de las células. El aspecto de las redes mitocondriales dentro de la gónada en el día 1 del ayuno prolongado asemeja al de los adultos sometidos a 6 h de ayuno, esto es, en forma de un agregado en el “core” de la gónada en el asa, adicionalmente las redes mitocondriales en la gónada distal con un aspecto irregular, exhibiendo mitocondrias individuales y aparentemente de menor tamaño (Fig. 43). Estos resultados sugieren que las redes mitocondriales dentro de la gónada se ven alteradas por la disponibilidad de alimento.

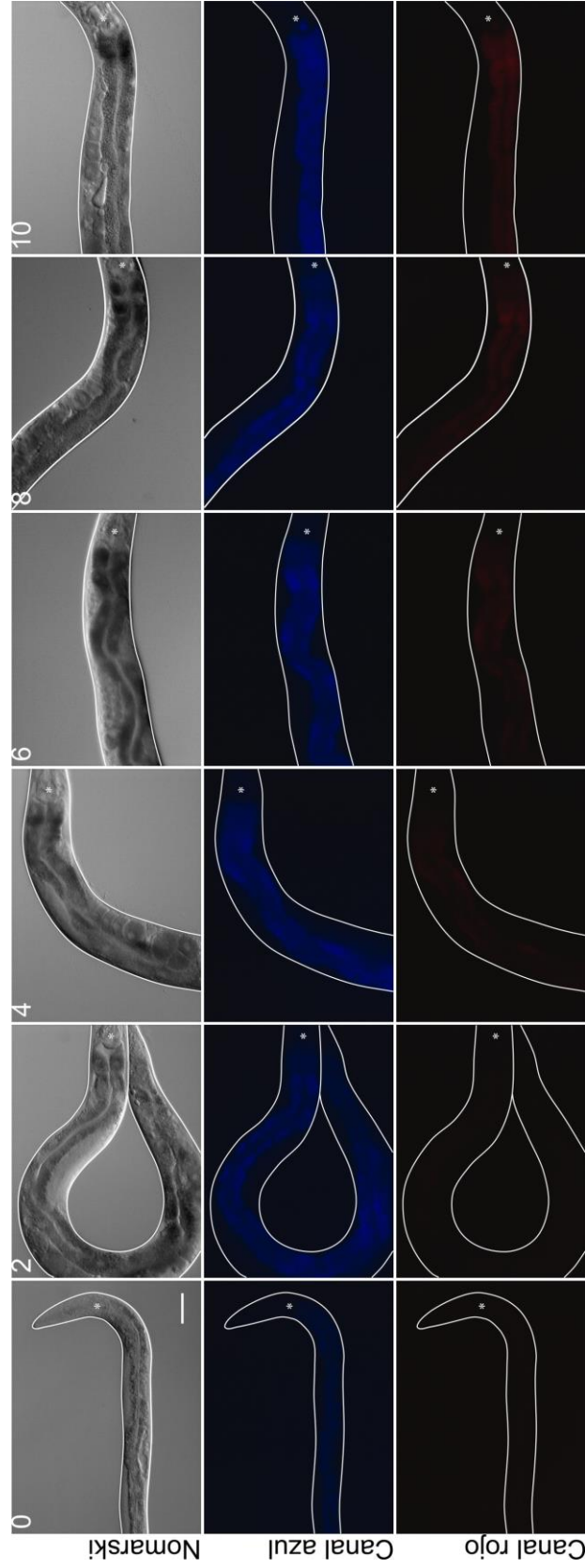


**Figura 43. Las redes mitocondriales de la gónada exhiben alteraciones durante la ARD.** En la fila superior se muestran imágenes representativas bajo el microscopio de epifluorescencia durante el desarrollo normal de un brazo de la gónada en condiciones control con comida a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 5 días de animales transgénicos *mai-2::gfp*. En la fila inferior se muestra el tamaño de la gónada en condiciones de ayuno a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 5 días. Fotografías Nomarski 40x, la escala indica 20  $\mu\text{m}$ . Se muestra delimitado el contorno de un brazo de la gónada. La cabeza de flecha indica la gónada proximal. El asterisco muestra la gónada distal.



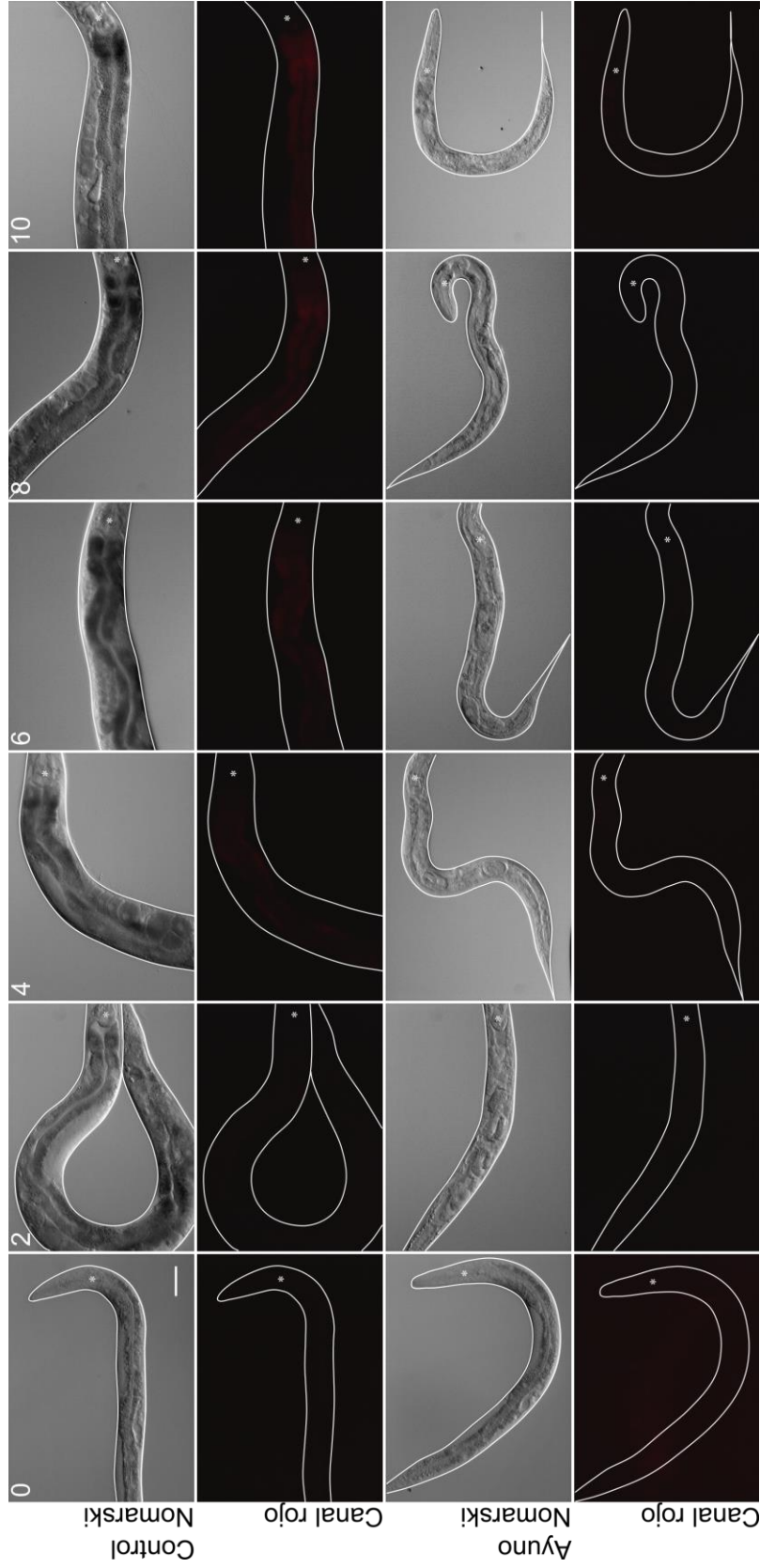
### **9.7.5 La ARD retrasa la aparición de signos relacionados con el envejecimiento**

Las células y los tejidos acumulan material autofluorescente a una tasa muy lenta conforme incrementa la edad de un organismo, estos materiales pueden ser un indicador del envejecimiento de un organismo completo [102]. En *C. elegans*, todos los tejidos somáticos son post-mitóticos y acumulan material autofluorescente dentro de gránulos de origen lisosomal generalmente localizados en el intestino. Recientemente se ha demostrado que es posible correlacionar la autofluorescencia observada en diferentes longitudes de onda con la esperanza de vida; la autofluorescencia azul se incrementa discretamente a lo largo de la vida de un organismo excepto por un aumento abrupto en el punto cercano a la muerte, la autofluorescencia roja aumenta de manera lineal a razón del tiempo y se correlaciona muy bien con la esperanza de vida restante ([102] y Fig. 44). Finalmente la autofluorescencia verde combina ambas características [102].



**Figura 44. La autofluorescencia roja correlaciona con la esperanza de vida en *C. elegans*.** En la fila superior se muestran imágenes representativas Nomarski 40x del desarrollo de los hermafroditas en condiciones control con comida a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 10 días. En la fila central se muestran imágenes representativas del mismo organismo empleando epifluorescencia y el canal azul (DAPI filterset): 350/50 nm (longitud de onda / ancho de banda) excitación 460/50 nm emisión. Fila inferior se muestran imágenes representativas del mismo organismo empleando epifluorescencia y el canal rojo (TRITC filterset): 545/30 nm excitación 610/70 nm emisión. La escala indica 50  $\mu$ m. Se muestra delineado el contorno del intestino. El asterisco indica la posición de la faringe.

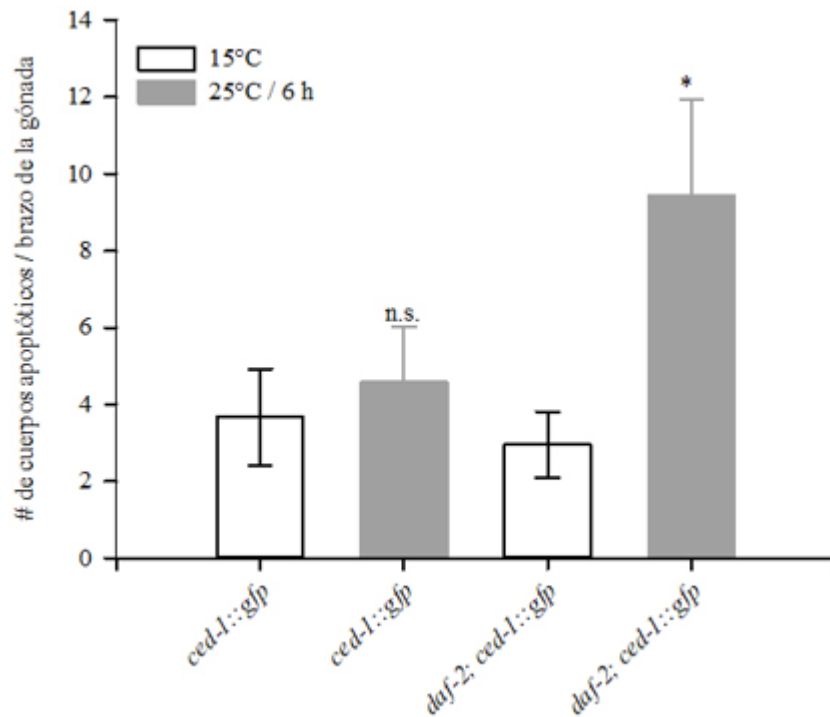
La entrada a la diapausa reproductiva del adulto parece ser un mecanismo anti-envejecimiento mediante el cual los animales ayunados por 30 días cumplen su esperanza de vida normal cuando son re-alimentados [42]. Nos preguntamos si durante el ayuno prolongado los animales acumulan material autofluorescente en su intestino, como una medida de envejecimiento. Para ello, visualizamos diariamente a partir de la etapa L4 intermedio y durante 10 días la autofluorescencia roja del intestino de animales con comida como control y ayunados. Encontramos que los animales control exhiben un aumento progresivo de la autofluorescencia proporcional al incremento su edad. En cambio, los animales ayunados no exhiben dicho aumento (Fig. 45). Estos resultados sugieren que el ayuno prolongado evita la aparición de signos de envejecimiento.



**Figura 45. La autofluorescencia roja no aumenta en los animales mientras se encuentran en ARD.** En la fila superior se muestran imágenes representativas Nomarski 40x del desarrollo de los hermafroditas en condiciones control con comida y durante el ayuno prolongado a partir de la etapa L4 intermedio (0) y por los siguientes 10 días. Se muestran imágenes representativas del mismo organismo empleando epifluorescencia y el canal rojo (TRITC filterset): 545/30 nm excitación 610/70 nm emisión. La escala indica 50  $\mu\text{m}$ . Se muestra delineado el contorno del intestino. El asterisco indica la posición de la faringe.

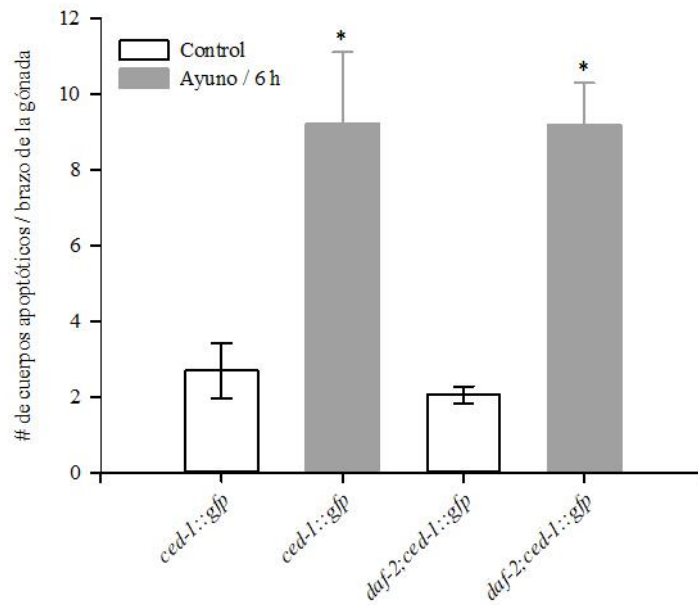
### **9.7.6 La inactivación de la vía de la insulina regula la apoptosis de las células germinales en animales adultos en presencia de alimento**

Además de incrementar la esperanza de vida y retrasar la senescencia reproductiva en *C. elegans*, la inactivación de la vía de la insulina reduce los efectos detrimentales del envejecimiento en la gónada de manera independiente a la apoptosis de las células germinales. Algunos autores han reportado que la inactivación la vía de la insulina altera los niveles de apoptosis en las células germinales, sin embargo los resultados son opuestos [103-105]. Anteriormente demostramos que la inactivación prolongada de la vía de la insulina a partir de la etapa L4 intermedia aumenta la apoptosis de las células germinales en presencia de alimento. Decidimos investigar el efecto de la inactivación de la vía de la insulina en la apoptosis de las células germinales en adultos de un día en presencia de alimento. Para ello crecimos una población sincronizada de animales *ced-1::gfp* y *daf-2;ced-1::gfp* con comida incubados a la temperatura permisiva (°15) hasta adultos de 1 día, entonces se transfirieron a la temperatura restrictiva (25°C) por 6 h en presencia de alimento. Al realizar observaciones bajo el microscopio de epifluorescencia encontramos que el número de cuerpos apoptóticos no cambia al transferir a los animales *ced-1::gfp* de 15°C a 25°C por 6 h en presencia de alimento. En cambio, los niveles de apoptosis de las células germinales de los animales *daf-2;ced-1::gfp* se ven alterados, aumentando en ~3-veces los niveles de inducción (Fig. 46).



**Figura 46. La inactivación de la vía de la insulina por 6 h induce la apoptosis de las células germinales en presencia de alimento.** Cuantificación de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada de animales *ced-1::gfp* y *daf-2;ced-1::gfp*. Una población de animales de cada fondo genético fue incubada a 15°C hasta adultos de 1 día. Los animales fueron transferidos a la temperatura restrictiva (25°C) o mantenidos a la temperatura permisiva (15°C) en presencia de alimento por 6 h, se seleccionaron y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Las barras blancas indican los cuerpos apoptóticos de los animales *ced-1::gfp* (N= 40) y *daf-2;ced-1::gfp* (N=44) en la temperatura permisiva. Las barras grises indican los cuerpos apoptóticos de los animales *ced-1::gfp* (N= 47) y *daf-2;ced-1::gfp* (N= 55) en la temperatura restrictiva. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba ANOVA (\* P<0.05).

Este incremento en los niveles de apoptosis podría deberse a alteraciones en la respuesta de los animales al estrés. Para probar que los animales responden al ayuno, específicamente, decidimos someter a los animales *daf-2;ced-1::gfp* adultos de 1 día a 6 h de ayuno en la temperatura permisiva (15°C). Encontramos que estos animales responden al ayuno aumentando ~4.5 veces los niveles de apoptosis como el control ~3.6 veces (Fig. 47). Estos resultados sugieren que los animales *daf-2;ced-1::gfp* se comportan como animales silvestres al ser incubados en la temperatura permisiva y son capaces de responder al ayuno como los animales control.



**Figura 47. Los animales *daf-2* responden al ayuno aumentando la apoptosis de las células germinales.** Cuantificación de cuerpos apoptóticos por brazo de la gónada de animales *ced-1::gfp* y *daf-2;ced-1::gfp*. Una población de animales de cada fondo genético fue incubada a 15°C hasta adultos de 1 día. Los animales fueron ayunados por 6 h en la temperatura permisiva (15°C), se seleccionaron y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Las barras blancas indican los cuerpos apoptóticos de los animales *ced-1::gfp* (N= 40) y *daf-2;ced-1::gfp* (N=50) en condiciones control con comida. Las barras grises indican los cuerpos apoptóticos de los animales *ced-1::gfp* (N= 38) y *daf-2;ced-1::gfp* (N= 48) en condiciones de ayuno por 6 h. Las barras de error muestran el error estándar de la media (SEM). Se comparó la diferencia entre ambas medias empleando la prueba ANOVA (\* P<0.05).



## 10 DISCUSIÓN

Angelo y van Gilst (2009) reportaron por primera vez un nuevo tipo de diapausa reproductiva mientras estudiaban la reproducción del *C. elegans* bajo condiciones de restricción de comida. Describieron que los animales sujetos a una privación completa de alimento a partir de la etapa L4 intermedia retrasaban su ciclo reproductivo y eran capaces de vivir hasta 30 días sin comida. Además, cuando las condiciones se reestablecían volvían a retomar su ciclo reproductivo y completaban de manera normal el resto de su ciclo de vida. Durante la ARD, la gónada experimenta una reducción progresiva del número de células que la conforman y el volumen total de la gónada, los cuales son reversibles cuando los animales son realimentados [42].

Posteriormente, Seidel y Kimble (2011) realizaron otro estudio más detallado de la ARD. Demostraron que la reducción de la gónada ocurre en las gónadas que presentan ovogénesis activa, cuando los animales se ayunan desde L4 intermedio o la etapa adulta y prácticamente todas las gónadas reducidas son capaces de regenerarse al re-alimentar a los animales si se evita el fenómeno de “bagging” [43]. Durante el ayuno prolongado continúa la producción de embriones y es posible observar uno o dos embriones aparentemente viables dentro del útero, que son el resultado de fertilizaciones recientes, indicando que la producción de ovocitos y su fertilización se ve enormemente retrasada, además, la viabilidad de los embriones producidos en esta condición es muy limitada. También demostraron que la densidad poblacional no es un requisito para entrar o mantener este estado de letargo y sugirieron que este fenómeno no es una diapausa [43].

A pesar de no respaldar la existencia de la diapausa reproductiva del adulto, propuesta por Angelo y van Gilst (2009), Seidel y Kimble (2011) acuñaron el término “respuesta ovogénica de la gónada al ayuno” para referirse a la reducción/regeneración de la gónada controlada por la disponibilidad de alimento [43]. También reportaron que el ayuno causa un estado de quiescencia reversible en el ciclo celular de las células madre progenitoras de la línea germinal, dando como resultado la disminución del número de

células en fase M en tan solo 30 minutos de ayuno y que puede ser reestablecido de manera rápida cuando los animales se realimentan [44].

### **10.1 La ARD compromete la fertilidad afectando a las células que dan lugar a los ovocitos**

En el presente estudio demostramos que la fertilidad se afecta después de la ARD. Aunque los animales recuperados reestablecen su fertilidad, ninguno de los fondos genéticos probados (N2, *fog-1*, *fog-2* y *ced-3*) producen progenies del mismo tamaño que sus controles, ya sea al autofertilizarse o cruzarse. Angelo y van Gilst (2009) propusieron que la fecundidad de los animales que se autofertilizan dependía de la supervivencia de los espermatozoides funcionales durante el ayuno [42]. Es de llamar la atención que durante nuestras condiciones de ARD el número de espermatozoides permanece constante, indicando que la capacidad reproductiva de estas células podría verse afectada por el ayuno. Este hallazgo nos permite profundizar en el estudio de las condiciones necesarias para preservar la fertilidad y la homeostasis de las células reproductivas en los machos. Además, la capacidad reproductiva de los hermafroditas no se compromete solamente por el número de espermatozoides, sino también por un agotamiento en la producción de ovocitos después de la ARD.

