



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Determinación de mecanismos regulatorios en la conducta
por periodos prolongados de ayuno en *C. elegans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Laura Gabriela Gutiérrez Chávez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Félix Recillas Targa
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos
[Universidad Autónoma Metropolitana](#)

Ciudad de México, Junio, 2021



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.

Agradecimientos

Esta tesis se desarrolló bajo la tutoría del Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez, en el laboratorio 302 Oriente del departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutor estuvo conformado por

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Kioko Rubí Guzmán Ramos	Unidad Lerma, UAM

El presente trabajo contó con financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto “CB-2016-01 No. 0284867”, así como por la Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No. IN203820. Además, se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de becario 966823.

Este trabajó contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado:

Dr. Enrique Merino Pérez	PRESIDENTE
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova	VOCAL
Dr. Diego Claudio Cortéz Quezada	VOCAL
Dr. Ataúlfo Martínez Torres	VOCAL
Dra. Rosa Estela Navarro González	SECRETARIA

Se reconoce a la Dra. Nallely Cano Domínguez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

Fueron utilizados los servicios de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, de la cual se agradece la asesoría y disposición de la Dra. Ruth Rincón Heredia y del Dr. Abraham Rosas Arellano.

Finalmente, se reconoce a la Dra. Laura Ongay Larios, la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera, por los servicios ofrecidos en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Dedicatoria

A mis padres, hermano, abuelitos, tías y tíos; con quienes estoy eternamente agradecida por su amor y apoyo incondicionales. Siempre encuentro en ustedes inspiración para ser mejor cada día.

A mis amigas y amigos, con quienes encuentro refugio y momentos divertidos.

Al Dr. Julián Valdés, quien es un ejemplo para mí, por ser un excelente mentor, escucharme y siempre darme un buen consejo.

¡Nunca más una ciencia sin nosotras!

ÍNDICE

1. Resumen	6
2. Abstract	8
3. Introducción	10
3.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo experimental	10
3.2 El Sistema Nervioso de <i>C. elegans</i> y su respuesta sensorial	11
3.3 Cambios conductuales asociados al ayuno	13
3.4 El ciclo de vida de <i>C. elegans</i> y el efecto del ayuno prolongado en los estadios larvarios	14
3.5 Vías de señalización implicadas en la respuesta al ayuno en <i>C. elegans</i>	17
3.5.1 La vía de señalización de la insulina (IIS) en la regulación del arresto por ayuno	17
3.5.2 El factor de transcripción CRH-1/CREB y su implicación en el ayuno	19
3.5.3 Silenciamiento por RNA de interferencia en <i>C. elegans</i>	20
3.5.3.1 Rol del metabolismo de endo-siRNAs en el ayuno y/o comportamiento	23
4. Antecedentes	24
5. Justificación	26
6. Hipótesis	27
7. Objetivo	27
7.1 Objetivos particulares	27
8. Metodología	28
8.1 Mantenimiento de <i>C. elegans</i>	28
8.2 Protocolo de ayunos prolongados	29
8.3 Ensayos de quimiotaxis	30
8.4 Microscopía	31
8.5 Análisis estadísticos	32
9. Resultados	33
9.1 El arresto en L1 y diapausas inducidas por ayunos prolongados inducen cambios conductuales a la preferencia de odorantes	33
9.2 El arresto en L1 ocasiona cambios en la expresión del receptor a odorantes ODR-10	36
9.3 El cambio de comportamiento resultante del arresto en L1 depende de la vía de señalización de insulina	37
9.4 El ayuno induce un incremento en la quimiotaxis a 2-butanona dependiente del factor de transcripción CREB	40
9.5 Múltiples vías de procesamiento de RNA participan en establecimiento	

<i>conductual tras un arresto en L1</i>	44
10. Discusión	48
<i>10.1 Un arresto larvario por ayuno tiene consecuencias conductuales a largo plazo a la preferencia de odorantes</i>	48
<i>10.2 La participación de DAF-16 en el cambio conductual inducido por ayuno</i>	51
<i>10.3 Dinámica de actividad de CREB/CRH-1</i>	53
<i>10.4 El metabolismo de siRNAs en el establecimiento del comportamiento</i>	56
11. Conclusiones	61
12. Perspectivas	62
13. Figuras Suplementarias	63
14. Bibliografía	64

1. Resumen

Durante su ciclo de vida, *C. elegans* se enfrenta a diferentes estímulos medioambientales, muchos de ellos adversos; éstos promueven cambios fenotípicos en el nematodo con el objetivo de sobrevivir para retornar a un ambiente estable y favorable para el animal y su progenie. Ejemplo de ello son los arrestos y diapausas en el desarrollo provocados por periodos prolongados de ayuno, durante los cuales gusanos de todas las etapas larvarias pueden pausar su desarrollo hasta que las condiciones ambientales sean de nuevo favorables. Sin embargo, poco se ha indagado respecto a los cambios conductuales que ocasiona a largo plazo un arresto por ayuno en *C. elegans*.