Algunos autores han empleado a la letalidad embrionaria como el reflejo de la calidad de los ovocitos [26, 68]. Nuestros resultados demuestran que los animales producen más embriones muertos que sus respectivos controles cuando usan su propio espermatozoides para autofertilizar los ovocitos después la ARD. Observamos que los hermafroditas recuperados producen embriones muertos durante todo su periodo reproductivo cuando se autofertilizan. Sin embargo, los animales mutantes *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* producían la mayoría de los embriones muertos durante los primeros dos días después de haber sido cruzados, lo que sugiere que el espermatozoides de los hermafroditas que fueron sometidos a la ARD resulta afectado por el ayuno. Además, cuando se provee espermatozoides de machos que nunca fueron ayunados a los animales recuperados de la ARD; los ovocitos expuestos al ayuno tienden a

producir embriones muertos cuando son fertilizadas. Estos resultados indican que el ayuno tiene efectos diferenciales en las células germinales femeninas, donde las células más próximas a fertilizarse se ven más afectadas que las células germinales en mitosis o las primeras etapas de la meiosis.

### **10.1.1 La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno evita el arresto de la ovogénesis**

En la línea germinal del *C. elegans*, la presencia de alimento y el esperma promueven la progresión de la meiosis y la ovogénesis, cuando el esperma se acaba los ovocitos se apilan en la gónada proximal y permanecen arrestados en diacinesis, además el ayuno causa la detención de la progresión de la meiosis en la región de paquíteno [25]. En condiciones control con comida y presencia de esperma, los hermafroditas ovulan cada ~20 min por brazo de la gónada mientras que durante la ARD los hermafroditas ralentizan la ovogénesis y producen cada ~8 h un ovocito por cada brazo de la gónada y una vez que éste es ovulado comienza la producción del siguiente ovocito [43]. Los ovocitos que experimentan un arresto prolongado en diacinesis son tienden a producir embriones muertos [26]. Nosotros observamos que en condiciones control los animales *fog-1(q253)* y *fog-2(q71)* producían más ovocitos que se apilaban en la gónada proximal que sus contrapartes en condiciones de ayuno, sugiriendo que la disminución en la velocidad de la ovogénesis durante el ayuno es un mecanismo benéfico para preservar la capacidad reproductiva de los animales y la calidad de sus ovocitos.

### **10.2 La apoptosis de las células germinales permanece elevada durante la ARD**

Nuestro trabajo demuestra que la apoptosis de las células germinales aumenta durante el ayuno prolongado y permanece elevada durante la ARD. La apoptosis de las células germinales es importante para distribuir de manera efectiva los recursos dentro de la gónada mientras se producen ovocitos y asegurar su calidad [26, 28]. La apoptosis de las células germinales incrementa con la edad de los animales en condiciones control y

contribuye a la degeneración de la gónada [28, 103]. Nosotros encontramos que el aumento de la apoptosis de las células germinales durante la ARD no es causada por *cep-1/p53*, sugiriendo que existe una regulación distinta a la de reparación de daños al ADN o defectos durante la meiosis.

Adicionalmente, la apoptosis de las células germinales puede ser inducida si los animales son sometidos a diferentes tipos de estrés [46]. Previamente se reportó en el laboratorio que los animales adultos de un día sometidos a 6 h de ayuno presentan 2-veces el número de cuerpos apoptóticos en la gónada, y el ortólogo de Retinoblastoma en *C. elegans* *lin-35* es responsable de este aumento [50]. En este trabajo, encontramos que la apoptosis inducida durante la ARD depende parcialmente de *lin-35/Rb* y la vía de la insulina *daf-2/daf-16*. Estos resultados contribuyen a diseccionar las vías de regulación transcripcional inducida por el ayuno y sus efectos en la apoptosis y la proliferación celular. Además, plantean nuevos panoramas que nos permitirían entender el origen de problemas relacionados con el cáncer, la infertilidad, regeneración tisular, entre otros y desarrollar intervenciones genéticas y farmacológicas con fines terapéuticos.

Sin embargo, otro cuestionamiento que surge en el presente trabajo y es de vital relevancia en relación a la apoptosis inducida por ayuno: ¿Por qué se eleva la apoptosis de las células germinales durante la ARD? Nuestros resultados apoyan la idea propuesta por Andux y Ellis (2008) que indica que la muerte de las células germinales sirve como un mecanismo para distribuir los recursos en la gónada [26]. La relevancia biológica de este mecanismo podría ser que asegura la producción de ovocitos únicamente en condiciones favorables. En la etapa L4 intermedio cuando se inicia la ARD, algunas células germinales ya están comprometidas a continuar con la meiosis, lo cual es irreversible, sin embargo, completar la meiosis y dar lugar a un ovocito maduro implica algunas horas. Por lo tanto, creemos que la muerte celular que observamos durante la ARD se origina en aquellas células que escaparon la mitosis, pero debido a la falta de recursos no tendrían éxito como ovocitos y por lo tanto se eliminan por apoptosis.

### **10.3 La apoptosis es importante para preservar la calidad de los ovocitos durante la ARD; sin embargo, no es esencial para recuperar la fertilidad y reducir la gónada**

En el presente trabajo demostramos que los animales mutantes para la única caspasa efector en *C. elegans*, *ced-3* responden al ayuno reduciendo el tamaño de su gónada y recuperan su fertilidad al ser realimentados. En contraste con Angelo y van Gilst (2009), quienes reportaron que los animales mutantes *ced-3(n1286)* entraban en la ARD cuando se sometían a 15 días de ayuno, sin embargo, esos animales no reducían el tamaño de su gónada ni disminuían el número de las células que la conformaban y tampoco producían progenie después de la ARD [42]. De hecho, nuestros resultados indican que los animales silvestres y los mutantes de la caspasa no producían progenie después de haber sido sometidos a 15 días de ayuno, ya sea por autofertilización o cruza con machos silvestres que nunca fueron ayunados. Nuestros resultados indican que el ayuno tiene efectos irreversibles en la fertilidad que no habían sido debidamente documentados y abren nuevos paradigmas con respecto a la preservación de la fertilidad.

Como se reportó anteriormente [26], observamos que los animales mutantes de la caspasa producían menos progenie y mayor letalidad embrionaria que los animales silvestres en condiciones control. En el presente trabajo, demostramos que los animales mutantes de la caspasa recuperados de un ayuno de 5 días producen aún menos progenie y mayor letalidad embrionaria que los animales silvestres. Estos resultados sugieren que la apoptosis es importante para preservar la calidad de los ovocitos en condiciones control y durante el ayuno prolongado. Este mecanismo podría contribuir al mantenimiento de la calidad de los ovocitos durante el ayuno prolongado, eliminando las células germinales que permanecen arrestadas en diacinesis por periodos prolongados, o que ante la ausencia de nutrientes hagan falta los componentes citoplasmáticos (como ARNm, ARNm<sub>i</sub>, gránulos P, organelos, entre otros) necesarios para el completar el desarrollo embrionario.

#### **10.4 La ARD causa un aumento en la incidencia de machos dentro de la progenie**

Al estudiar la calidad de los ovocitos después de la ARD observamos la aparición de machos dentro de la progenie producida por autofertilización en los animales recuperados de la ARD. La incidencia de machos puede emplearse como un reflejo de la fidelidad en la segregación de los cromosomas sexuales [91]. Nuestros resultados sugieren que al exponer a los animales a la ARD causa un incremento en el número machos dentro de la progenie, sin embargo, este fenotipo se recupera al cruzar a los animales recuperados de la ARD con machos *tra-2*. La incidencia de machos dentro de la progenie facilita el entrecruzamiento y podría ser benéfico para introducir mayor variación genética entre los individuos, y como consecuencia, la producción de nuevos organismos con menos mutaciones deletéreas que sus progenitores y apoyan la hipótesis que propone algunos tipos de estrés (por ej., la infección por patógenos, el ayuno, entre otros) puede facilitar la adaptación de los animales por medio de la reproducción sexual, dando como resultado mayor variabilidad genética, que asegurará una mayor resistencia a las condiciones cambiantes [106-108].

#### **10.5 La inactivación de DAF-2 podría inducir la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno**

Proponemos que la vía de la insulina podría mimetizar la entrada en la ARD en condiciones control con comida ya que estos animales asemejan algunas de las características de la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno, los animales mutantes *daf-2* disminuyen su tasa de ovulación mientras reducen el tamaño de su gónada, sugiriendo que, sin embargo, las gónadas reducidas de los animales *daf-2* no forman un solo ovocito a la vez, como los animales en ARD, y *daf-2* no se requiere para reducir el tamaño de la gónada durante la ARD. Nuestros resultados también demuestran que no todas las mutaciones en el receptor de insulina afectan a la homeostasis de la gónada y contribuye a un mejor entendimiento del mecanismo molecular que regula la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno. Estos resultados apoyan la idea acerca de una regulación fina a nivel de receptor y

ligando en la vía de la insulina, ocasionando; efectos pleiotrópicos al mutar el receptor de insulina, y las diversas funciones que exhiben las más de 40 moléculas relacionadas a la insulina. Aunque nuestros resultados proveen nuevas evidencias en relación a la regulación de la respuesta ovogénica de la gónada al ayuno, se requiere mayor investigación para entender completamente el mecanismo que controla la reproducción en condiciones de ayuno.

### **10.6 Los animales en ARD no son más resistentes a otros tipos de estrés**

Encontramos que el ayuno causa una disminución en la resistencia al estrés. La inactivación de la vía de la insulina durante la etapa adulta y la pérdida de las células germinales en los hermafroditas causan resistencia al estrés y extensión en la esperanza de vida [95, 109]. Además, la calidad de los ovocitos y la resistencia al estrés se modifican con la edad [110, 111], lo cual nos llevó a plantear una hipótesis, los animales en ARD pierden las células germinales y extienden su esperanza de vida, por lo tanto estos animales modificarán su resistencia al estrés, sin embargo, observamos una disminución de la resistencia a otro tipo de estrés, i.e. choque de calor, indicando dos posibilidades; primero, los animales que se encuentran en ayuno prolongado pierden la capacidad para contender al choque de calor. Segundo, la resistencia al estrés depende de señales provenientes del alimento. Por otra parte, observamos que durante el ayuno prolongado los animales no exhiben los cambios morfológicos característicos de la larva dauer que los vuelve más resistentes al estrés. Estos resultados contribuyen discretamente al entendimiento de la resistencia al estrés y la regulación de la longevidad, sin embargo, se requiere de más experimentación para caracterizar la respuesta a otros tipos de estrés bajo estas condiciones.

Finalmente, observamos que el ayuno prolongado causa una detención del ciclo de vida de los animales y éste no se altera cuando las condiciones se re-establecen, apoyando previas observaciones en las que la esperanza de vida restante de los animales ayunados no depende del tiempo que permanecen en ayuno [42] y se demuestra que la respuesta al ayuno sirve a los animales como un estado de dormancia al terno al ciclo reproductivo que

les permite contender con el estrés y reproducirse únicamente bajo condiciones favorables. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que periodos más prolongados de ayuno alteren negativamente la esperanza de vida restante de los animales que experimentaron la ARD.



## 11 CONCLUSIONES

El presente trabajo sustenta las siguientes conclusiones:

- Someter a los animales a un ayuno prolongado afecta considerablemente la capacidad reproductiva de los animales.
- La respuesta ovogénica de la gónada al ayuno previene que las células germinales que dan lugar a los ovocitos se arresten por un periodo prolongado en diacinesis mediante la ralentización de la ovogénesis.
- La apoptosis de las células germinales se incrementa durante la ARD y continúa elevada durante el ayuno prolongado.
- La apoptosis de las células germinales no es la causa de la reducción de la gónada durante la ARD, sino la ovulación que continúa durante la ARD. La apoptosis no es esencial para la recuperación de la fertilidad después de la ARD. En su lugar, proponemos que una vez que la proliferación de las células germinales se detiene, la ovulación contribuye a que la gónada vacíe su contenido y reduzca su tamaño.
- La apoptosis de las células germinales que ocurre durante la ARD no es inducida por daño al ADN o errores durante la meiosis, es parcialmente regulada por *lin-35/Rb* y por la vía de la insulina *daf-2/daf-16*.
- La inactivación de la vía de señalización de la insulina en presencia de alimento causa una serie de efectos que asemejan la respuesta de la gónada al ayuno; tales como, la reducción del tamaño de la gónada, el aumento en la apoptosis y la disminución de la tasa de ovulación, sin embargo, no se producen todos los cambios presentes en la respuesta de la gónada al ayuno.
- Describimos la respuesta a diferentes tipos de estrés durante la ARD y encontramos que la respuesta al estrés durante la ARD es diferente a la diapausa Dauer.

## 12 PERSPECTIVAS

Aunque este estudio provee de nuevas evidencias acerca de la relación que existe entre el estatus nutricional, la fertilidad y la resistencia al estrés, surgen nuevas preguntas dentro de la línea de investigación. Primero, podrían medirse otros parámetros que impactan la fertilidad y fecundidad de los animales que fueron expuestos al ayuno prolongado, por ejemplo; el tamaño de los ovocitos, la cantidad y calidad de los ARNm y mitocondrias que son introducidos en el citoplasma de los ovocitos, respectivamente, entre otros.

En este trabajo nos propusimos estudiar la calidad de los ovocitos después de que los animales redujeran el tamaño de su gónada y posteriormente fueron realimentados, lo cual en nuestros experimentos ocurre en el día 5, sin embargo podría determinarse el efecto de un ayuno con otra duración y establecer el periodo máximo permisible para mantener la fertilidad de los animales y la calidad de sus ovocitos. En el presente trabajo no determinamos los efectos del ayuno prolongado en la progenie, sin embargo, nos parece interesante el estudio de los efectos transgeneracionales y los cambios epigenéticos que pudieran estar relacionados. Si bien nuestro trabajo provee evidencia en relación a la biología reproductiva y el envejecimiento podría extenderse el estudio de la fertilidad y la calidad de los ovocitos empleando mutantes que exhiben alteraciones en la esperanza de vida y determinar las necesidades fisiológicas para mantener la fertilidad y la calidad de los ovocitos, además de probar intervenciones genéticas, farmacológicas y/o nutricionales que ayuden a preservar y/o prolongar el periodo reproductivo de los animales y la calidad de sus ovocitos.

Para elucidar el mecanismo molecular que regula la ARD es necesario llevar a cabo estudios de genética reversa, realizando mutagénesis al azar y buscar los fenotipos que reviertan los siguientes aspectos:

- 1) La supervivencia de los animales durante el ayuno prolongado.

- 2) La reducción/regeneración de la gónada durante la ARD,
- 3) El aumento en la apoptosis de las células germinales. Entre otros aspectos.

Para entender la contribución de la vía de la insulina a la homeostasis de la gónada sería necesario generar mutaciones dirigida por medio de CRISPR/Cas9 en cada uno de los dominios catalíticos del receptor de insulina para estudiar la transducción de las señales involucradas con la proliferación de las células germinales y definir los tejidos donde se modulan los cambios transcripcionales para ejecutar los cambios en el ciclo reproductivo o de ARD.

Estudiar detalladamente los aspectos que caracterizan una diapausa, es decir, todos los cambios morfológicos y fisiológicos del ciclo de vida y reproductivo de los animales sometidos al ayuno prolongado. Definir un perfil transcripcional y agrupar los genes que participan en la respuesta al ayuno a nivel global, diseccionar los mecanismos de supervivencia que caracterizan a la ARD y compararlo con la diapausa dauer y el arresto L1.

## 13 REFERENCIAS

1. Nigon, V.M. and M.A. Felix, *History of research on C. elegans and other free-living nematodes as model organisms*. WormBook, 2017: p. 1-84.
2. Dougherty, E.C. and H.G. Calhoun, *Possible significance of free-living nematodes in genetic research*. Nature, 1948. **161**(4079): p. 29.
3. Brenner, S., *In the beginning was the worm*. Genetics, 2009. **182**(2): p. 413-5.
4. Sulston, J.E. and S. Brenner, *The DNA of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 95-104.
5. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
6. Ankeny, R.A., *The natural history of Caenorhabditis elegans research*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(6): p. 474-9.
7. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
8. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
9. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
10. Montgomery, M.K., S. Xu, and A. Fire, *RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15502-7.
11. Tabara, H., et al., *The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans*. Cell, 1999. **99**(2): p. 123-32.
12. Timmons, L., et al., *Inducible systemic RNA silencing in Caenorhabditis elegans*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(7): p. 2972-83.
13. Leung, M.C., et al., *Caenorhabditis elegans: an emerging model in biomedical and environmental toxicology*. Toxicol Sci, 2008. **106**(1): p. 5-28.
14. Mellies, J.L. and E.R. Lawrence-Pine, *Interkingdom signaling between pathogenic bacteria and Caenorhabditis elegans*. Trends Microbiol, 2010. **18**(10): p. 448-54.
15. Felix, M.A. and C. Braendle, *The natural history of Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2010. **20**(22): p. R965-9.
16. Altun, Z.F., et al., *High resolution map of Caenorhabditis elegans gap junction proteins*. Dev Dyn, 2009. **238**(8): p. 1936-50.
17. Hope, I.A., *C. elegans : a practical approach*. 1999, Oxford: Oxford University Press. xv, 281 p.
18. Pazdernik, N. and T. Schedl, *Introduction to germ cell development in Caenorhabditis elegans*. Adv Exp Med Biol, 2013. **757**: p. 1-16.
19. Lettre, G. and M.O. Hengartner, *Developmental apoptosis in C. elegans: a complex CEDnario*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 97-108.
20. Kuwabara, P.E. and M.D. Perry, *It ain't over till it's ova: germline sex determination in C. elegans*. Bioessays, 2001. **23**(7): p. 596-604.
21. Lee, M.H., et al., *Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated kinase signaling in Caenorhabditis elegans germline development*. Genetics, 2007. **177**(4): p. 2039-62.
22. Schisa, J.A., J.N. Pitt, and J.R. Priess, *Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of C. elegans adults*. Development, 2001. **128**(8): p. 1287-98.
23. McCarter, J., et al., *On the control of oocyte meiotic maturation and ovulation in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1999. **205**(1): p. 111-28.
24. Wolke, U., E.A. Jezuit, and J.R. Priess, *Actin-dependent cytoplasmic streaming in C. elegans oogenesis*. Development, 2007. **134**(12): p. 2227-36.
25. Lopez, A.L., 3rd, et al., *DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during Caenorhabditis elegans oogenesis*. Dev Cell, 2013. **27**(2): p. 227-240.
26. Andux, S. and R.E. Ellis, *Apoptosis maintains oocyte quality in aging Caenorhabditis elegans females*. PLoS Genet, 2008. **4**(12): p. e1000295.
27. Marcello, M.R., G. Singaravelu, and A. Singson, *Fertilization*. Adv Exp Med Biol, 2013. **757**: p. 321-50.

28. Gumienny, T.L., et al., *Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline*. Development, 1999. **126**(5): p. 1011-22.
29. Baugh, L.R., *To grow or not to grow: nutritional control of development during Caenorhabditis elegans L1 arrest*. Genetics, 2013. **194**(3): p. 539-55.
30. Fielenbach, N. and A. Antebi, *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
31. Kostal, V., *Eco-physiological phases of insect diapause*. J Insect Physiol, 2006. **52**(2): p. 113-27.
32. Lewis, J.A. and J.T. Fleming, *Basic culture methods*. Methods Cell Biol, 1995. **48**: p. 3-29.
33. Hibshman, J.D., et al., *Nonselective autophagy reduces mitochondrial content during starvation in Caenorhabditis elegans*. Am J Physiol Cell Physiol, 2018. **315**(6): p. C781-C792.
34. Cui, M., et al., *The tumor suppressor Rb critically regulates starvation-induced stress response in C. elegans*. Curr Biol, 2013. **23**(11): p. 975-80.
35. Baugh, L.R. and P.W. Sternberg, *DAF-16/FOXO regulates transcription of cki-1/Cip/Kip and repression of lin-4 during C. elegans L1 arrest*. Curr Biol, 2006. **16**(8): p. 780-5.
36. Lee, B.H. and K. Ashrafi, *A TRPV channel modulates C. elegans neurosecretion, larval starvation survival, and adult lifespan*. PLoS Genet, 2008. **4**(10): p. e1000213.
37. Derry, W.B., A.P. Putzke, and J.H. Rothman, *Caenorhabditis elegans p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance*. Science, 2001. **294**(5542): p. 591-5.
38. Gomez, T.A., et al., *The L-isoaspartyl-O-methyltransferase in Caenorhabditis elegans larval longevity and autophagy*. Dev Biol, 2007. **303**(2): p. 493-500.
39. Cassada, R.C. and R.L. Russell, *The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1975. **46**(2): p. 326-42.
40. Hu, P.J., *Dauer*. WormBook, 2007: p. 1-19.
41. Holt, S.J. and D.L. Riddle, *SAGE surveys C. elegans carbohydrate metabolism: evidence for an anaerobic shift in the long-lived dauer larva*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(7): p. 779-800.
42. Angelo, G. and M.R. Van Gilst, *Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in C. elegans*. Science, 2009. **326**(5955): p. 954-8.
43. Seidel, H.S. and J. Kimble, *The oogenic germline starvation response in C. elegans*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28074.
44. Seidel, H.S. and J. Kimble, *Cell-cycle quiescence maintains Caenorhabditis elegans germline stem cells independent of GLP-1/Notch*. Elife, 2015. **4**.
45. Gerhold, A.R., et al., *Investigating the regulation of stem and progenitor cell mitotic progression by in situ imaging*. Curr Biol, 2015. **25**(9): p. 1123-34.
46. Salinas, L.S., E. Maldonado, and R.E. Navarro, *Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in Caenorhabditis elegans*. Cell Death Differ, 2006. **13**(12): p. 2129-39.
47. Burnaevskiy, N., et al., *Reactivation of RNA metabolism underlies somatic restoration after adult reproductive diapause in C. elegans*. Elife, 2018. **7**.
48. Van Gilst, M.R., H. Hadjivassiliou, and K.R. Yamamoto, *A Caenorhabditis elegans nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(38): p. 13496-501.
49. Bailly, A. and A. Gartner, *Germ cell apoptosis and DNA damage responses*. Adv Exp Med Biol, 2013. **757**: p. 249-76.
50. Lascarez-Lagunas, L.I., et al., *LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via CED-9/Bcl2 downregulation in Caenorhabditis elegans*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(13): p. 2499-516.
51. te Velde, E.R. and P.L. Pearson, *The variability of female reproductive ageing*. Hum Reprod Update, 2002. **8**(2): p. 141-54.
52. Luo, S., et al., *TGF-beta and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance*. Cell, 2010. **143**(2): p. 299-312.
53. Templeman, N.M. and C.T. Murphy, *Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways*. J Cell Biol, 2018. **217**(1): p. 93-106.
54. Wolff, S., et al., *SMK-1, an essential regulator of DAF-16-mediated longevity*. Cell, 2006. **124**(5): p. 1039-53.

55. Huang, C., C. Xiong, and K. Kornfeld, *Measurements of age-related changes of physiological processes that predict lifespan of Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8084-9.
56. Hughes, S.E., et al., *Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes*. PLoS Genet, 2007. **3**(2): p. e25.
57. Stiernagle, T., *Maintenance of C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-11.
58. Schumacher, B., et al., *The C. elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis*. Curr Biol, 2001. **11**(21): p. 1722-7.
59. Kim, E., et al., *Long-term imaging of Caenorhabditis elegans using nanoparticle-mediated immobilization*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53419.
60. Bukhari, S.I., et al., *The microRNA pathway controls germ cell proliferation and differentiation in C. elegans*. Cell Res, 2012. **22**(6): p. 1034-45.
61. Huelgas-Morales, G., et al., *The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in Caenorhabditis elegans*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(4): p. 1031-47.
62. Huang, J., et al., *Residual body removal during spermatogenesis in C. elegans requires genes that mediate cell corpse clearance*. Development, 2012. **139**(24): p. 4613-22.
63. Conte, D., Jr. and C.C. Mello, *RNA interference in Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Mol Biol, 2003. **Chapter 26**: p. Unit 26 3.
64. Timmons, L., D.L. Court, and A. Fire, *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans*. Gene, 2001. **263**(1-2): p. 103-12.
65. Wang, L., C.J. McLeod, and D.L. Jones, *Regulation of adult stem cell behavior by nutrient signaling*. Cell Cycle, 2011. **10**(16): p. 2628-34.
66. Drummond-Barbosa, D. and A.C. Spradling, *Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during Drosophila oogenesis*. Dev Biol, 2001. **231**(1): p. 265-78.
67. LaFever, L. and D. Drummond-Barbosa, *Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in Drosophila*. Science, 2005. **309**(5737): p. 1071-3.
68. Spike, C.A., et al., *The TRIM-NHL protein LIN-41 and the OMA RNA-binding proteins antagonistically control the prophase-to-metaphase transition and growth of Caenorhabditis elegans oocytes*. Genetics, 2014. **198**(4): p. 1535-58.
69. Schedl, T. and J. Kimble, *fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1988. **119**(1): p. 43-61.
70. Barton, M.K. and J. Kimble, *fog-1, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1990. **125**(1): p. 29-39.
71. Cinquin, A., et al., *Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the C. elegans Germ Line*. PLoS Genet, 2016. **12**(4): p. e1005985.
72. Schumacher, B., et al., *C. elegans ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage*. Cell Death Differ, 2005. **12**(2): p. 153-61.
73. Mateo, A.R., et al., *The p53-like Protein CEP-1 Is Required for Meiotic Fidelity in C. elegans*. Curr Biol, 2016. **26**(9): p. 1148-58.
74. Gottlieb, S. and G. Ruvkun, *daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1994. **137**(1): p. 107-20.
75. Murphy, C.T., *The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries*. Exp Gerontol, 2006. **41**(10): p. 910-21.
76. Smith-Vikos, T., et al., *MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors*. Curr Biol, 2014. **24**(19): p. 2238-46.
77. Pan, K.Z., et al., *Inhibition of mRNA translation extends lifespan in Caenorhabditis elegans*. Aging Cell, 2007. **6**(1): p. 111-9.
78. Korta, D.Z., S. Tuck, and E.J. Hubbard, *S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in C. elegans germline stem/progenitor cells*. Development, 2012. **139**(5): p. 859-70.
79. Kritikou, E.A., et al., *C. elegans GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival*. Genes Dev, 2006. **20**(16): p. 2279-92.
80. Lettre, G., et al., *Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in C. elegans*. Cell Death Differ, 2004. **11**(11): p. 1198-203.

81. Ellis, H.M. and H.R. Horvitz, *Genetic control of programmed cell death in the nematode C. elegans*. Cell, 1986. **44**(6): p. 817-29.
82. Pierce, S.B., et al., *Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse C. elegans insulin gene family*. Genes Dev, 2001. **15**(6): p. 672-86.
83. Li, W., S.G. Kennedy, and G. Ruvkun, *daf-28 encodes a C. elegans insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway*. Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 844-58.
84. Riddle, D.L., M.M. Swanson, and P.S. Albert, *Interacting genes in nematode dauer larva formation*. Nature, 1981. **290**(5808): p. 668-71.
85. Kimura, K.D., et al., *daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in Caenorhabditis elegans*. Science, 1997. **277**(5328): p. 942-6.
86. Lee, S.S., et al., *DAF-16 target genes that control C. elegans life-span and metabolism*. Science, 2003. **300**(5619): p. 644-7.
87. McElwee, J., K. Bubb, and J.H. Thomas, *Transcriptional outputs of the Caenorhabditis elegans forkhead protein DAF-16*. Aging Cell, 2003. **2**(2): p. 111-21.
88. Murphy, C.T., et al., *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
89. Patel, D.S., et al., *Clustering of genetically defined allele classes in the Caenorhabditis elegans DAF-2 insulin/IGF-1 receptor*. Genetics, 2008. **178**(2): p. 931-46.
90. Gems, D., et al., *Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1998. **150**(1): p. 129-55.
91. Hodgkin, J., H.R. Horvitz, and S. Brenner, *Nondisjunction Mutants of the Nematode CAENORHABDITIS ELEGANS*. Genetics, 1979. **91**(1): p. 67-94.
92. Okkema, P.G. and J. Kimble, *Molecular analysis of tra-2, a sex determining gene in C.elegans*. EMBO J, 1991. **10**(1): p. 171-6.
93. Larsen, P.L., *Aging and resistance to oxidative damage in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8905-9.
94. Lithgow, G.J., et al., *Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7540-4.
95. Arantes-Oliveira, N., et al., *Regulation of life-span by germ-line stem cells in Caenorhabditis elegans*. Science, 2002. **295**(5554): p. 502-5.
96. Link, C.D., et al., *Direct observation of stress response in Caenorhabditis elegans using a reporter transgene*. Cell Stress Chaperones, 1999. **4**(4): p. 235-42.
97. Tan, K.T., et al., *Insulin/IGF-1 receptor signaling enhances biosynthetic activity and fat mobilization in the initial phase of starvation in adult male C. elegans*. Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 390-402.
98. Raffaghello, L., et al., *Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(24): p. 8215-20.
99. Henderson, S.T., M. Bonafe, and T.E. Johnson, *daf-16 protects the nematode Caenorhabditis elegans during food deprivation*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006. **61**(5): p. 444-60.
100. Libina, N., J.R. Berman, and C. Kenyon, *Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan*. Cell, 2003. **115**(4): p. 489-502.
101. Fernandez-Cardenas, L.P., et al., *Caenorhabditis elegans ATPase inhibitor factor 1 (IF1) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential (Deltapsim) and is important to induce germ cell apoptosis*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0181984.
102. Pincus, Z., T.C. Mazer, and F.J. Slack, *Autofluorescence as a measure of senescence in C. elegans: look to red, not blue or green*. Aging (Albany NY), 2016. **8**(5): p. 889-98.
103. de la Guardia, Y., et al., *Run-on of germline apoptosis promotes gonad senescence in C. elegans*. Oncotarget, 2016. **7**(26): p. 39082-39096.
104. Perrin, A.J., et al., *Noncanonical control of C. elegans germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways*. Cell Death Differ, 2013. **20**(1): p. 97-107.
105. Pinkston, J.M., et al., *Mutations that increase the life span of C. elegans inhibit tumor growth*. Science, 2006. **313**(5789): p. 971-5.
106. Morran, L.T., et al., *Sexual partners for the stressed: facultative outcrossing in the self-fertilizing nematode Caenorhabditis elegans*. Evolution, 2009. **63**(6): p. 1473-82.

107. Morran, L.T., M.D. Parmenter, and P.C. Phillips, *Mutation load and rapid adaptation favour outcrossing over self-fertilization*. *Nature*, 2009. **462**(7271): p. 350-2.
108. Morran, L.T., et al., *Running with the Red Queen: host-parasite coevolution selects for biparental sex*. *Science*, 2011. **333**(6039): p. 216-8.
109. Hsin, H. and C. Kenyon, *Signals from the reproductive system regulate the lifespan of C. elegans*. *Nature*, 1999. **399**(6734): p. 362-6.
110. Blondin, P., K. Coenen, and M.A. Sirard, *The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation*. *J Androl*, 1997. **18**(4): p. 454-60.
111. Goud, P., et al., *Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity*. *Fertil Steril*, 1999. **72**(2): p. 245-52.



## **14 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

## RESEARCH ARTICLE

# Apoptosis contributes to protect germ cells from the oogenic germline starvation response but is not essential for the gonad shrinking or recovery observed during adult reproductive diapause in *C. elegans*

E. Carranza-García, R. E. Navarro \*

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

\* [rnavarro@ifc.unam.mx](mailto:rnavarro@ifc.unam.mx)
 OPEN ACCESS

**Citation:** Carranza-García E, Navarro RE (2019) Apoptosis contributes to protect germ cells from the oogenic germline starvation response but is not essential for the gonad shrinking or recovery observed during adult reproductive diapause in *C. elegans*. PLoS ONE 14(6): e0218265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265>

**Editor:** Myon-Hee Lee, East Carolina University, UNITED STATES

**Received:** December 17, 2018

**Accepted:** May 29, 2019

**Published:** June 13, 2019

**Copyright:** © 2019 Carranza-García, Navarro. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico PAPIIT-UNAM (IN207415 and IN208918) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-MEXICO (220987) to REN. ECG is a Doctoral Student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional

## Abstract

When *C. elegans* hermaphrodites are deprived of food during the mid-L4 larval stage and throughout adulthood, they enter an alternative stage termed “adult reproductive diapause (ARD)” in which they halt reproduction and extend their lifespan. During ARD, germ cell proliferation stops; oogenesis is slowed; and the gonad shrinks progressively, which has been described as the “oogenic germline starvation response”. Upon refeeding, the shrunken gonad is regenerated, and animals recover fertility and live out their remaining lifespan. Little is known about the effects of ARD on oocyte quality after ARD. Thus, the aim of this study was to determine how oocyte quality is affected after ARD by measuring brood size and embryonic lethality as a reflection of defective oocyte production. We found that ARD affects reproductive capacity. The oogenic germline starvation response protects oogenic germ cells by slowing oogenesis to prevent prolonged arrest in diakinesis. In contrast to a previous report, we found that germ cell apoptosis is not the cause of gonad shrinkage; instead, we propose that ovulation contributes to gonad shrinkage during the oogenic germline starvation response. We show that germ cell apoptosis increases and continues during ARD via *lin-35/Rb* and an unknown mechanism. Although apoptosis contributes to maintain germ cell quality during ARD, we demonstrated that apoptosis is not essential to preserve animal fertility. Finally, we show that IIS signaling inactivation partially participates in the oogenic germline starvation response.

## Introduction

To ensure species continuity, animals have developed mechanisms for protecting germ cells during stressful conditions. The *C. elegans* hermaphrodite germline serves as an excellent model for studying cell biology. In *C. elegans* hermaphrodites, 2 identical U-shaped gonad arms contain germ cells ([Fig 1A](#)). Under control conditions, L4 hermaphrodites ([Fig 1C and](#)

Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACyT (361899). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

1E) produce approximately 40 germ cells that give rise 160 spermatids per gonad arm, which are stored within each spermatheca. Thereafter, during the adult stage, the remaining germ cells either differentiate into oocytes or are eliminated by physiological germline apoptosis [1, 2]. Physiological apoptosis is an essential mechanism for maintaining oocyte quality during oogenesis, as it promotes the allocation of nutrients to growing oocytes [3]. The most proximal oocytes arrest in diakinesis until they are fertilized, then complete meiosis and begin embryogenesis [3, 4] (Fig 1A and 1D). During its fertile period, a hermaphrodite produces approximately 300 new organisms in 3 days by self-fertilization with very low embryonic lethality (approx. 1–2 dead embryos/animal). Then, they cease laying eggs and live for 15 more days [4].

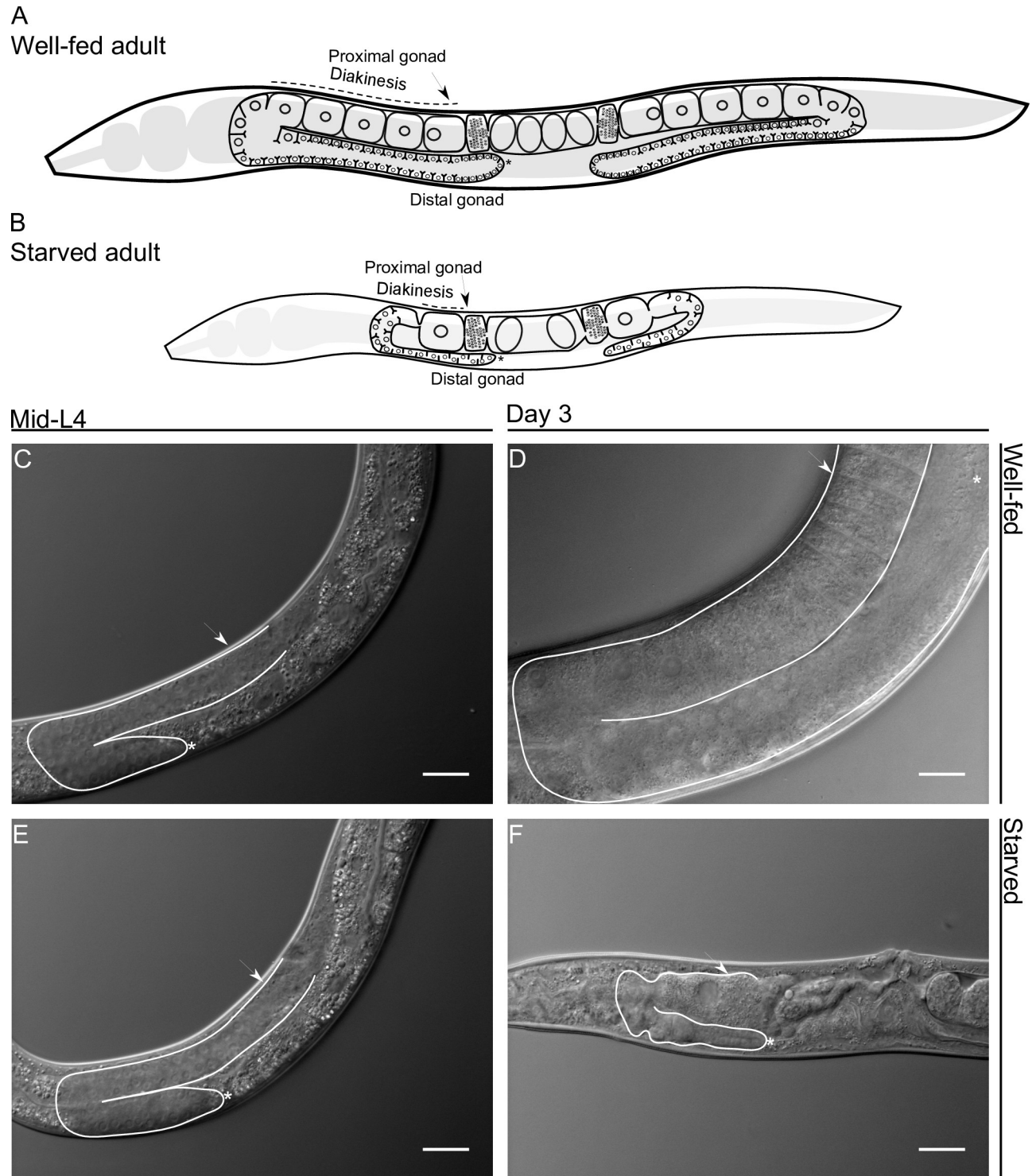
The short, highly stereotyped reproductive cycle of *Caenorhabditis elegans* can be altered when animals are deprived of food and enter into reversible states of growth arrest or diapause, depending on the stage in which they are deprived of food [5]. Animals subjected to high temperatures, crowding or fasting during the L1-L2 stage transition develop into a well-studied alternative larval stage known as the “dauer” stage. During dauer diapause, animals seal their orifices and form a thick impermeable cuticle, allowing them to endure stress for months [6].

When mid-L4 larvae or adult hermaphrodites face starvation conditions, they enter into adult reproductive diapause (ARD), characterized by delayed reproduction and an extended lifespan [7, 8]. ARD is a not yet fully elucidated form of diapause and differs from dauer diapause since animals starved at a low population density can enter and maintain this alternate developmental stage [8]. It has been observed that when starvation begins during the late-L4 or adult stage, embryos are retained *in utero*, hatch and cause the hermaphrodite’s death [7]; however, this fate can be avoided if embryo viability is inhibited [8]. During ARD, the hermaphrodites’ gonad shows a remarkable change; it shrinks in size progressively and the number of germ cells decreases to a small pool of ~35 cells [7] (Fig 1B and 1F). Starvation causes subsequent halting of the cell cycle in mitotically proliferating germ cells, which remain quiescent until conditions are restored [9]. The starved hermaphrodites form a single oocyte per gonad arm and usually carry 1–2 developing embryos within the uterus. These embryos are the result of delayed ovulation and fertilization, which occur approximately every 8 h ([8] and Fig 1B and 1F).

Remarkably, gonad shrinking and delayed reproduction are reversible [7, 8]. Following refeeding, germ cells resume their cell-cycle progression and start dividing, causing gonad regeneration, which, at least morphologically under the microscope, resembles a young adult gonad that never has been starved [7–9]. Hermaphrodites recover fertility and produce progeny by self-fertilization or mating [7]. Angelo and van Gilst (2009) proposed that apoptosis plays a crucial role during ARD, since apoptosis-defective mutants subjected to starvation from the mid-L4 stage do not reduce their gonad size and are unable to recover fertility after ARD [7].

ARD extends not only the total lifespan but also the reproductive period of animals [7]. In *C. elegans*, as in many other organisms, fertility declines with age [10], and oocyte quality is greatly affected during aging [3]. Adult reproductive diapause has been proposed as an anti-aging mechanism for protecting the germline [7]. Despite the numerous unexplained aspects of this phenomenon, whether ARD protects oocyte quality and the mechanisms that control this phenomenon have not yet been determined.

In this report, we use brood size and embryonic lethality to reflect defective oocyte production to investigate the effects of ARD on oocyte quality. We found that ARD affects gametes’ reproductive capacity and prevents oogenic germ cells from undergoing prolonged arrest in diakinesis. During ARD, germ cell apoptosis is very active; however, in contrast to a previous report, we found that it is not important for gonad shrinking. We observed that increased



**Fig 1. Comparison between well-fed and starved adult hermaphrodite gonad arms in *Caenorhabditis elegans*.** Schematic representation of well-fed (A) and starved (B) adult hermaphrodites. (C, E) Nomarski image of mid-L4 gonad arms. (D) Nomarski image of a hermaphrodite that was well-fed for 3 days. (F) Nomarski image of a hermaphrodite that was starved for 3 days from mid-L4. In all images one gonad arm is outlined in white; the distal gonad is marked with an asterisk (\*); and the arrow points to the proximal gonad. Scale bar = 20  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g001>

germ cell apoptosis during ARD depends partially on *lin-35/Rb* and an unknown mechanism. We propose that ovulation causes gonad shrinking by exhausting gonad contents when a few oocytes are produced. Finally, DAF-2 inactivation causes gonad shrinking in the presence of food suggesting that it may partially participate in this pathway. Here, we describe the effects of ARD on fertility and the regulation of germ cell apoptosis under starvation conditions.

## Materials and methods

### Strains

*C. elegans* strains were maintained as described previously [11]. All strains were grown at 20°C or the permissive temperature using *Escherichia coli* OP50 as food. The wild-type strain was N2 Bristol. For the *daf-2* experiments, 15°C and 25°C were used as the permissive and restrictive temperatures, respectively. For the *pha-4(zu225)* experiments, 24°C and 15°C were used as the permissive and restrictive temperatures, respectively. Heterozygous EU31 *skn-1(zu135)* animals segregate as Unc and WT: Unc individuals were picked for maintenance, and WT individuals laid eggs that did not hatch. For the *fog-1(q253)* experiments, 15°C and 25°C were used as the permissive and restrictive temperatures, respectively. *fog-1(q253)* worms were maintained at 15°C and upshifted to 25°C to feminize their germline. The alleles used were as follows: JK560 *fog-1(q253)*, CB4108 *fog-2(q71)*, MD701 *ced-1::gfp(bc1s39)*, *cep-1(gk138);ced-1::gfp(bc1s39)*, MT3002 *ced-3(n1286)*, RB2071 *ced-3(ok2734)*, MT1522 *ced-3(n717)*, CB1370 *daf-2(e1370)*, DR1309 *daf-16(m26);daf-2(e1370)*, MT10430 *lin-35(n745)*, GR1307 *daf-16(mgDf50)*, EU31 *skn-1(zu135)*, SM190 *pha-4(zu225)*, VC446 *alg-1(gk214)*, RB1206 *rsk-1(ok1255)*, SS712 *ife-1(bn127)*, WS2973 *gla-3(op212)*, RN083 *daf-2(e1370);ced-1::gfp*, and RN084 *lin-35(n745);ced-1::gfp*. All the strains were obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC).