Por medio de ensayos de quimiotaxis, en este trabajo se logró identificar que diferentes arrestos y diapausas larvarias ocasionadas por 6 días de ayuno, o incluso un ayuno de sólo 3h en adultos, modifican la preferencia basal a diferentes odorantes posterior a que los animales se recuperan, en particular aumentando la preferencia a la 2-butanona y disminuyéndola al benzaldehído y citronela. Además, caracterizamos que por lo menos en lo que respecta a 2-butanona, el efecto es intergeneracional observándose en la F1. Ante estos resultados, exploramos los posibles mecanismos que operan en la P0 en el establecimiento del cambio conductual a la 2-butanona inducido por ayuno. Para ello, evaluamos tres posibles vías: insulina, CREB y metabolismo de RNA.

Nuestros resultados mostraron que el factor transcripcional DAF-16/FOXO de la vía de insulina está involucrado en el cambio conductual tras un arresto en L1 ocasionado por ayuno, dado que nematodos carentes de este factor no presentan cambio en la preferencia a 2-butanona. DAF-16 al ser uno de los reguladores maestros durante los diferentes arrestos y diapausas descritos en *C. elegans*, pudiera estar regulando la expresión de receptores a odorantes, como en el caso de ODR-10, que de hecho detectamos a la alza en gusanos durante el arresto por ayuno. Otro posible regulador que exploramos fue el factor transcripcional CRH-1, el ortólogo de CREB en *C. elegans*, donde observamos que la mutante nula es incapaz de presentar el cambio conductual inducido por ayuno, demostrando la relevancia de este factor en nuestro modelo. Además, caracterizamos la expresión celular de CREB/CRH-1 en el nematodo resaltando su particular activación en células intestinales aun después del arresto en L1, lo que pudiera sugerir la participación de este tejido como un sensor importante al sistema nervioso acerca del estado nutricional del animal. Finalmente, encontramos que la vía de silenciamiento por RNA de interferencia endógena del nematodo a través del transportador SID-1, la argonauta HRDE-1, así como PRDE-1 (parte de la vía síntesis de piRNAs), parecen fundamentales para el establecimiento del comportamiento observado en nematodos adultos jóvenes tras un arresto en L1.

Así pues, nuestro trabajo permitió esclarecer que el cambio en el comportamiento posterior a periodos prolongados de ayuno que inducen un arresto en L1 en *C. elegans*, involucra a la vía de señalización de insulina y/o CREB de manera simultánea, además de mecanismos como la vía de silenciamiento por RNA, siendo probable que la interconexión de estas vías sea lo que mantiene el cambio en el comportamiento a largo plazo en el nematodo. En conjunto, nuestros resultados aportan información para comprender cómo una situación de estrés medioambiental es capaz de modificar a largo plazo el comportamiento de un animal, y sobre todo, dan a luz a entender cómo diversas vías de señalización participan en distintos tejidos para modular la conducta.

2. *Abstract*

During the life cycle of *C. elegans*, the nematodes may be exposed to diverse environmental stimuli, many of them hostile that may induce phenotypic changes to favor the survival of the animal. An example of this is the developmental arrest caused by prolonged periods of starvation, in which worms of all larval stages pause their development until conditions are again favorable. However, little has been investigated regarding the long-term behavioral changes induced by the starvation-induced arrest in *C. elegans*.

In this work, we identified that different larval arrests caused by 6 days of starvation, or even 3h in adults, can change the basal preference towards different odorants after the animals are recovered. In particular, the preference for 2-butanone is increased while the preference for benzaldehyde and citronella are decreased. In addition, we determined that, at least as regards to 2-butanone, the effect is intergenerational as we observed the behavioral alteration in the first generation (F1) of worms. Given these results, we explored the possible mechanisms that operate in the establishment of starving-induced behavioral change to 2-butanone in the P0. To do this, we evaluate three possible pathways: insulin, CREB, and RNA metabolism.

Our results showed that DAF-16/FOXO, the master transcriptional factor of the insulin pathway, is involved in the behavioral change after an arrest in L1 induced by 6 days of starvation, since nematodes lacking this factor do not show a change in preference to 2-butanone. The transcriptional factor DAF-16 is one of the master regulators of arrests and diapauses described in *C. elegans* and can regulate odor perception in worms by regulating the expression of odorant receptors. In fact, we detected overexpression of the odorant receptor ODR-10 during the arrest. Another regulator explored in this work was the transcriptional factor CRH-1, the ortholog of CREB in *C. elegans*, where we observed that CREB-null animals did not show the starving-induced behavioral change, demonstrating the relevance of this factor in our model. Furthermore, we characterize the tissue expression of CREB/CRH-1 in the nematode, highlighting its activation in intestinal cells even after fasting, which suggests the participation of the intestine as an important sensor of the nutritional status of the animal and a possible crosstalk with the nervous system. Finally, we found that some players of the endogenous RNAi silencing pathway are fundamental for the establishment of behavior observed in young adult nematodes following an arrest at L1 as animals that lack the dsRNA transporter SID-1, the HRDE-1 argonaut, as well as PRDE-1 (part of the piRNA synthesis pathway) are unable to establish the starvation-induced behavioral change.