### Image acquisition

Animals were mounted with 10 µl of 0.01% tetramisole in M9 on 2% agarose pads and observed using a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with an AxioCam MRc camera (Zeiss). Images were obtained using Axio Vision software (Zeiss) and processed with ImageJ software.

### Starvation protocol

We performed the starvation protocol described by Seidel and Kimble (2011) [8]. Synchronous L1 populations were obtained by bleaching gravid hermaphrodites. The resulting embryos were washed in M9, transferred to conical tubes and incubated for 18 h at 20°C in a gyratory rocker. Hatched L1s were collected and placed in 10 cm plates seeded with OP50 at a density of ~1,200 L1s per plate until they reached the mid-L4 stage. To initiate starvation, the animals were collected with M9 medium and washed up to 6 times until no turbidity was observed; they were then placed in 10 cm plates with or without food at a density of ~10,000 animals per plate.

### Apoptosis assay

Cell corpses were counted using the MD701 *bc1s39 [Plim-7::ced-1::gfp;lin-15(+)]* transgenic strain. After the starvation protocol, animals were placed in seeded plates as the control condition or in unseeded plates as the starvation condition. Animals were transferred daily until they ceased laying eggs and were then picked, anesthetized, mounted and visualized under an epifluorescence microscope.

## Germ cell quantification

We used DAPI staining to quantify the germ cells in each gonad arm as described by Silva-García and Navarro (2013) with some modifications [12]. Animals were dissected on glass coverslips, which were then inverted and placed on a polylysine-treated slide. The samples were freeze-cracked, fixed, stained with DAPI, mounted using 10  $\mu$ l of Vectashield (Vector Lab) and visualized through fluorescence microscopy.

## Fertility assay

We determined the brood size and embryonic lethality, resulting from self-fertilization and mating as described by Bukhari *et al.*, 2012 [13]. Single mid-L4 hermaphrodites were transferred to seeded NGM plates and maintained at 20°C. Animals were transferred to fresh plates each day until they ceased laying eggs. For the recovery of self-fertilizing animals following starvation, single hermaphrodites that had spent 5 days under starvation were transferred to seeded NGM plates and then to fresh plates each day until they ceased laying eggs. For mating animals, either mid-L4, well-fed 6-day-old or recovered *fog-(q253)* or *fog-2(q71)* animals were individually transferred to seeded NGM plates and crossed with 4 well-fed 1-day-old wild-type males. Twenty-four hours after the transfer of hermaphrodites, the embryos that did not hatch were scored as dead embryos. Forty-eight hours after the transfer of hermaphrodites, the number of larvae was scored.

## Long-term immobilization

We determined the temporal progression of germ cell corpse clearance using a method described by Kim *et al.*, 2013 [14]. Briefly, animals were immobilized using 0.5  $\mu$ l of a suspension of polystyrene beads (Polysciences, 2.5% by volume, 0.1  $\mu$ m diameter) on 10% agarose pads. Germ cell corpses were visualized and imaged at 60X magnification until they were completely cleared.

## Ovulation rate

We followed the methodology described by Huang *et al.*, 2012 [15]. Animals were individually scored for the number of embryos within the uterus using Nomarski microscopy, then transferred to fresh plates with food for 4 h and finally scored for the number of embryos within the uterus and those laid on the plate. More than 30 animals were observed for each genotype. The ovulation rate per gonad arm per hour = (embryos at the end of a time interval—embryos at the beginning) / (2 x number of animals x time interval).

## Statistical comparisons

The t-test or Mann-Whitney U test was used for comparisons with controls in fertility assays. For multiple comparisons in apoptosis, fertility assays and germ cell corpse clearance assays, the data were analyzed using one way ANOVA and Dunn's test for multiple comparisons.

## Results

### Animals that undergo ARD do not recover their full fertility because this condition affects germ cell quality

We wanted to study how fertility and germ cell quality are affected after exposing animals to ARD. Although it has been reported that wild-type animals survive up to 30 days in ARD, their self-fertility is severely impaired after 15 days of starvation [7]. Therefore, we decided to

study the effect of ARD when animals are exposed to 5 days of starvation because this period is sufficient to reduce hermaphrodite self-fertility by up to 50% [7]. To conduct our experiments, we used synchronized populations of mid-L4 larvae that were fed (control) or starved (no bacteria) for 5 days and then refed. For simplicity we will refer to starved/refed nematodes as recovered animals. We quantified the brood size of self-fertilizing recovered wild-type hermaphrodites and compared it to that of well-fed nematodes. We found that the recovered wild-type hermaphrodites produced smaller broods than those that grew under control conditions (29% of the wild-type brood size; Table 1, Fig 2A).

When we analyzed the progeny produced by the control and recovered animals by day, we observed that recovered animals produced fewer offspring during the first two days after refeeding, after which progeny production peaked at the third day and ceased at the fifth day (Fig 2B). It is likely that the delay in offspring production in recovered animals was due to the gonad regeneration process, which usually takes two days.

One explanation for the low fertility after ARD is that because the starvation experiments started at the mid-L4 larval stage (approx. 4 h after L4 molting), when spermatogenesis has not yet been completed, insufficient sperm production could occur. To discard this possibility, we quantified sperm production in starved animals once they were close to completing the L4 larval stage (approx. 8 h after L4 molting) by DAPI staining. Control wild-type animals produced an average of  $105.11 \pm 1.1$  sperm ( $N = 36$ , Fig 2C) and starved wild-type animals produced a similar number of  $101.89 \pm 2.5$  ( $N = 37$ ). After 5 days of L4 larval molting, the control wild-type animals did not have any more sperm in their spermatheca, while 5-day-starved wild-type animals still harbored an average of  $102.5 \pm 0.68$  sperm ( $N = 28$ , Fig 2C). We conclude that even during prolonged starvation sufficient sperm are produced, therefore this is not a factor that explains low progeny numbers after ARD.

We also quantified the embryonic lethality of self-fertilizing recovered hermaphrodites after ARD and found that recovered animals exhibited significantly higher embryonic lethality than control animals ( $3.8 \pm 0.3$  dead embryos/worm in recovered animals vs.  $2.1 \pm 0.1$  dead embryos/worm in control animals, i.e., 1.8-fold; Table 1, Fig 2D).

To counteract the effect of ARD on sperm, we quantified the brood size and embryonic lethality of wild-type hermaphrodites that were exposed to ARD and later crossed with well-fed wild-type males. Under control conditions, mid-L4 wild-type hermaphrodites were crossed with 4 wild-type males overnight and then transferred daily to new Petri dishes until they ceased laying embryos. For ARD, mid-L4 wild-type animals were deprived of bacteria for 5 days, then transferred to plates with food and immediately crossed with 4 well-fed wild-type males. We observed that the fertility of recovered wild-type animals crossed with well-fed males improved considerably (81% of that in control wild-type animals) even though their brood size never reached that of the control (Fig 2E). Additionally, we did not observe significant differences in embryonic lethality between these two groups of animals ( $2.6 \pm 0.3$  dead embryos in control mated animals vs.  $2.8 \pm 0.6$  dead embryos in recovered mated animals; Table 1, Fig 2F). Our results suggest that ARD affects fertility and embryonic survival due to defects in oogenic germ cells; however, we were not able to rule out the possibility that sperm quality is impaired under starvation conditions.

### Feminized germlines are more sensitive to ARD than those of wild-type animals

To test the effect of ARD exclusively on oogenic germ cells, we used *fog-1(q253)* and *fog-2(q71)* mutant animals, which have feminized germlines. Female *fog-2(q71)* animals are unable to produce sperm and only reproduce when they are crossed with males [16]. *fog-1(q253)*

**Table 1. Fertility assays in diverse genetic backgrounds used in this study.**

Genotype	Brood Size				Dead Embryos				N
WT	231.8	±	2.3		2.1	±	0.1		144
Recovered WT	67.0	±	2.9	***	3.8	±	0.3	***	69
Control WT	424.9	±	8.3		2.6	±	0.3		22
x WT males									
Recovered WT	344.8	±	26.3	n.s.	2.8	±	0.6	n.s.	17
x WT males									
Control <i>fog-2(q71)</i>	324.5	±	6.5		2.4	±	0.3		46
x WT males									
Recovered <i>fog-2(q71)</i>	183.2	±	5.6	*	4.0	±	0.3	*	42
x WT males									
Prolonged diakinesis <i>fog-2(q71)</i>	55.8	±	2.3	*	4.8	±	0.2	*	51
x WT males									
Control <i>fog-1(q253)</i>	302.3	±	7.0		2.5	±	0.1		31
x WT males									
Recovered <i>fog-1(q253)</i>	177.1	±	3.3	*	4.4	±	0.2	*	35
x WT males									
Prolonged diakinesis <i>fog-1(q253)</i>	65.0	±	1.6	*	5.6	±	0.1	*	39
x WT males									
Control <i>ced-3(n717)</i>	141.0	±	2.6		8.1	±	0.7		43
Recovered <i>ced-3(n717)</i>	53.1	±	1.8	*	7.3	±	0.5	*	41
Control <i>ced-3(n1286)</i>	143.8	±	3.2		7.5	±	0.4		88
Recovered <i>ced-3(n1286)</i>	52.0	±	2.3	*	12.3	±	0.8	*	58
Control <i>ced-3(n717)</i>	315.6	±	8.6		19.8	±	3.0		11
x WT males									
Recovered <i>ced-3(n717)</i>	248.9	±	12.3	**	19.3	±	1.9	n.s.	20
x WT males									

Hermaphrodites with the different genetic backgrounds were individually selected at the mid-L4 stage and transferred to new plates every 24 h until they ceased laying embryos. Recovered wild-type hermaphrodites were selected at the mid-L4 stage, starved for 5 days and transferred to new plates every 24 h until they ceased laying embryos. t-test (control vs. recovered). Control *fog-1(q253)* and *fog-2(q71)* animals were individually selected in the mid-L4 stage, mated with well-fed males and transferred to fresh plates daily until they ceased laying embryos. Recovered virgin *fog-1(q253)* and *fog-2(q71)* animals were selected in the mid-L4 stage and starved for 5 days, then individually refed for 1 day, mated with well-fed males and transferred to fresh plates daily until they ceased laying embryos. Virgin *fog-1(q253)* and *fog-2(q71)* animals were selected in the mid-L4 stage and placed on food for 6 days, then mated with well-fed males and transferred to fresh plates daily until they ceased laying embryos. Plates were scored for dead embryos and total progeny. Embryos that did not hatch within 24 h after being laid were scored as dead. Dunn’s test (wild-type values as control). n.s. non significant.

\* P ≤ 0.05

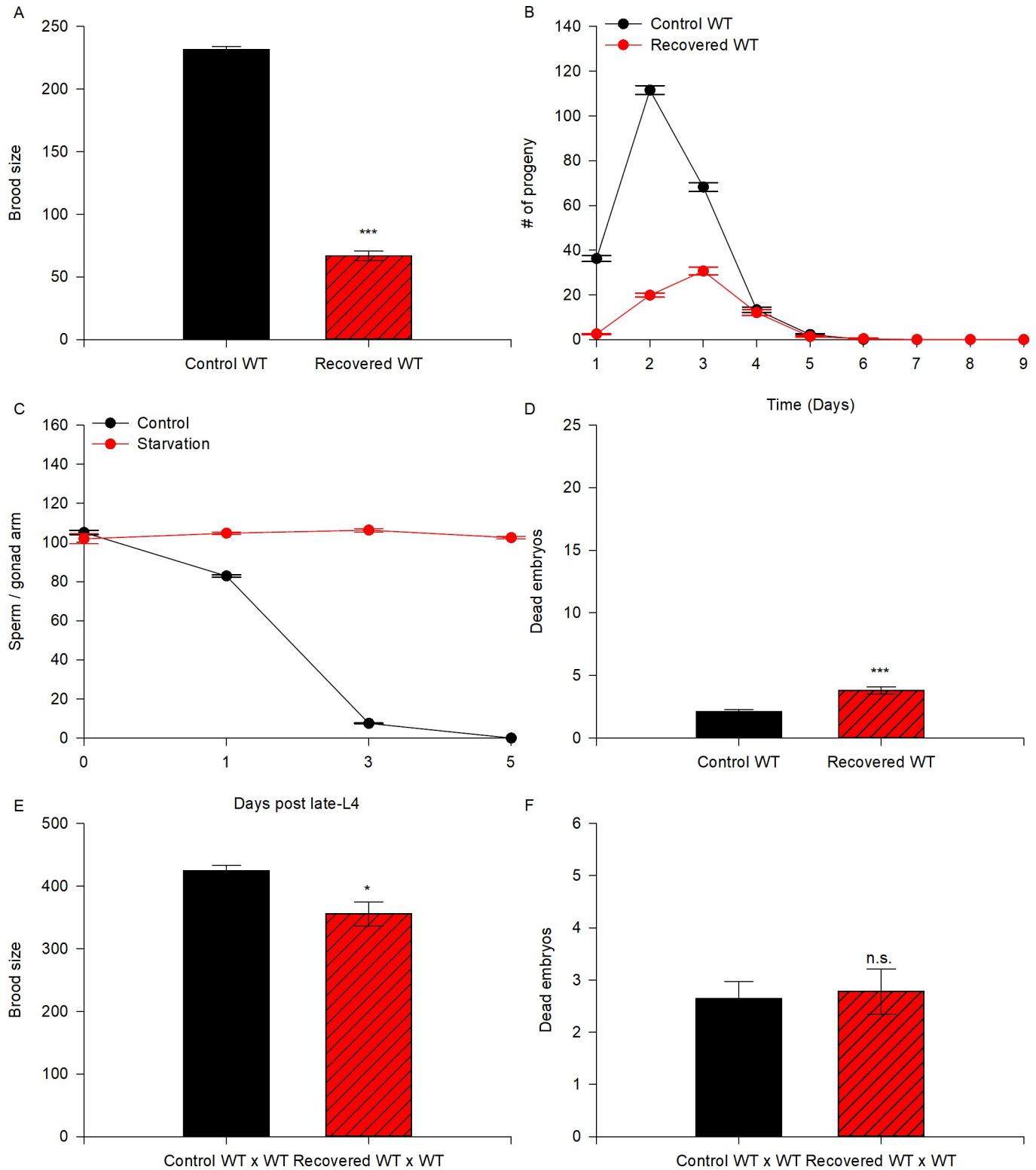
\*\* P ≤ 0.01

\*\*\* P ≤ 0.001

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t001>

hermaphrodites are temperature sensitive and at the restrictive temperature (25°C) they exhibit feminized gonads [17]. Under control conditions, single mid-L4 virgin *fog-2(q71)* females were crossed with 4 wild-type males overnight and then transferred daily to new Petri dishes until they ceased laying embryos. For ARD, virgin mid-L4 *fog-2(q71)* females were deprived of bacteria for 5 days, then recovered on food for 24 h and crossed with 4 wild-type males overnight. We compared the brood size and embryonic lethality of control and recovered *fog-2* mutant animals. We observed that recovered *fog-2(q71)* animals produced smaller broods than control *fog-2(q71)* animals (56.5% of the brood size of control animals, Table 1,





**Fig 2. Animals subjected to ARD do not recover their fertility due to defects in germ cells.** (A) The graph represents the brood size produced by self-fertilizing control (black) and recovered (red) wild-type animals. Mid-L4 hermaphrodites were allowed to self-fertilize (black) or were starved for 5 days and then refed (red). The data represent the mean brood size ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Student's t-test ( $P \leq 0.001$ ). (B) Quantification of the progeny produced on each day by self-fertilizing control (black line) and recovered (red line) wild-type animals. Time-course data are displayed as the mean ( $\pm$ SEM) number of progeny per time point. (C) Quantification of sperm produced by wild-type animals under control conditions (black

line) or subjected to ARD (red line) at several time points: the late-L4 larval stage and 1, 3 and 5 days after the mid-L4 larval stage. The data are displayed as the mean ( $\pm$ SEM) number of sperm per time point. (D) The number of dead embryos within the progeny of self-fertilizing wild-type animals under control (black) and recovered conditions (red) was calculated. Data represent the mean number of dead embryos ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test ( $P \leq 0.001$ ). (E) The graph represents the brood size produced by mating control (black) and recovered (red) wild-type animals. Well-fed mid-L4 hermaphrodites were individually mated to 4 well-fed wild-type males overnight and were then transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (black). For the recovered animals, mid-L4 hermaphrodites were starved for 5 days, then recovered on food and mated to 4 well-fed 1-day-old wild-type males overnight, then transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (red). The data represent the mean brood size ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test ( $P \leq 0.024$ ). (F) The number of dead embryos within the progeny produced by mating wild-type animals under control (black) and recovered conditions (red) to well-fed wild-type males was calculated. Data represent the mean number of dead embryos ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test, and the difference was not significant (n.s.).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g002>

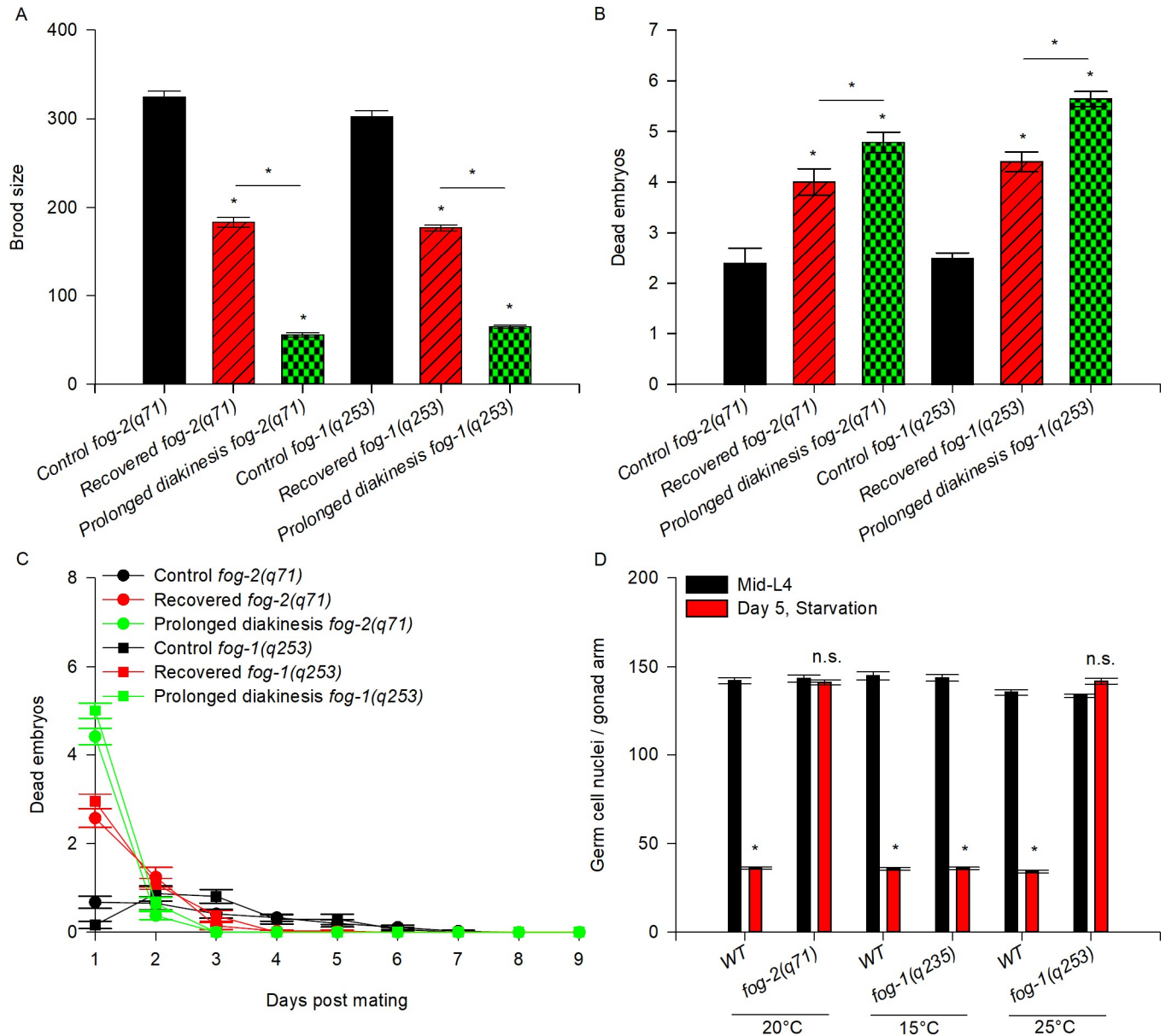
Fig 3A) and showed higher embryonic lethality (1.7-fold;  $2.4 \pm 0.3$  dead embryos/worm in *fog-2* control animals vs.  $4 \pm 0.3$  dead embryos/worm in *fog-2* recovered animals; Table 1, Fig 3B).

To confirm our findings we compared the brood size and embryonic lethality of control and recovered *fog-1(q253)* mutant animals. To do so, a group of synchronized hermaphrodite *fog-1(q253)* animals were grown from L1-mid-L4 at 25°C and then individually transferred to a plate with bacteria and 4 wild-type males overnight as a control. Another group of *fog-1(q253)* animals was transferred to plates without bacteria and incubated for 5 days at 25°C. On the fifth day, the animals were recovered for 24 h in a plate with bacteria and then individually transferred to plates with bacteria and crossed with 4 wild-type males overnight. Recovered *fog-1(q253)* mutant animals showed significantly fewer progeny than control animals (Fig 3A and Table 1). Additionally, recovered *fog-1(q253)* mutant animals showed higher embryonic lethality (1.7-fold;  $2.5 \pm 0.1$  dead embryos/worm in *fog-1* control animals vs.  $4.4 \pm 0.2$  dead embryos/worm in *fog-1* recovered animals; Table 1, Fig 3B). Our results demonstrate that ARD affects oogenic germ cells to an extent that could interfere with embryo survival long after starvation has been ended. Since we observed that the effect of ARD was stronger in feminized mutants, we conclude that some genetic backgrounds could be more sensitive than others.

### Oogenic germline starvation response prevents germ cells from entering oogenesis arrest

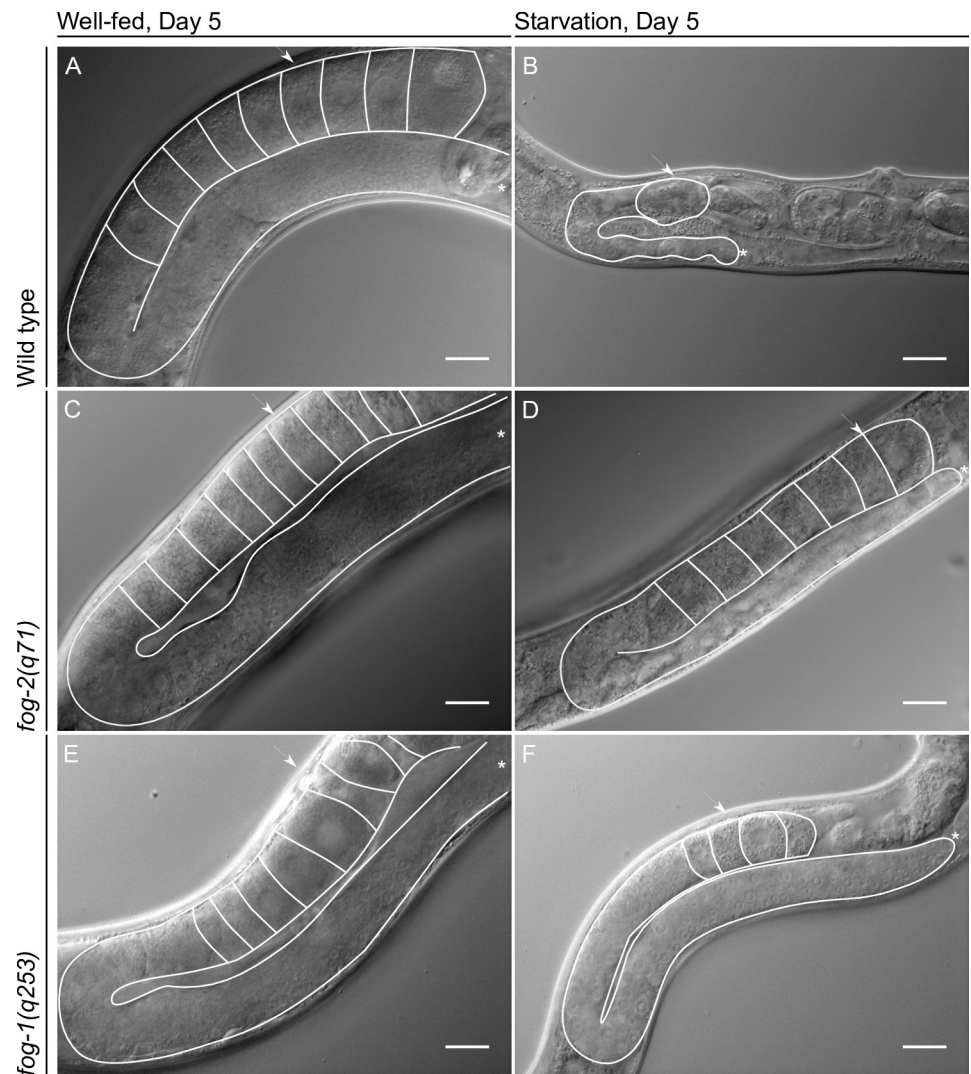
Well-fed virgin *fog-2* mutant animals' do not produce sperm; instead, all of their germ cells develop as oocytes, and the most proximal remain arrested in diakinesis within the gonad [16]. When *fog-2* mutant animals are mated after prolonged diakinesis arrest, their fertility and embryonic viability are severely affected [3]. By the fifth day after L4 molting, well-fed wild-type hermaphrodites have exhausted their sperm supply and arrested oocytes in diakinesis can be observed in the gonad (approx. 9) (Fig 4A). During the oogenic germline starvation response in wild-type animals, oogenesis is delayed but does not seem to be arrested (at least for the first 3 days after fasting); no stacking oocytes are observed and it is possible to distinguish only one developing oocyte per gonad arm ([8] and Fig 4B). In contrast, we observed stacked oocytes in 5-day-old ARD virgin *fog-2* mutant animals (approx. 7, Fig 4D) although they exhibited fewer stacked oocytes than well-fed 5-day-old virgin *fog-2* animals (approx. 11, Fig 4C). We also observed that *fog-1(q253)* mutant animals that were starved for 5 days at the restrictive temperature showed stacked oocytes within their gonads (approx. 4, Fig 4F) although they presented fewer stacked oocytes than well-fed 5-day-old virgin *fog-1* animals (approx. 8, Fig 4E).

To continue testing whether the oogenic germline starvation response during ARD exerts a protective effect on germ cells, we compared the quality of germ cells when they were exposed to prolonged arrest in meiosis under well-fed conditions vs. ARD. We crossed well-fed 6-day-



**Fig 3. Germlines from feminized mutant backgrounds are more sensitive to ARD than those of wild-type animals.** (A) The graph represents the brood size produced by mating virgin *fog-2(q71)* and *fog-1(q253)* mutant animals to well-fed wild-type males. Mid-L4 virgin animals from different genetic backgrounds were mated to 4 well-fed wild-type males overnight, then transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (black). Mid-L4 virgin mutant animals were starved for 5 days, recovered on food for 24 h and then mated with 4 well-fed 1-day-old wild-type males overnight, after which they were transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (red). Well-fed 6-day-old virgin mutant animals, which exhibited stacked oocytes arrested in prolonged diakinesis within the gonad, were mated with 4 well-fed 1-day-old wild-type males overnight and then transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (green). The data represent the mean brood size ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by one-way ANOVA on ranks, followed by Dunn's test ( $P < 0.05$ ). (B) The graph shows the number of dead embryos within the progeny produced by mating with well-fed wild-type males under control conditions (black), recovered conditions (red) and prolonged arrest in diakinesis (green). The data represent the mean number of dead embryos ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by one-way ANOVA on ranks, followed by Dunn's test ( $P < 0.05$ ). (C) Quantification of dead embryos within the progeny produced each day by mating with wild-type males under control (black line) and recovered (red line) conditions and prolonged arrest in diakinesis (green line). Time course data are displayed as the mean ( $\pm$ SEM) number of dead embryos per time point. (D) Number of germ cells per gonad arm in wild-type and *fog-2(q71)* and *fog-1(q253)* mutant animals. The graph represents the average number of germ cells scored using DAPI staining in dissected gonads during the mid-L4 stage (0) and 5 days after the mid-L4 stage under starvation conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g003>



**Fig 4. The gonads of feminized germline mutant animals do not shrink during ARD.** Nomarski gonad images of the indicated genetic backgrounds and conditions. (A) Representative Nomarski image of a well-fed 5-day-old wild-type hermaphrodite. (B) Nomarski image of a wild-type hermaphrodite that had spent 5 days in ARD. (C) A well-fed 5-day-old virgin *fog-2(q71)* mutant animal. (D) A virgin *fog-2(q71)* animal that had been starved for 5 days. (E) A well-fed 5-day-old virgin *fog-1(q253)* mutant animal. (F) A virgin *fog-1(q253)* animal that had been starved for 5 days. In all images one gonad arm and the oocytes within it are outlined in white; the distal gonad is marked with an asterisk (\*); the arrow points to the proximal gonad. Scale bar = 20  $\mu$ m.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g004>

old virgin *fog-2* and *fog-1* mutant animals with well-fed wild-type males and determined their brood size and embryonic lethality, which were compared to those of *fog-2(q71)* and *fog-1(q253)* mutant animals crossed under control and recovered conditions. We found that well-fed 6-day-old *fog-2* and *fog-1* mutant animals produced smaller broods (by 17% and 22%, respectively) than the controls and even smaller broods (by 30.5% and 36.7%, respectively) than animals recovered after 5 days of ARD (Fig 3A, Table 1).

Additionally, well-fed 6-day-old *fog-2* and *fog-1* mutant animals exhibited higher embryonic lethality than control (by 2- and 2.2-fold, respectively) and recovered animals (1.2- and 1.3-fold, respectively) (Fig 3B and Table 1). We observed that dead embryos were present mainly during the first day in well-fed 6-day-old *fog-2* and *fog-1* mutant animals (Fig 3C). Similarly, in *fog-2* and *fog-1* mutant recovered animals, the main peak of dead embryos was

Table 2. Germ cell quantification per gonad arm in different genetic backgrounds under control and starvation conditions.

		5 Days post mid-L4										
		mid-L4			Control			Starvation			N	
20°C	WT	141.9 ± 1.8	49	468.2 ± 2.0	38	36.0 ± 0.5	54	**				
	<i>fog-2(q71)</i>	143.1 ± 2.0	42	315.9 ± 2.6	47	141.0 ± 1.5	48	**				
15°C	WT	144.7 ± 2.2	30	386.9 ± 1.6	20	35.5 ± 0.8	24	**				
	<i>fog-1(q253)</i>	143.5 ± 1.8	30	386.2 ± 1.6	30	36.0 ± 0.6	25	**				
25°C	WT	135.3 ± 1.5	20	388.5 ± 1.8	25	34.2 ± 0.7	25	**				
	<i>fog-1(q253)</i>	133.5 ± 0.8	30	338.5 ± 1.8	30	141.8 ± 1.6	25	n.s.				

The gonads of animals under control conditions or starvation were dissected, stained and scored for the number of germ cells using epifluorescence microscopy. Control animals remained on NGM plates seeded with OP50. For starvation conditions, animals were grown on food from L1 to the mid-L4 larval stage and then starved for 5 days. Animals were subsequently picked and dissected. The dissected gonads were stained with DAPI and the number of germ cells per gonad arm was scored under fluorescence microscopy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t002>

observed on the first day after the cross (Fig 3C). Apparently, the dead embryos were produced from the oocytes that were arrested in diakinesis for the longest period during ARD. We observed that embryonic lethality in *fog-2(q71)* and *fog-1(q253)* mutant animals was mainly caused by embryos that resulted from the fertilization of the oocytes that were already present or produced during ARD and presumably were arrested for a long period of time. We conclude that because the oogenic germline starvation response during ARD slows oocyte production, oogenic germ cells are prevented from undergoing diakinesis arrest, which preserves oocyte quality. We suggest that this could explain why feminized germline mutant animals are more sensitive to ARD than wild-type animals.

During the course of these experiments, we observed that the gonads of *fog-2* and *fog-1* animals did not shrink during ARD (Fig 4D and 4F). Our results, as well as those of other similar approaches reported previously [18], show that feminized mutant animals' gonads do not decrease in size, suggesting that ovulation is one of the causes of gonad shrinking during ARD. To verify that feminized gonads do not shrink during ARD, we quantified the germ cell number per gonad arm using DAPI staining in control animals and in animals that spent 5 days in ARD. In well-fed conditions, wild-type animals showed an increase in the number of germ cells per gonad arm from  $141.9 \pm 1.8$  (at mid-L4) to  $468.23 \pm 2.0$  (at the fifth day post mid-L4) (Table 2). Additionally, the number of germ cells per gonad arm decreased progressively during starvation from  $141.9 \pm 1.8$  (at the mid-L4) to  $36.0 \pm 0.5$  (at the fifth day post mid-L4) (Fig 3D and Table 2). We found that the number of germ cells in *fog-2* mutant animals that were starved for 5 days remained unchanged compared to the number of germ cells per gonad arm at the mid-L4 stage ( $143.1 \pm 2.0$  vs.  $141.0 \pm 1.5$ ; Fig 3D and Table 2). We confirmed this result using *fog-1(q253)* mutant animals (Fig 3D and Table 2). Moreover, when *fog-1(q253)* animals were maintained at the permissive temperature (15°C) from L1 to adulthood and subjected to ARD, their gonads were able to shrink similarly to those of the wild-type (Fig 3D and Table 2). Our results suggested that gonad shrinking during ARD is partially due to ovulation.

### Germ cell apoptosis is not required to reduce gonad size during prolonged starvation

Caspase CED-3 is required for germ cell apoptosis under control and starvation conditions [19, 20]. Angelo and van Gilst, (2009) previously showed that during ARD, the gonads of *ced-3*

(*n1286*) mutant animals are not able to shrink and they suggested that apoptosis is required for this process [7]. However, we obtained different results. We exposed mid-L4 *ced-3* mutant animals (alleles *n1286*, *n717* or *ok2734*) to prolonged-starvation and we observed that the gonads of animals harboring all of these alleles were able to shrink during fasting (Fig 5D, 5E, 5G, 5H, 5J and 5K) similarly to those of the wild-type (Fig 5A and 5B).

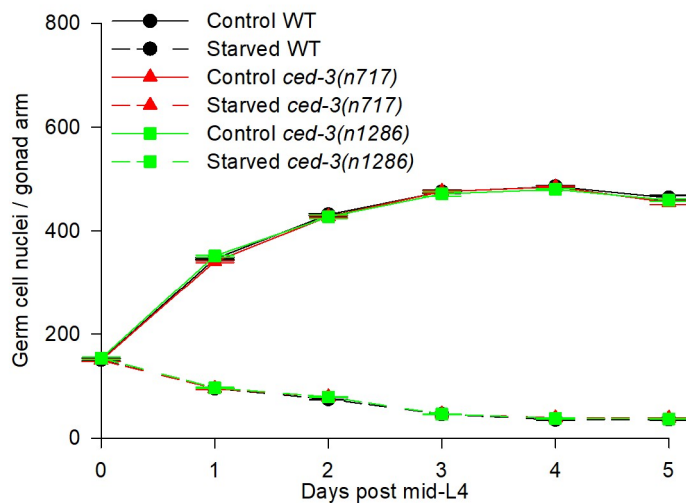
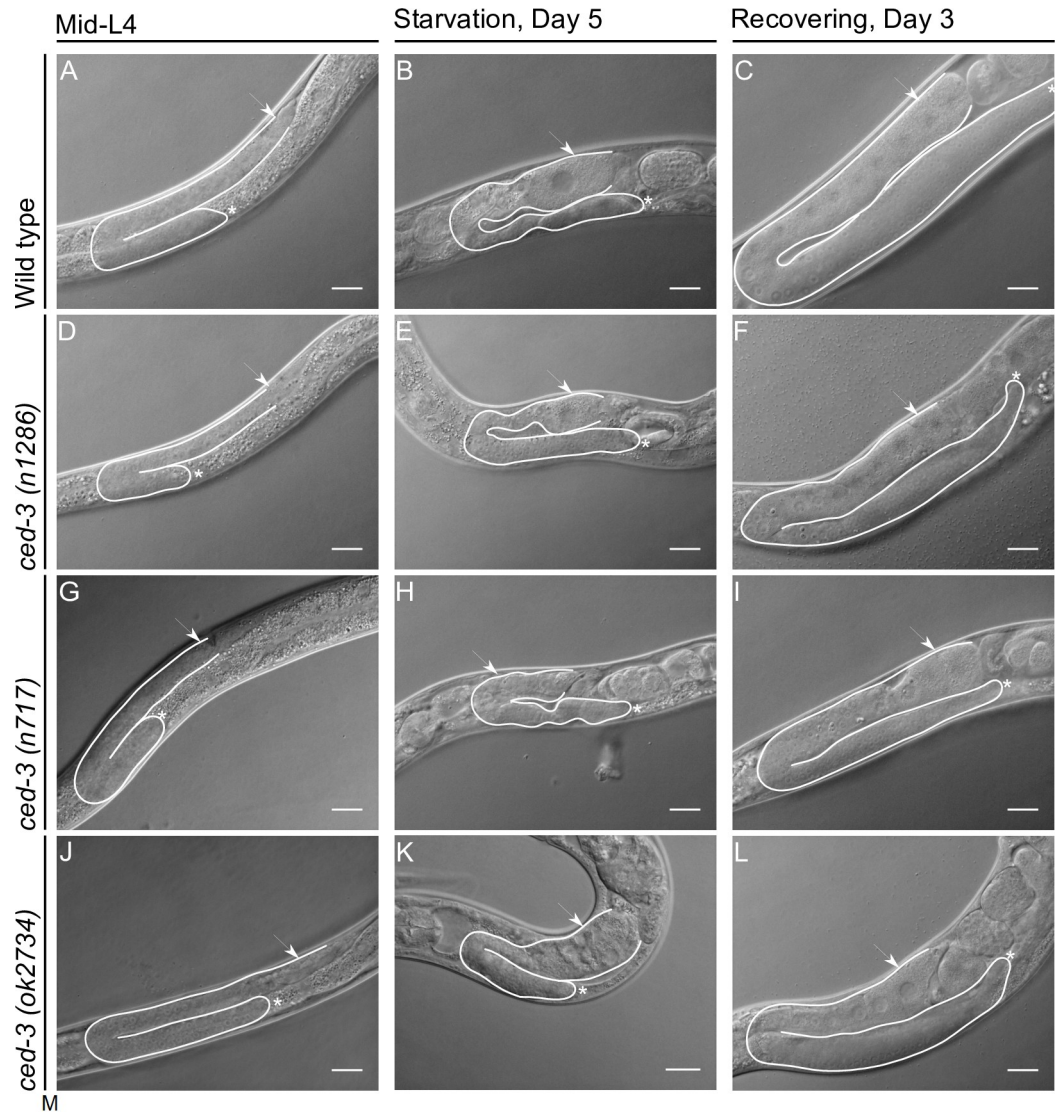
To verify that the gonads of *ced-3* mutant animals shrink similarly to those of wild-type animals, we quantified the number of germ cells per gonad arm by DAPI staining from the mid-L4 stage over the next 5 days under control and starvation conditions in animals with the wild-type and *ced-3(n717)* and (*1286*) mutant alleles. We found that *ced-3* mutant animals indeed showed a progressive reduction of the germ cell number per gonad arm during starvation similar to that in wild-type animals (Fig 5M and Table 3). Moreover, the gonad size of *ced-3* mutant animals recovered when they were refed as efficiently as that of wild-type animals, as judged by Nomarski microscopy (Fig 5C, 5F, 5I and 5L) and DAPI staining (Table 3). Our data demonstrate that germ cell apoptosis is not required for gonad shrinking during prolonged starvation or gonad regeneration after fasting.

Angelo and van Gilst (2009) also reported that *ced-3(n1286)* caspase mutant animals were unable to produce progeny after 15 days of prolonged starvation and suggested that apoptosis was essential to maintain fertility after fasting [7]. We observed that neither wild-type nor *ced-3(n717 and n1286)* mutant animals produced any progeny after spending 15 days in ARD (N = 37, 39 and 42, respectively), even after they were crossed with wild-type males (N = 27, 29 and 30, respectively).

We quantified the progeny produced by well-fed and recovered *ced-3* animals (alleles *n717* and *n1286*) and compared the number to that in wild-type animals after spending 5 days in ARD. Andux and Ellis (2008) previously reported that *ced-3* mutant animals (with the *n718*, *n2439*, *n2921* alleles) produce fewer progeny and exhibit higher embryonic lethality than wild-type animals in control conditions [3]. Accordingly, we observed that the animals harboring the *ced-3* mutant alleles *n717* and *n1286* exhibited 40% fewer offspring on average than wild-type animals under control conditions (Fig 6A and Table 1). When we compared the number of progeny produced by recovered wild-type animals to that produced by recovered *ced-3* mutant animals, we observed that *ced-3* mutant animals produced 20–24% fewer progeny on average than recovered wild-type animals (Fig 6A and Table 1).

As reported by Andux and Ellis (2008), the embryonic lethality of *ced-3* mutant animals under normal conditions was higher than that of the wild-type (3.9-fold higher than the wild-type for the *ced-3(n717)* allele and 3.6-fold higher for *ced-3(n1286)*) ([3]; Fig 6B and Table 1). After ARD, *ced-3(n717)* mutant animals exhibited 1.9-fold higher embryonic lethality than recovered wild-type animals while *ced-3(n1286)* mutant animals presented 3.2-fold higher embryonic lethality than recovered wild-type animals (Fig 6B and Table 1).

To counteract the effect of ARD on sperm, we quantified the brood size and embryonic lethality of *ced-3(n717)* mutant animals exposed to ARD and subsequently crossed with well-fed wild-type males. We found that the fertility of recovered *ced-3(n717)* mutant animals crossed with well-fed males improved considerably (79% of that in the corresponding control) even though they did not reach the control brood size (Fig 6C). In control conditions, mated *ced-3(n717)* mutant animals exhibited higher embryonic lethality than mated wild-type animals (7-fold) but their embryonic lethality did not increase further after ARD (8-fold) (Fig 6D and Table 1). Our results confirmed that apoptosis is important to maintain oocyte quality under control conditions ([3] and this work). We also observed that apoptosis is important for fertility and to preserve oocyte quality during ARD; however, it is not essential, as previously claimed by Angelo and van Gilst (2009) [7].



**Fig 5. Apoptosis is not required to reduce gonad size during the oogenic germline starvation response.** Nomarski images of gonads of mid-L4 wild-type animal and animals with the three different alleles of *ced-3* (A, D, G and J).

Nomarski images of gonads of wild-type and *ced-3* mutant animals starved for 5 days (B, E, H and K). Nomarski images of gonads of wild-type and *ced-3* animals that spent 5 days under starvation and were recovered on food for 3 days (C, F, I and L). In all images one gonad arm is outlined in white; the distal gonad is marked with an asterisk (\*); the arrow points to the proximal gonad. Scale bar = 20  $\mu$ m. (M) Germ cell nuclei per gonad arm scored in wild-type animals and two *ced-3* defective mutants by DAPI staining. The graph shows the average number of germ cell nuclei per gonad arm in control conditions (solid lines) and during starvation (dotted lines)  $\pm$ SEM at each point.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g005>

### High germ cell apoptosis continues during ARD

We investigated germ cell apoptosis dynamics during ARD. To quantify apoptosis, we used a germ cell apoptosis reporter *P<sub>lim-7</sub>ced-1::gfp*, which is expressed in the sheath cells and surrounding germ cell corpses [21]. In well-fed *ced-1::gfp* animals, the number of corpses per gonad arm increased with age and peaked at day 4 post-mid-L4 (16.3  $\pm$  0.55 germ cell corpses per gonad arm), with an average of 9.65  $\pm$  0.98 germ cell corpses per gonad over the following

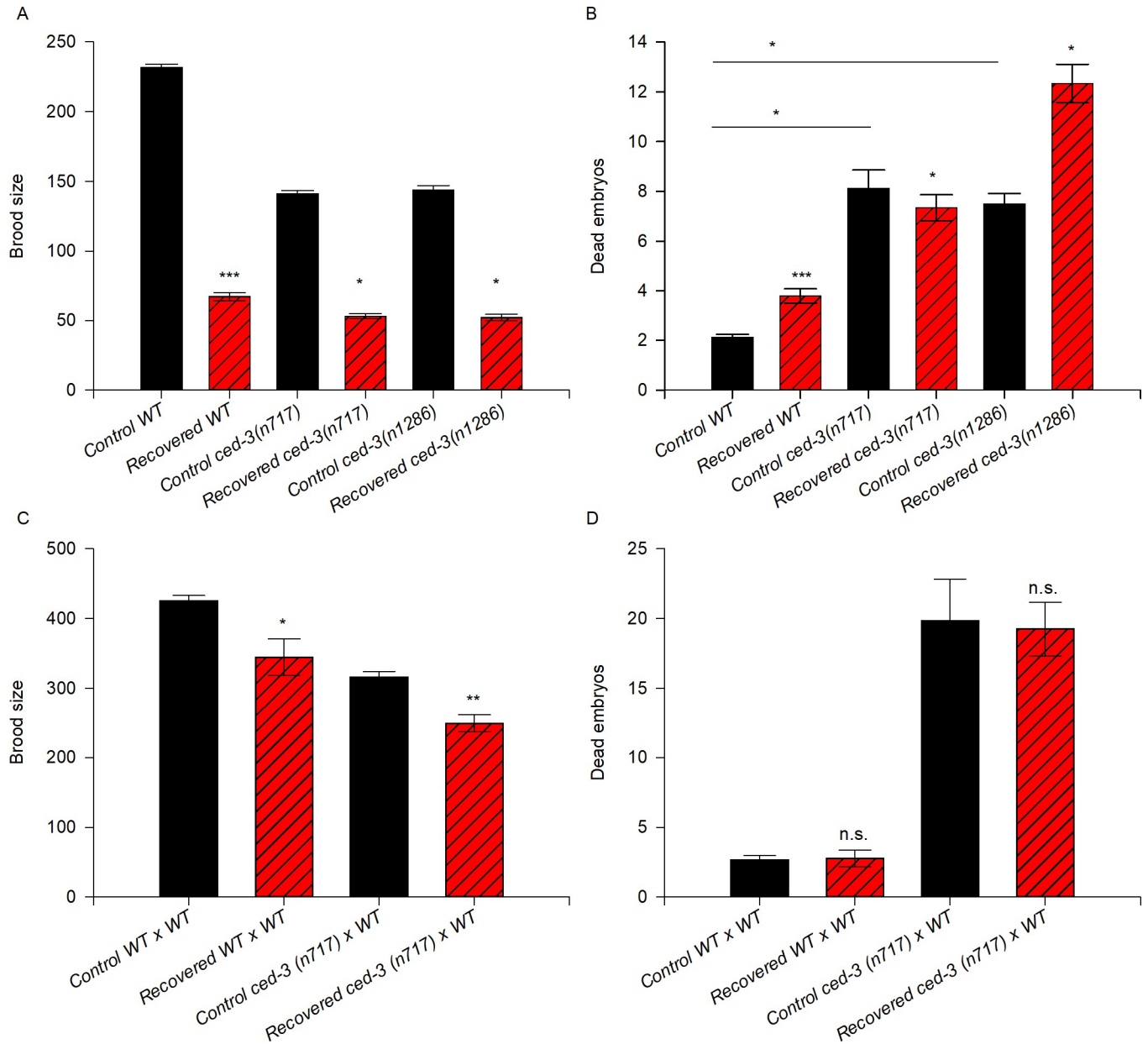
**Table 3. Germ cells per gonad arm under control, starvation and recovered conditions.**

		WT									
Days post mid-L4		Control		N	Starvation		N	Recovering		N	
0		150.4 $\pm$ 2.5	36	150.4 $\pm$ 2.5	36	339.2 $\pm$ 3.5	25				
1		346.1 $\pm$ 2.0	35	95.1 $\pm$ 1.0	36						
2		431.3 $\pm$ 1.9	35	74.5 $\pm$ 0.9	36						
3		475.6 $\pm$ 2.7	25	45.6 $\pm$ 0.7	35						
4		485.3 $\pm$ 1.4	30	35.0 $\pm$ 0.6	36						
5		463.7 $\pm$ 4.7	24	35.5 $\pm$ 0.9	35						
		<i>ced-3(n717)</i>									
Days post mid-L4		Control	N	Starvation	N	Recovering	N				
0		145.5 $\pm$ 4.6	35	145.5 $\pm$ 4.6	35	342.9 $\pm$ 2.8	30				
1		340.9 $\pm$ 1.9	36	93.7 $\pm$ 1.9	35						
2		427.8 $\pm$ 1.7	36	78.9 $\pm$ 1.2	35						
3		475.8 $\pm$ 2.7	24	46.1 $\pm$ 0.8	35						
4		484.6 $\pm$ 2.4	25	38.6 $\pm$ 0.8	36						
5		454.7 $\pm$ 3.7	25	38.1 $\pm$ 0.8	35						
		<i>ced-3(n1286)</i>									
Days post mid-L4		Control	N	Starvation	N	Recovering	N				
0		153.7 $\pm$ 2.1	36	153.7 $\pm$ 2.1	36	342.6 $\pm$ 2.7	30				
1		351.8 $\pm$ 1.8	25	96.8 $\pm$ 1.3	35						
2		427.1 $\pm$ 3.3	26	78.8 $\pm$ 0.9	36						
3		471.2 $\pm$ 3.9	25	46.1 $\pm$ 0.6	35						
4		479.7 $\pm$ 2.2	25	37.7 $\pm$ 1.0	36						
5		459.2 $\pm$ 2.9	25	36.7 $\pm$ 0.8	35						

The gonads of animals under control conditions, starvation and recovery were dissected, stained and scored for the number of germ cells using epifluorescence microscopy. Control animals were placed in NGM plates seeded with OP50 and transferred to fresh plates daily until they ceased laying eggs. For starvation conditions, animals were placed in NGM plates unseeded and transferred to fresh plates daily, similar to the control animals. Animals were picked and dissected. The dissected gonads were stained with DAPI, and the number of germ cells per gonad arm was scored under fluorescence microscopy. For recovery, animals that had spent 5 days in ARD were transferred to plates seeded with OP50 for 3 days. Animals were then picked and dissected.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t003>





**Fig 6. Apoptosis is as important to preserve oocyte quality after ARD as in control conditions but it is not essential for recovering fertility after ARD.** (A) The graph represents the brood size produced by control (black) and recovered (red) wild-type and *ced-3* mutant animals. Mid-L4 hermaphrodites of the different genetic backgrounds were allowed to self-fertilize (black) or were starved for 5 days and then refed (red). The data represent the mean brood size ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the t-test (WT control vs. recovered) or by ANOVA on ranks and Dunn's test for multiple comparisons. (B) The number of dead embryos within the progeny of self-fertilizing wild-type and *ced-3* mutant animals under control (black) and recovered conditions (red) was calculated. The data represent the mean number of dead embryos ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test ( $P \leq 0.001$ ) (WT control vs. recovered) or by ANOVA on ranks and Dunn's test for multiple comparisons. (C) The graph represents the brood size produced by mating control (black) and recovered (red) animals of the different genetic backgrounds. Well-fed mid-L4 hermaphrodites were individually mated with 4 well-fed wild-type males overnight, then transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (black). For the recovered animals, mid-L4 hermaphrodites were starved for 5 days, then recovered on food and immediately mated with 4 well-fed 1-day-old wild-type males overnight and transferred individually to fresh plates until they ceased laying eggs (red). The data represent the mean brood size ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test ( $P \leq 0.024$ ) in wild-type populations and by the Student's t-test ( $P \leq 0.001$ ) in *ced-3*(n717) populations. (D) The number of dead embryos within the progeny produced by mating animals of the different genetic backgrounds under control (black) and recovered conditions (red) to well-fed wild-type males was calculated. Data represent the mean number of dead embryos ( $\pm$ SEM) per animal. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney rank sum test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g006>

days (Table 4). After one day of starvation, we observed an increase of 1.6-fold in apoptosis compared to control conditions, with an average of 4.9 germ cell corpses per gonad arm over the following days (Fig 7A and Table 4).

It is remarkable that germ cell apoptosis continues and is very active during prolonged starvation particularly because germ cell proliferation stops after 30 minutes of fasting [9] and the gonad is completely shrunken after the fifth day. To quantify the proportion of germ cells that were being eliminated by apoptosis during starvation versus those that remained in the starved gonad, we determined the number of germ cells per gonad arm in dissected gonads under control and fasting conditions, using DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole) staining. We found that under control conditions the number of germ cells per gonad arm increased gradually with age until day 4 post-mid-L4, after which the numbers of germ cells per gonad arm were similar (approx. 534.2 germ cells/gonad arm) (Fig 7B and Table 5). During prolonged-starvation, the germ cell number decreased gradually until reaching the minimal number at day 6 post-mid-L4, then remained almost unchanged over the course of the experiments (38.1 germ cells/gonad arm on average) (Fig 7B and Table 5).

We quantified the percentage of germ cells eliminated by apoptosis (Table 4) and compared it to the number of germ cells present in the gonad (Table 5) under control conditions and during starvation. We found that under control conditions, approximately 1.91% of the total number of germ cells appeared as germ cell corpses at each time point. However, during starvation the percentage of germ cell corpses was considerably higher at each point compared to the control conditions (average of 9.27% of the total number of germ cells) (Fig 7C). Our data show that germ cell apoptosis increases up to 4.8-fold during the oogenic germline starvation response and continues under these conditions.

To test whether germ cell corpse clearance is affected during starvation, we quantified germ cell corpse engulfment in animals exposed to 1–5 days of starvation by time-lapse microscopy (see methods). We found that the timing of germ cell corpse clearance was not extended during the first 5 days of prolonged starvation compared to the control (approx. 55 minutes (prolonged starvation), similar to the control time of 58 minutes) (Fig 7D, Table 6). Our results demonstrate that the process of germ cell corpse engulfment remains active during prolonged starvation.

Germ cell apoptosis can be triggered by DNA damage or meiosis defects via CEP-1, the *C. elegans* p53 homologue [21–24]. *cep-1* mutant animals do not show increased germ cell apoptosis after DNA damage or meiosis defects. To test whether the germ cell apoptosis during prolonged starvation is regulated by DNA damage or meiosis defects, we quantified germ cell apoptosis in a *cep-1* mutant background [25]. We starved mid-L4 *ced-1::gfp* and *cep-1(gk138); ced-1::gfp* animals for 5 days and scored the number of germ cell corpses and the number of germ cell nuclei per gonad arm daily (see Methods). *ced-1::gfp* and *cep-1(gk138);ced-1::gfp* animals showed similar germ cell apoptosis levels in control and starvation conditions (Fig 8A), and the number of germ cell nuclei was progressively reduced during starvation (Fig 8C). Our results indicate that the proportion of germ cells eliminated by cell death was similar in the two genetic backgrounds (Fig 8E) suggesting that the increased germ cell apoptosis observed during ARD is not a consequence of DNA damage or defects during meiosis.

In our previous work, we found that *lin-35/Rb* is essential for inducing germ cell apoptosis during starvation [26]. Hence, we asked whether the high germ cell death triggered during ARD depended on *lin-35* and we found that it partially did. To demonstrate this, we subjected *ced-1::gfp* (control) and *lin-35(n745);ced-1::gfp* animals to 5 days of starvation beginning in the mid-L4 stage and determined germ cell apoptosis dynamics during ARD (Fig 8B). As previously reported [27], we found that *lin-35(n745);ced-1::gfp* mutant animals showed lower germ cell apoptosis compared to *ced-1::gfp* animals in well-fed conditions (Fig 8B). As previously

Table 4. Germ cell apoptosis dynamics under control and starvation conditions.

Days post mid-L4	<i>ced-1::gfp</i>		N	Starvation		N	Significance	N
	Control							
0	0.0 ±	0.00	141	0.0 ±	0.01	140	n.s.	140
1	5.4 ±	0.21	139	8.8 ±	0.20	140	**	140
2	11.4 ±	0.26	129	6.5 ±	0.15	141	**	141
3	13.6 ±	0.34	111	6.3 ±	0.24	129	**	129
4	16.3 ±	0.55	103	5.6 ±	0.18	123	**	123
5	13.7 ±	0.40	111	5.2 ±	0.16	143	**	143
6	11.6 ±	0.26	121	4.5 ±	0.10	135	**	135
7	8.5 ±	0.22	110	4.2 ±	0.11	129	**	129
8	8.2 ±	0.25	119	4.1 ±	0.10	144	**	144
9	7.9 ±	0.30	76	3.9 ±	0.11	124	**	124
10	8.0 ±	0.21	72	3.6 ±	0.08	105	**	105

The number of germ cell corpses was scored using *ced-1::gfp* animals under epifluorescence microscopy. Control mid-L4 hermaphrodites were placed in NGM plates seeded with OP50 and transferred to fresh plates daily until they ceased laying eggs; the animals were picked daily for up to 10 days and mounted with 20  $\mu$ l of 0.01% tetramisole in M9 on 2% agarose pads. For starvation conditions, mid-L4 animals were placed in unseeded NGM plates and transferred to fresh plates daily similar to the control animals; the animals were picked daily for up to 10 days and mounted with 20  $\mu$ l of 0.01% tetramisole in M9 on 2% agarose pads. n.s. non significant

\*  $P \leq 0.05$

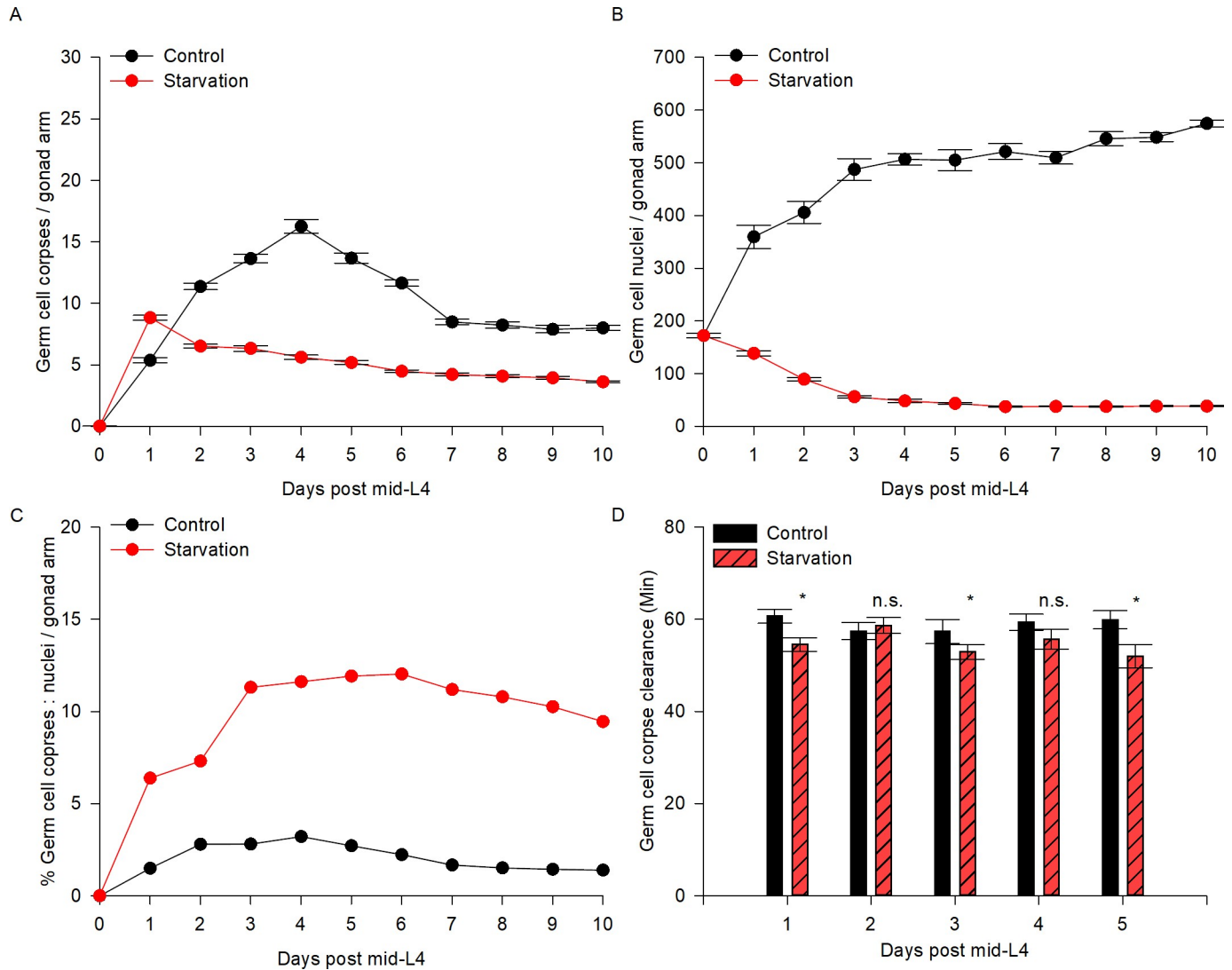
\*\*  $P \leq 0.01$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t004>

reported [26], we also observed that after 24h of starvation, *lin-35(n745);ced-1::gfp* animals do not increase their number of germ cell corpses (Fig 8B). However, it is important to remember that during prolonged starvation the number of germ cells progressively decreased (Fig 8D), which could explain why we observed lower apoptosis levels in the *lin-35* mutant background on subsequent days (Fig 8B). We calculated the proportion of germ cells eliminated by apoptosis versus the germ cell number as we did previously (Fig 7C) and observed that germ cell apoptosis increased in the *lin-35* mutant background although it never reach control levels (Fig 8F). We concluded that *lin-35* is partially responsible for germ cell apoptosis induction during ARD, but there is an unknown mechanism that also triggers germ cell apoptosis under these conditions.

### The gonads of *daf-2* deficient animals shrink in the presence of food similar to the oogenic germline starvation response

In an attempt to reveal the molecular mechanisms that govern the oogenic germline starvation response, we subjected mid-L4 hermaphrodites of different genetic backgrounds to starvation for 5 days, followed by refeeding for 3 days, to test the capacity of their gonad to shrink and regenerate. We chose the gene candidates based on their known roles in the stress response or in germ cell proliferation. We tested the *C. elegans* retinoblastoma ortholog *lin-35/Rb* because it is essential for inducing apoptosis in short-term starvation [26] and partially required for inducing germ cell apoptosis in ARD (this work). We tested the *daf-16/FoxO* transcription factor due to its implication in the regulation of dauer diapause [28, 29]; the *skn-1/NrF* and *pha-4/FoxA* transcription factors due to their roles in dietary restriction and other types of stress responses [30]; the *alg-1* Argonaut ortholog due to its role in microRNAs pathway regulation and germ cell proliferation [13]; the *rsk-1* putative ribosomal protein S6 kinase, which has been implicated in resistance to starvation and, together with the eIF4E/*ife-1*, which regulates the germline cell cycle progression during development [31, 32]; the gene encoding the



**Fig 7. Germ cell apoptosis is increased and continues during ARD.** (A) The *ced-1::gfp* transgene was used to visualize the number of germ cell corpses per gonad arm (see [Materials and methods](#)) for 10 days in control (black line) and starvation conditions (red line). The average number of germ cell corpses per gonad arm is shown with SEM. (B) DAPI staining was used to quantify the number of germ cells per gonad arm (see [Materials and methods](#)) for 10 days in control (black line) and starvation (red line) conditions. The average number of germ cells per gonad arm is shown with SEM. (C) The percentage of germ cell corpses among the total germ cells per gonad arm in fed animals (black line) and during starvation (red line) was calculated. (D) The time of germ cell corpse clearance was recorded every day after 1–5 days post-mid-L4 (see [Materials and methods](#)) in control (black bars) and starvation (red bars) conditions.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g007>

TIS11-like zinc-finger-containing protein *gla-3* mutant, which exhibits increased germline apoptosis [33]; and the p53 *C. elegans* ortholog *cep-1*, which is required for the DNA damage response [34]. None of the tested genes were required to shrink the gonad during the oogenic germline starvation response or to regenerate upon refeeding (Table 7).

The insulin/insulin receptor signaling (IIS) pathway has been established as a link between nutrient availability and homeostasis in species ranging from worms to humans. This pathway is maintained through the activity of insulin-like molecules that bind to the insulin receptor. In *C. elegans*, more than 40 peptides related to insulin bind to the insulin receptor/DAF-2 to negatively regulate the DAF-16/FoxO transcription factor. Thus, mutations in the insulin receptor/DAF-2 promote the transcription of target genes through the activity of DAF-16/

**Table 5. The number of germ cells per gonad arm under control and starvation conditions.**

Days post mid-L4	<i>ced-1::gfp</i>			N	Starvation			N
	Control							
0	172.2 ±	4.57	45	172.2 ±	4.57	45		
1	359.6 ±	21.88	15	138.4 ±	4.72	42		
2	406.1 ±	21.23	15	89.4 ±	3.04	30		
3	487.3 ±	20.82	17	56.0 ±	1.83	31		
4	506.8 ±	10.94	15	48.4 ±	3.02	27		
5	505.1 ±	19.53	18	43.6 ±	1.37	35		
6	521.3 ±	14.82	18	37.2 ±	1.18	30		
7	509.6 ±	11.76	16	37.8 ±	0.75	24		
8	545.9 ±	13.44	17	37.8 ±	1.04	38		
9	548.6 ±	8.19	17	38.4 ±	1.19	34		
10	574.7 ±	6.56	15	38.4 ±	1.19	38		

The gonads of animals under control conditions and starvation were dissected, stained and scored for the number of germ cells using epifluorescence microscopy. Control animals were placed in NGM plates seeded with OP50 and transferred to fresh plates daily until they ceased laying eggs. For starvation conditions, animals were placed in unseeded NGM plates and transferred to fresh plates daily, similar to the control animals. Animals were picked and dissected. The dissected gonads were stained with DAPI and the number of germ cells per gonad arm was scored under fluorescence microscopy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t005>

FoxO to cope with nutrient scarcity and other types of stress [35]. This pathway regulates entry to dauer diapause, a well-studied diapause stage in *C. elegans* that occurs between larval stages L1-L2 in response to different cues, including a lack of food [36].

To test the role of *daf-2* in the oogenic germline starvation response, we used the temperature-sensitive mutant *daf-2(e1370)* [37]. Synchronous populations of wild-type or *daf-2(e1370)* animals were grown from hatching to mid-L4 at the permissive temperature (15°C) (Fig 9A and 9D, respectively) and then transferred to the restrictive temperature (25°C) for 5 days in the absence of food. We found that the gonads of *daf-2(e1370)* mutant animals grown at the restrictive temperature (25°C) and starved for 5 days were able to shrink similarly to those of the wild-type animals (Fig 9E and 9B; Table 7) suggesting that *daf-2* is not required for the oogenic germline starvation response.

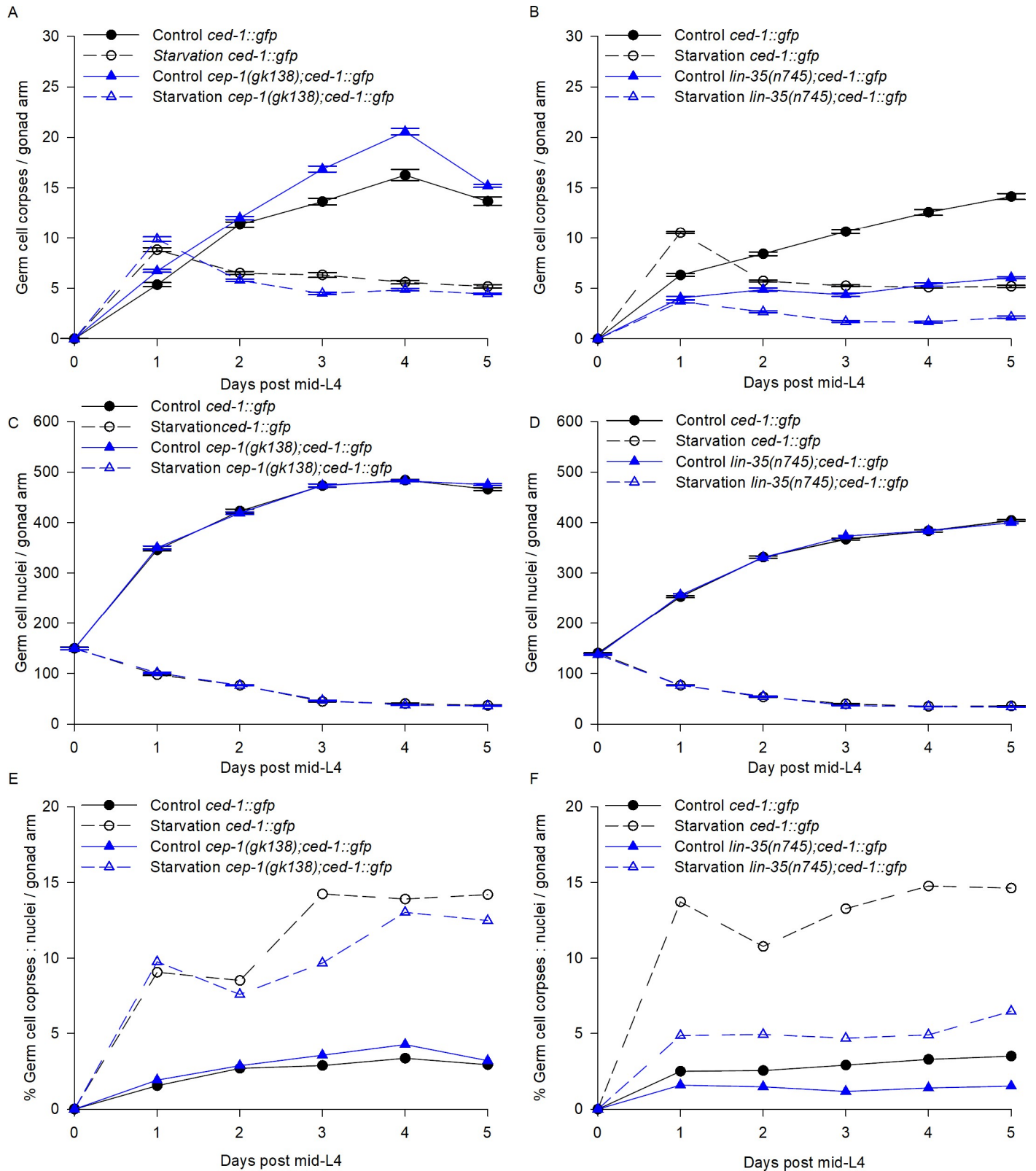
**Table 6. Germ cell corpse clearance under control and starvation conditions.**

Days post mid-L4	WT			N	Starvation			N
	Control							
0	No corpses detected			25	No corpses detected			25
1	60.7 ±	1.51	9	54.6 ±	1.47	*	9	
2	57.4 ±	1.89	9	58.7 ±	1.74	n.s.	9	
3	57.3 ±	2.63	9	52.9 ±	1.61	*	9	
4	59.4 ±	1.74	8	55.6 ±	2.15	n.s.	8	
5	59.9 ±	1.97	8	52.0 ±	2.50	*	8	

The timing of germ cell corpse clearance under control and starvation conditions was scored using a long-term immobilization technique and Nomarski microscopy at 60x magnification. Control mid-L4 hermaphrodites were placed in NGM plates seeded with OP50, picked daily for up to 5 days and immobilized with 0.5 µl of a polystyrene bead suspension on 10% agarose pads to observe an individual germ cell corpse and determine its clearance time in minutes. For starvation conditions, mid-L4 hermaphrodites were placed in unseeded NGM plates, picked daily for up to 5 days and then immobilized with 0.5 µl of a polystyrene bead suspension on 10% agarose pads to observe an individual germ cell corpse and determine its clearance time in minutes. The Holm-Sidak test for comparisons within groups was used. n.s. = non significant

\* P < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t006>



**Fig 8. Germ cell apoptosis is p53 independent and partially regulated by *lin-35/Rb* during ARD.** (A-B) *cep-1(gk38);ced-1::gfp*, *lin-35(n745);ced-1::gfp* and *ced-1::gfp* animals were used to visualize the number of germ cell corpses per gonad arm (see Materials and methods) for 5 days in control (solid lines) and starvation conditions (dotted lines). The average number of germ cell corpses per gonad arm is shown with the SEM. (C-D) DAPI staining was used to quantify the number of

germ cells per gonad arm (see [Materials and methods](#)) for 5 days in control (solid lines) and starvation conditions (dotted lines). The average number of germ cells per gonad arm is shown with the SEM. (E-F) The percentage of germ cell corpses among the total germ cells per gonad arm in fed animals (solid lines) and during starvation (red lines) conditions was calculated.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g008>

Unexpectedly, we observed that the well-fed control mid-L4 *daf-2* mutant animals grown at the restrictive temperature for 5 days exhibited shrunken gonads in the presence of food ([Fig 9F](#)) when their gonads were compared to those of the wild-type animals ([Fig 9C](#)). We decided to quantify the germ cell number per gonad arm at the mid-L4 stage and 5 days after IIS pathway inactivation in the presence of food using *daf-2(e1370)* mutant animals and the wild-type as a control. We found that in wild-type animals, the germ cell number increased from  $140.6 \pm 1.2$  at mid-L4 to  $380.8 \pm 3.4$  5 days post-mid-L4. However, *daf-2(e1370)* mutant animals did not show the same increase; instead, the number of germ cell nuclei per gonad arm was reduced from  $137.6 \pm 1.0$  at mid-L4 to  $77.2 \pm 1.5$  5 days post-mid-L4 ([Fig 9I](#) and [Table 8](#)).

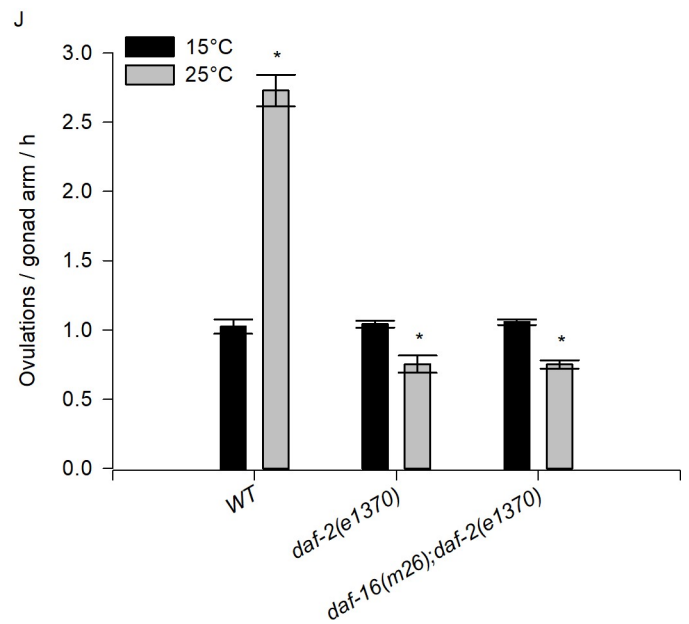
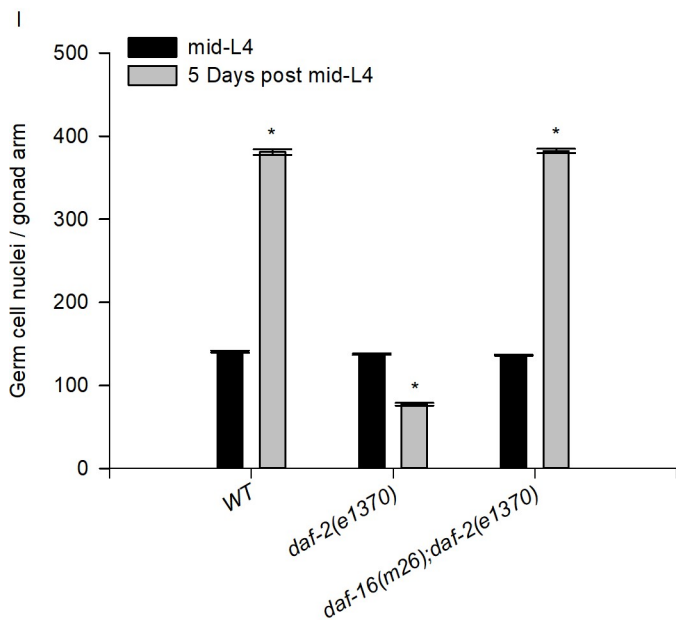
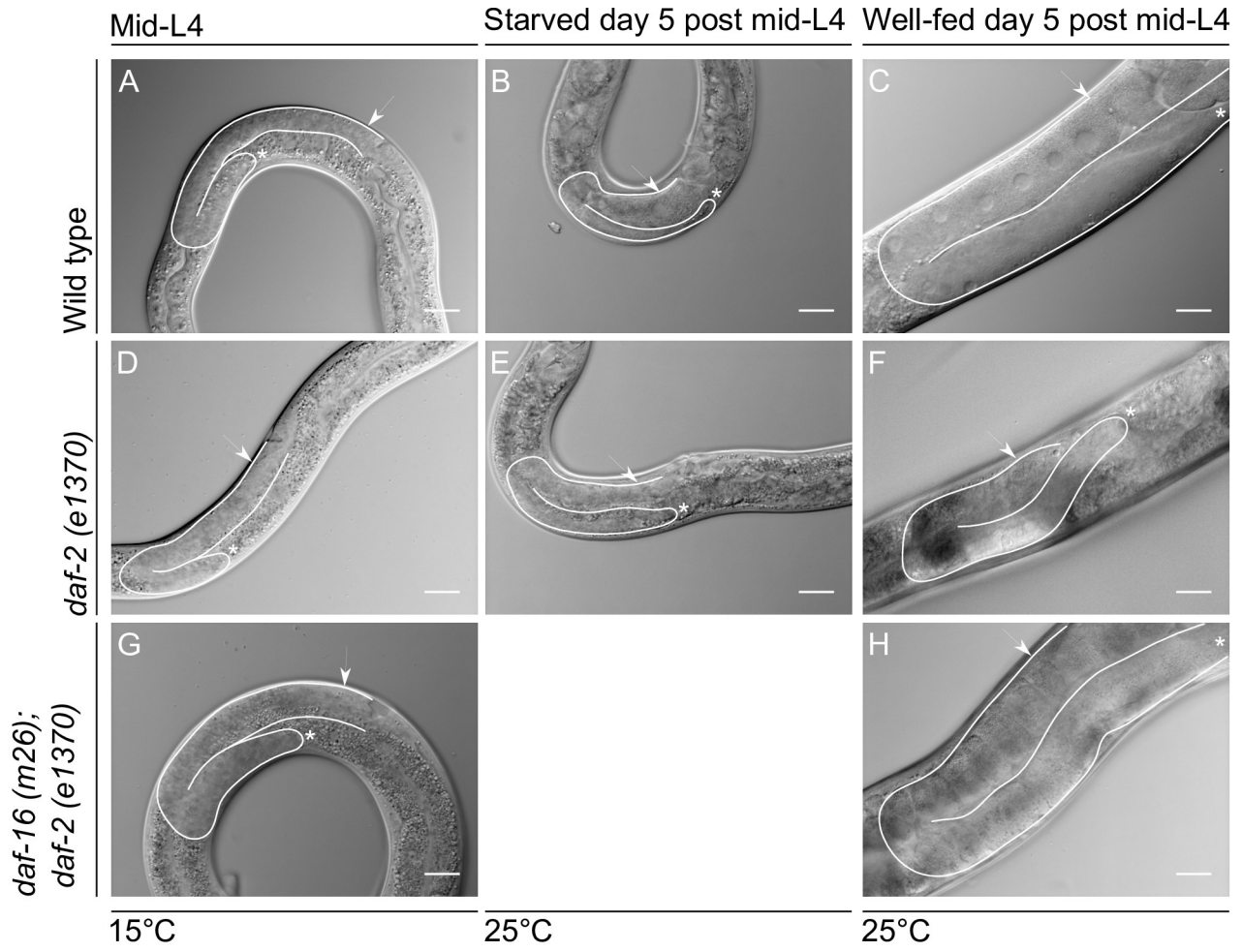
The transcription factor *daf-16/FoxO* is activated when the *daf-2* signal is absent [[38](#)]. As we previously showed, *daf-16* is not required to shrink the gonad during ARD, but we tested whether gonad shrinking induced in the absence of *daf-2* in the presence of food requires *daf-16*. To test this, *daf-16(m26);daf-2(e1370)* double mutant animals were grown from hatching to mid-L4 on food at the permissive temperature and then shifted to 25°C for 5 days ([Fig 9G and 9H](#)). We observed that the gonads of animals lacking *daf-2* did not shrink in the presence of food when *daf-16* was not present. We quantified the germ cell number in this double mutant genetic background and found that the number of germ cells increased from  $136.4 \pm 0.7$  at mid-L4 to  $382.2 \pm 2.5$  5 days after IIS pathway inactivation in the presence of food ([Fig 9I](#) and [Table 8](#)). These results suggest that inactivation of *daf-2* in well-fed animals might trigger a mechanism similar to ARD that requires *daf-16/FoxO*.

**Table 7. The oogenic germline starvation response in different genetic backgrounds.**

Genotype	Relevant function for this study	References	Human ortholog	Starvation response	Re-feeding
WT	Control	[7, 8]	-	Shrunken gonad	Completely recovered
<i>ced-3(n1286)</i>	The only effector caspase	[7, 20]	Isoform 1 Caspase-2	Shrunken gonad	Completely recovered
				Not required	Not required
<i>ced-3(n717)</i>	The only effector caspase	[7, 20]	Isoform 1 Caspase-2	Not required	Not required
<i>ced-3(ok2734)</i>	The only effector caspase		Isoform 1 Caspase-2	Not required	Not required
<i>lin-35(n745)</i>	Causes starvation-induced germline apoptosis	[26]	Rb	Not required	Not required
<i>daf-16(mgDf50)</i>	Regulates dauer diapause	[28]	FoxO	Not required	Not required
<i>skn-1(zu135)</i>	Dietary restriction and other stresses response	[30]	Nrf	Not required	Not required
<i>pha-4(zu225)</i>	Dietary restriction and other stresses response	[30]	FoxA	Not required	Not required
<i>alg-1(gk214)</i>	miRNA pathway and proliferation	[13]	Argonaut	Not required	Not required
<i>rsk-1(ok1255)</i>	Increases resistance to starvation	[31]	Putative ribosomal protein S6K	Not required	Not required
<i>ife-1(bn127)</i>	Regulates germline progenitor number	[32]	eIF4e	Not required	Not required
<i>gla-3(op212)</i>	Increased germline apoptosis	[33]	-	Not required	Not required
<i>cep-1(gk138);ced-1::gfp</i>	Regulates DNA-damage-induced germline apoptosis	[34]	p53 transcription factor	Not required	Not required

Hermaphrodites from the different backgrounds were selected at the mid L4, starved for 5 days and observed daily under Nomarski microscopy to compare their gonad size to that under the oogenic germline starvation response using WT hermaphrodites as a control. At day 5, the hermaphrodites were re-fed for 3 days and observed daily under Nomarski microscopy to determine their gonad recovery, using WT hermaphrodites as a control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t007>





**Fig 9. Long-term IIS pathway inactivation mimics the entry to ARD in the presence of food.** Mid-L4 wild-type, *daf-2(e1370)* and *daf-16(m26); daf-2(e1370)* larvae were fed until mid-L4 at 15°C (A, D and G, respectively). Wild-type and *daf-2(e1370)* mid-L4 larvae starved for 5 days at 25°C (B, E). Nomarski images of well-fed wild-type, *daf-2(e1370)* and *daf-16(m26); daf-2(e1370)* animals grown until mid-L4 at 15°C, then upshifted to 25°C for 5 days (C, F and H). In all images one gonad arm is outlined in white; the distal gonad is marked with an asterisk (\*); and the arrow points to the proximal gonad. Scale bar = 20 µm. (I) Quantification of the number of germ cell nuclei per gonad arm during prolonged IIS pathway inactivation. Animals were grown from L1 to the mid-L4 stage at the permissive temperature and then upshifted to the restrictive temperature for 5 days. Dissected gonads were stained using DAPI in each condition. The graph shows the average number of germ cell nuclei per gonad arm (±SEM). (J) Ovulation rate determination during IIS pathway inactivation. Animals were grown from L1 to the mid-L4 stage at the permissive temperature and then either upshifted to the restrictive temperature or maintained in the permissive temperature for 1 day. Animals were individually picked and scored for the number of embryos *in utero*, then placed in plates for 4 h and finally scored for the number of embryos *in utero*. The ovulation rate was calculated as follows: (final number of embryos—initial number) / (2 \* 4 h). The graph shows the average number of ovulations per gonad arm per hour (±SEM).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.g009>

To test whether IIS pathway inactivation could mimic entry to ARD even in the presence of food, we determined the ovulation rate in 1-day-old wild-type and *daf-2(e1370)* and *daf-16(m26); daf-2(e1370)* mutant animals grown from L1 to mid-L4 at 15°C that were late upshifted to 25°C in the presence of food. It has been reported that ARD causes a delay in the ovulation rate [8]. Wild-type animals ovulate more frequently when upshifted to 25°C (N = 30) (Fig 9J). In contrast, *daf-2(e1370)* animals showed no increase in the ovulation rate when upshifted to 25°C (N = 33). However, *daf-16(m26); daf-2(e1370)* mutant animals continued to exhibit a slowed ovulation rate (N = 33) (Fig 9J).

Another feature of the oogenic germline starvation response is that the ovulation rate is limited by the rate of oocyte growth [8]. Starved animals almost always form only a single oocyte at a time in each gonad arm ([8], Figs 1F and 9B). However, gonads from *daf-2(e1370)* animals grown at 25°C in the presence of food did not exhibit this phenotype (Fig 9E). We concluded that DAF-2 might participate in the oogenic germline response but that it is not the only signal that participates in this phenomenon. It is also possible that because the *daf-2* mutation results in pleiotropic phenotypes, it is not easy to study its role in the oogenic germline response.

## Discussion

Angelo and van Gilst (2009) reported a novel type of adult reproductive diapause for the first time while studying reproduction when nutrients are limited. They showed that crowded populations of mid-L4 larval stage animals subjected to starvation delay their reproductive cycle and are able to live for up to 30 days without food. Furthermore, when conditions are restored, these animals resume their reproductive cycle and live out a normal lifespan. During ARD, the gonad experiences reversible germ cell loss and size reduction; when animals are returned to food, the gonad regenerates in terms of both germ cell number and size [7].

Later, Seidel and Kimble (2011) studied ARD in depth. They showed that germline shrinkage occurs in all oogenic germlines, from the mid-L4 to adult stages, and practically all shrunken gonads regenerate upon refeeding if bagging is prevented. Seidel and Kimble (2011)

**Table 8. Quantification of germ cell number per gonad arm in different genetic backgrounds on food.**

	mid-L4		N 15°C		5 Days post mid-L4					
					N 25°C		N 25°C		N	
WT	140.6 ±	1.2	37	339.0 ±	2.0	35	380.8 ±	3.4	20	
<i>daf-2(e1370)</i>	137.6 ±	1.0	42	337.0 ±	1.4	44	77.2 ±	1.5	41	
<i>daf-16(m26); daf-2(e1370)</i>	136.4 ±	0.7	43	342.3 ±	1.7	43	382.2 ±	2.5	22	

The gonads of animals were dissected, stained and scored for the number of germ cells using epifluorescence microscopy. Animals were grown in NGM plates seeded with OP50 from hatching to mid-L4 at 15°C and then incubated on food at 15°C or 25°C for 5 days. Animals were picked and dissected. The dissected gonads were stained with DAPI and the number of germ cells per gonad arm was scored under fluorescence microscopy.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218265.t008>

showed that embryo production continues during prolonged starvation, and it is possible to distinguish one or two viable-looking embryos within the uterus, which are a product of recent fertilizations, indicating that oocyte production and fertilization are active but considerably delayed in starved animals; however, embryo viability is severely impaired during starvation. They also showed that population density is not a prerequisite for inducing or maintaining the starvation response in starved animals and suggested that this phenomenon is not a form of diapause [8].

Despite not supporting the existence of the ARD proposed by Angelo and van Gilst (2009), Seidel and Kimble (2011) coined the term “oogenic germline starvation response” referring to the germline plasticity controlled by nutritional cues [8]. They also reported that starvation causes reversible cell-cycle quiescence in adult germline stem cells, reducing the number of M-phase cells under 30 minutes of starvation and rapidly re-establishing their number upon refeeding [9].

Our results support the following conclusions: Long-term exposure to fasting compromises the animals' reproductive capacity, and the oogenic germline starvation response prevents oogenic germ cells from undergoing prolonged arrest in diakinesis by slowing oocyte production. In contrast to Angelo and van Gilst (2009), we demonstrated that apoptosis is not the cause of gonad shrinkage during ARD and that it is not essential for fertility recovery after ARD. Instead, we propose that once germ cell proliferation stops, ovulation contributes to gonad shrinking during the oogenic germline starvation response. Germ cell apoptosis is increased during ARD and continues during prolonged starvation. Germ cell apoptosis during ARD is not induced by DNA damage or chromosome segregation errors during meiosis but is partially regulated by *lin-35/Rb*. We also found that during ARD an unknown mechanism triggers germ cell apoptosis. Finally, we suggest that inactivation of the IIS signaling pathway triggers gonad shrinking in the presence of food that might resemble the oogenic germline response.

### ARD compromises fertility by affecting oogenic germ cells

In the present work, we showed that fertility is affected after ARD (Figs 2, 3 and 6). Although recovered animals exhibit restoration of fertility upon refeeding, none of the genetic backgrounds tested (N2, *fog-1*, *fog-2* and *ced-3*) produced broods that were as large as those of the controls by self-fertilization or mating. Angelo and van Gilst (2009) proposed that the fecundity of self-fertilizing animals depended on the survival of functional sperm during starvation [7]. However, we observed that, at least during the first 5 days of starvation, the sperm number remained unchanged.

Several authors have used embryonic lethality to reflect oocyte quality [3, 39]. Our results showed that animals produce more dead embryos when they use their self-sperm to fertilize oocytes after recovery from 5 days of starvation than their respective controls (Figs 2 and 6). We showed that recovered self-fertilizing hermaphrodites produce dead embryos during the entire reproductive period (Fig 2). However, recovered *fog-1(q253)* and *fog-2(q71)* females produced the majority of dead embryos during the first two days after mating (Fig 3), which suggests that the self-sperm exposed to starvation and used to fertilize oocytes in wild-type animals had been compromised. Moreover, when well-fed male sperm were provided, the oogenic germ cells produced during starvation were prone to produce dead embryos after fertilization. Our results suggest that the self-fertilizing capacity of hermaphrodites is not only compromised by the sperm number, but also by oogenic germ cell exhaustion after ARD. It is worth noting that the effects of ARD on sperm capacity remain unclear. Further studies are needed to determine the effect of ARD on sperm quality.

## Oogenesis arrest is prevented by the oogenic germline starvation response

In the *C. elegans* germline, the presence of food and sperm promotes meiotic progression and oogenesis. Sperm depletion causes prolonged diakinesis arrest in the proximal gonad due to oocyte stacking, and starvation halts meiotic progression in the pachytene region [40]. In replete conditions and the presence of sperm, hermaphrodites ovulate every ~20 minutes per gonad arm, while during ARD, hermaphrodites exhibit slowed oogenesis and produce one oocyte at a time, and the next oocyte production starts once the fully grown oocyte is ovulated, which occurs approx. every ~8 h per gonad arm, regardless of the presence of sperm [8]. The oocytes that experience longer arrest in diakinesis are more likely to produce dead embryos [3]. We demonstrated that at day 5 post-mid-L4, in the presence of food, *fog-1* and *fog-2* animals actively produced and stacked as many oocytes as possible, while under starvation conditions *fog-1* and *fog-2* animals produced and stacked fewer oocytes within their gonads (Fig 4). When mated, well-fed 6-day-old *fog-1* and *fog-2* animals produced smaller broods and more dead embryos than *fog-1* and *fog-2* animals recovered from starvation, suggesting that slowing oogenesis during starvation is a beneficial mechanism for preserving the reproductive capacity and oocyte quality.

## Apoptosis is important to preserve oocyte quality during ARD; however, it is not essential for fertility and gonad shrinking

In this study, we demonstrated that *ced-3* mutant animals respond to starvation by shrinking their gonads during ARD and partially recover their fertility upon refeeding (Figs 5 and 6). In contrast to Angelo and van Gilst (2009), who reported that apoptosis-deficient *ced-3(n1286)* animals subjected to 15 days of starvation did not show loss of germ cell nuclei or gonad shrinkage, and did not produce progeny after ARD [7]. In fact, we observed that wild-type animals and *ced-3* deficient mutants are unable to produce progeny after spending 15 days under starvation, either by self-fertilization or mating with well-fed wild-type males.

As previously reported [3], we observed that apoptosis-deficient mutants produced fewer offspring and exhibited higher embryonic lethality under control conditions compared to the wild-type animals. In this paper, we show that the apoptosis-deficient animals that were recovered from 5 days of starvation produced even fewer offspring and exhibited higher embryonic lethality than the wild-type animals. Our results suggest that apoptosis is important to preserve oocyte quality in control or prolonged starvation conditions.

## Germ cell apoptosis continues during ARD

Our work shows that apoptosis is increased during prolonged starvation and continues to be high during ARD. Germ cell apoptosis is required during oogenesis for properly allocating resources within the gonad and ensuring oocyte quality [3, 41]. Apoptosis increases with age under control conditions and continues in later life contributing to gonad degeneration [41, 42]. We found that increased germ cell apoptosis during ARD is not triggered by *cep-1/p53*, suggesting that it is not caused by DNA damage or meiotic defects.

Furthermore, germ cell apoptosis can be triggered when animals face different types of stress [19]. Previously, we reported that one-day-old animals exposed to 6 h of starvation presented a 2-fold increase in the number of germ cell corpses, for which *lin-35/Rb* is responsible [19, 26]. Unexpectedly, we found that apoptosis seems to be induced during ARD by *lin-35/Rb* and an unknown mechanism.

Why is germ cell apoptosis elevated during ARD? Our results support the notion proposed by Andux and Ellis (2008) that germ cell death serves as a mechanism to redistribute resources

in the gonad [3]. The biological significance of this mechanism might be that it ensures oocyte production only under suitable conditions. At the mid-L4 stage when ARD entry is promoted, some germ cells have already committed to the meiotic oogenic cell fate, which is irreversible; however, completion of meiosis and development into a mature oocyte takes several hours. Thus, we think that the germ cell apoptosis observed during ARD might arise from the germ cells that escape the mitotic cell fate but, due to lack of resources, are eliminated by apoptosis.

### DAF-2 inactivation causes gonad size reduction in the presence of food

We sought to investigate the molecular mechanism that governs the oogenic germline starvation response during ARD. We tested some genes involved in the regulation of dauer diapause, L1 arrest and other genes implicated in germ cell apoptosis and proliferation and demonstrated that only IIS in the mid-L4 larval stage caused a reduction in gonad size even in the presence of food (Table 8 and Fig 9). We propose that IIS pathway inactivation might trigger a response that mimics the entry into ARD in well-fed conditions, since animals show a reduced gonad size (Fig 9). Similarly, *daf-2* animals slow ovulation when they reduced their gonad size suggesting that *daf-2* might participate in ARD signaling; however, the shrunken gonads of *daf-2* animals do not form one single oocyte at a time as that of the ARD gonads, and *daf-2* is not essential for the gonad shrinking during ARD. Although our results provide some evidence of the pathway that governs the oogenic germline starvation response, further information is still needed for a better understanding of the precise molecular mechanism that controls reproduction under starvation conditions.

### Acknowledgments

We thank the *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440) for kindly providing the strains used in this work. We thank WormBase release WS224 for gathering information and making it available. We also thank Laura Silvia Salinas for technical assistance, members of the Navarro Lab and Dr. Jesús Chimal from the Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM and Dr. Wilhem Hansberg and Dr. Félix Recillas from the Instituto de Fisiología Celular-UNAM for helpful discussion and comments on this project. Emilio Carranza-García received a CONACyT doctoral fellowship (361899) and data in this work are part of his doctoral dissertation in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

### Author Contributions

**Conceptualization:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

**Formal analysis:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

**Funding acquisition:** R. E. Navarro.

**Investigation:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

**Methodology:** E. Carranza-García.

**Project administration:** R. E. Navarro.

**Supervision:** R. E. Navarro.

**Validation:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

**Visualization:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

**Writing – review & editing:** E. Carranza-García, R. E. Navarro.

## References

1. Kim S, Spike C, Greenstein D. Control of oocyte growth and meiotic maturation in *Caenorhabditis elegans*. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013; 757:277–320. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_10) PMID: 22872481; PubMed Central PMCID: PMC3819423.
2. Pazdernik N, Schedl T. Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Advances in experimental medicine and biology*. 2013; 757:1–16. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_1) PMID: 22872472; PubMed Central PMCID: PMC3781019.
3. Andux S, Ellis RE. Apoptosis maintains oocyte quality in aging *Caenorhabditis elegans* females. *PLoS genetics*. 2008; 4(12):e1000295. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000295> PMID: 19057674; PubMed Central PMCID: PMC2585808.
4. Miller MA, Nguyen VQ, Lee MH, Kosinski M, Schedl T, Caprioli RM, et al. A sperm cytoskeletal protein that signals oocyte meiotic maturation and ovulation. *Science*. 2001; 291(5511):2144–7. <https://doi.org/10.1126/science.1057586> PMID: 11251118.
5. Schindler AJ, Baugh LR, Sherwood DR. Identification of late larval stage developmental checkpoints in *Caenorhabditis elegans* regulated by insulin/IGF and steroid hormone signaling pathways. *PLoS genetics*. 2014; 10(6):e1004426. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004426> PMID: 24945623; PubMed Central PMCID: PMC4063711.
6. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2015:1–31. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1> PMID: 26087236; PubMed Central PMCID: PMC4781331.
7. Angelo G, Van Gilst MR. Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science*. 2009; 326(5955):954–8. <https://doi.org/10.1126/science.1178343> PMID: 19713489.
8. Seidel HS, Kimble J. The oogenic germline starvation response in *C. elegans*. *PloS one*. 2011; 6(12):e28074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028074> PMID: 22164230; PubMed Central PMCID: PMC3229504.
9. Seidel HS, Kimble J. Cell-cycle quiescence maintains *Caenorhabditis elegans* germline stem cells independent of GLP-1/Notch. *eLife*. 2015; 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.10832> PMID: 26551561; PubMed Central PMCID: PMC4718729.
10. Hughes SE, Evason K, Xiong C, Kornfeld K. Genetic and pharmacological factors that influence reproductive aging in nematodes. *PLoS genetics*. 2007; 3(2):e25. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030025> PMID: 17305431; PubMed Central PMCID: PMC1797816.
11. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. *WormBook : the online review of C elegans biology*. 2006:1–11. Epub 2007/12/01. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1> PMID: 18050451; PubMed Central PMCID: PMC4781397.
12. Silva-Garcia CG, Estela Navarro R. The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis*. 2013; 51(10):690–707. <https://doi.org/10.1002/dvg.22418> PMID: 23913578.
13. Bukhari SI, Vasquez-Rifo A, Gagne D, Paquet ER, Zetka M, Robert C, et al. The microRNA pathway controls germ cell proliferation and differentiation in *C. elegans*. *Cell research*. 2012; 22(6):1034–45. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.31> PMID: 22370633; PubMed Central PMCID: PMC3367518.
14. Kim E, Sun L, Gabel CV, Fang-Yen C. Long-term imaging of *Caenorhabditis elegans* using nanoparticle-mediated immobilization. *PloS one*. 2013; 8(1):e53419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053419> PMID: 23301069; PubMed Central PMCID: PMC3536676.
15. Huang J, Wang H, Chen Y, Wang X, Zhang H. Residual body removal during spermatogenesis in *C. elegans* requires genes that mediate cell corpse clearance. *Development*. 2012; 139(24):4613–22. <https://doi.org/10.1242/dev.086769> PMID: 23172915; PubMed Central PMCID: PMC3509724.
16. Schedl T, Kimble J. *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1988; 119(1):43–61. PMID: 3396865; PubMed Central PMCID: PMC1203344.
17. Barton MK, Kimble J. *fog-1*, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1990; 125(1):29–39. PMID: 2341035; PubMed Central PMCID: PMC1204007.
18. Cinquin A, Chiang M, Paz A, Hallman S, Yuan O, Vysniauskaite I, et al. Intermittent Stem Cell Cycling Balances Self-Renewal and Senescence of the *C. elegans* Germ Line. *PLoS genetics*. 2016; 12(4):e1005985. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005985> PMID: 27077385; PubMed Central PMCID: PMC4831802.

19. Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation*. 2006; 13(12):2129–39. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401976> PMID: 16729024.
20. Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 1986; 44(6):817–29. PMID: 3955651.
21. Schumacher B, Schertel C, Wittenburg N, Tuck S, Mitani S, Gartner A, et al. *C. elegans* ced-13 can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell death and differentiation*. 2005; 12(2):153–61. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401539> PMID: 15605074.
22. Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science*. 2001; 294(5542):591–5. <https://doi.org/10.1126/science.1065486> PMID: 11557844.
23. Bailly AP, Freeman A, Hall J, Declais AC, Alpi A, Lilley DM, et al. The *Caenorhabditis elegans* homolog of Gen1/Yen1 resolvases links DNA damage signaling to DNA double-strand break repair. *PLoS genetics*. 2010; 6(7):e1001025. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001025> PMID: 20661466; PubMed Central PMCID: PMC2908289.
24. Mateo AR, Kessler Z, Jolliffe AK, McGovern O, Yu B, Nicolucci A, et al. The p53-like Protein CEP-1 Is Required for Meiotic Fidelity in *C. elegans*. *Current biology : CB*. 2016; 26(9):1148–58. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.036> PMID: 27151662; PubMed Central PMCID: PMC5215890.
25. Lettre G, Kritikou EA, Jaeggi M, Calixto A, Fraser AG, Kamath RS, et al. Genome-wide RNAi identifies p53-dependent and -independent regulators of germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell death and differentiation*. 2004; 11(11):1198–203. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401488> PMID: 15272318.
26. Lascarez-Lagunas LI, Silva-Garcia CG, Dinkova TD, Navarro RE. LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via CED-9/Bcl2 downregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*. 2014; 34(13):2499–516. <https://doi.org/10.1128/MCB.01532-13> PMID: 24752899; PubMed Central PMCID: PMC4054308.
27. Schertel C, Conradt B. *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development*. 2007; 134(20):3691–701. <https://doi.org/10.1242/dev.004606> PMID: 17881492.
28. Gottlieb S, Ruvkun G. daf-2, daf-16 and daf-23: genetically interacting genes controlling Dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1994; 137(1):107–20. PMID: 8056303; PubMed Central PMCID: PMC1205929.
29. Murphy CT. The search for DAF-16/FOXO transcriptional targets: approaches and discoveries. *Exp Gerontol*. 2006; 41(10):910–21. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.040> PMID: 16934425.
30. Smith-Vikos T, de Lencastre A, Inukai S, Shlomchik M, Holtrup B, Slack FJ. MicroRNAs mediate dietary-restriction-induced longevity through PHA-4/FOXA and SKN-1/Nrf transcription factors. *Current biology : CB*. 2014; 24(19):2238–46. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.013> PMID: 25242029; PubMed Central PMCID: PMC4208828.
31. Pan KZ, Palter JE, Rogers AN, Olsen A, Chen D, Lithgow GJ, et al. Inhibition of mRNA translation extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2007; 6(1):111–9. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00266.x> PMID: 17266680; PubMed Central PMCID: PMC42745345.
32. Korta DZ, Tuck S, Hubbard EJ. S6K links cell fate, cell cycle and nutrient response in *C. elegans* germline stem/progenitor cells. *Development*. 2012; 139(5):859–70. <https://doi.org/10.1242/dev.074047> PMID: 22278922; PubMed Central PMCID: PMC3274352.
33. Kritikou EA, Milstein S, Vidalain PO, Lettre G, Bogan E, Doukoumetzidis K, et al. *C. elegans* GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival. *Genes Dev*. 2006; 20(16):2279–92. <https://doi.org/10.1101/gad.384506> PMID: 16912277; PubMed Central PMCID: PMC1553210.
34. Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Current biology : CB*. 2001; 11(21):1722–7. PMID: 11696333.
35. Templeman NM, Murphy CT. Regulation of reproduction and longevity by nutrient-sensing pathways. *J Cell Biol*. 2018; 217(1):93–106. <https://doi.org/10.1083/jcb.201707168> PMID: 29074705; PubMed Central PMCID: PMC5748989.
36. Riddle DL, Swanson MM, Albert PS. Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*. 1981; 290(5808):668–71. PMID: 7219552.
37. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993; 366(6454):461–4. <https://doi.org/10.1038/366461a0> PMID: 8247153.

38. Henderson ST, Johnson TE. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB*. 2001; 11(24):1975–80. PMID: [11747825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11747825/).
39. Spike CA, Coetzee D, Eichten C, Wang X, Hansen D, Greenstein D. The TRIM-NHL protein LIN-41 and the OMA RNA-binding proteins antagonistically control the prophase-to-metaphase transition and growth of *Caenorhabditis elegans* oocytes. *Genetics*. 2014; 198(4):1535–58. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168831> PMID: [25261698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25261698/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC4256770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4256770/).
40. Lopez AL 3rd, Chen J, Joo HJ, Drake M, Shidate M, Kseib C, et al. DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *Dev Cell*. 2013; 27(2):227–40. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.008> PMID: [24120884](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120884/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC3829605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3829605/).
41. Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, Horvitz HR, Hengartner MO. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*. 1999; 126(5):1011–22. PMID: [9927601](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9927601/).
42. de la Guardia Y, Gilliat AF, Hellberg J, Rennert P, Cabreiro F, Gems D. Run-on of germline apoptosis promotes gonad senescence in *C. elegans*. *Oncotarget*. 2016; 7(26):39082–96. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9681> PMID: [27256978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27256978/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC5129915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5129915/).