Overall, this study characterized the behavioral changes induced by an L1 arrest caused by prolonged periods of starvation in *C. elegans* and helped to clarify that the odorant preference changes induced by starvation, involves the insulin and/or CREB signaling pathway simultaneously, in addition to mechanisms such as the RNA silencing pathway. It is plausible that the interconnection of these pathways maintains the change in long-term behavior in the nematode and the subsequent generations. Together, our results provide information to understand how a situation of environmental stress can modify the behavior of an animal in the long term, and above all, they give light to understand how different signaling pathways participate in diverse tissues to modulate the behavior of an animal.

3. Introducción

3.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

Desde su introducción en 1970 por Sidney Brenner (premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2002), el nematodo *Caenorhabditis elegans* es considerado uno de los modelos más versátiles en la investigación científica moderna, desde el estudio de biología celular, biología del desarrollo y genómica hasta las neurociencias.

C. elegans es un animal de vida libre de fácil propagación en condiciones experimentales en laboratorio, esto en gran medida a su ciclo de vida corto de 3 días de embrión a adulto fértil (a 20 °C) además de que es un organismo hermafrodita, aunque los machos pueden presentarse en una proporción muy baja en una población (< 0.2 %). Otras cualidades que resultan ventajosas para su estudio, es que se trata de un animal transparente y con ~1 mm de longitud cuando es adulto (**Figura 1.A**) y su alimentación consiste en bacterias y levaduras, primordialmente lo que hace su cultivo sencillo y económico, relativamente. Anatómicamente, posee tejidos especializados en los principales sistemas: nervioso, digestivo, muscular y reproductivo (**Figura 1.B**), en los que se organizan un total de 959 células (Altun & Hall, 2009; Corsi *et al*, 2015).

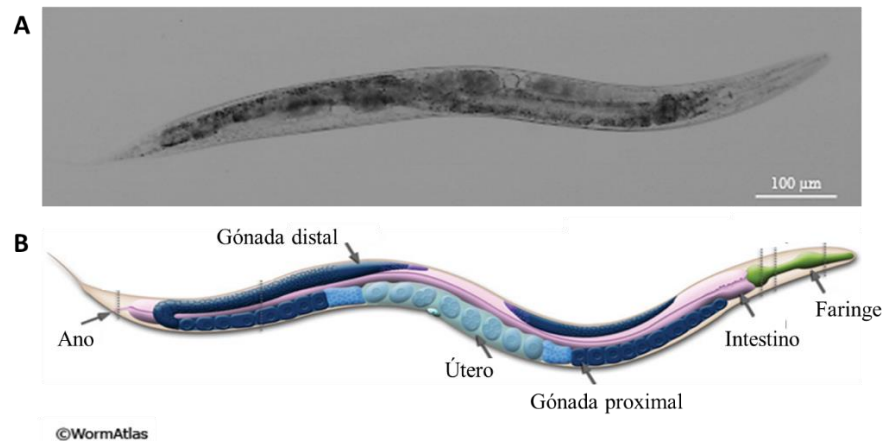


Figura 1. Morfología de *Caenorhabditis elegans*. En **A** se muestra una microscopía de campo claro de un nematodo adulto; mientras que en **B** una esquematización de la anatomía del animal (Modificada de Altun & Hall, 2009).

Este nematodo fue el primer organismo multicelular y el segundo eucarionte (*Saccharomyces cerevisiae* es el primero), del que se obtuvo la secuencia completa de su genoma, con un total de 100 Mb repartidos en cinco pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (The *C. elegans*

Sequencing Consortium, 1998), a partir de los que se han predicho aproximadamente 20,000 genes codificantes, muchos de los cuales (60-80 %) se comparten con el humano. Estos incluyen múltiples vías de señalización encargadas de la regulación del ciclo de vida, respuesta a estresores ambientales e incluso del comportamiento. Además, una característica interesante es que cuenta con pocas regiones intergénicas y muy cortas, por lo que existen pocas isoformas de un gen en *C. elegans* (Corsi *et al*, 2015).

Todas estas características en su conjunto hacen al nematodo *Caenorhabditis elegans* un extraordinario modelo para el estudio de los mecanismos moleculares que operan en un animal completo pero que tiene la ventaja de ser de rápido y fácil mantenimiento.

3.2 El Sistema Nervioso de *C. elegans* y su respuesta sensorial

C. elegans es considerado uno de los modelos más versátiles para estudiar el sistema nervioso, únicamente posee 302 neuronas en animales hermafroditas (30 % de las células), mientras que en machos esta cifra incrementa a 381 para neuronas con funciones de apareamiento y en la regulación de la cola especializada para la cópula (**Figura 2.A**). Sin embargo, entre hermafroditas y machos se conservan 294 neuronas con las funcionalidades necesarias para la supervivencia del animal en su medioambiente, como la búsqueda y selección de alimento, detección de estímulos mecánicos, gradientes de temperatura, reproducción, etcétera (Lee & Portman, 2009; Emmons, 2005).

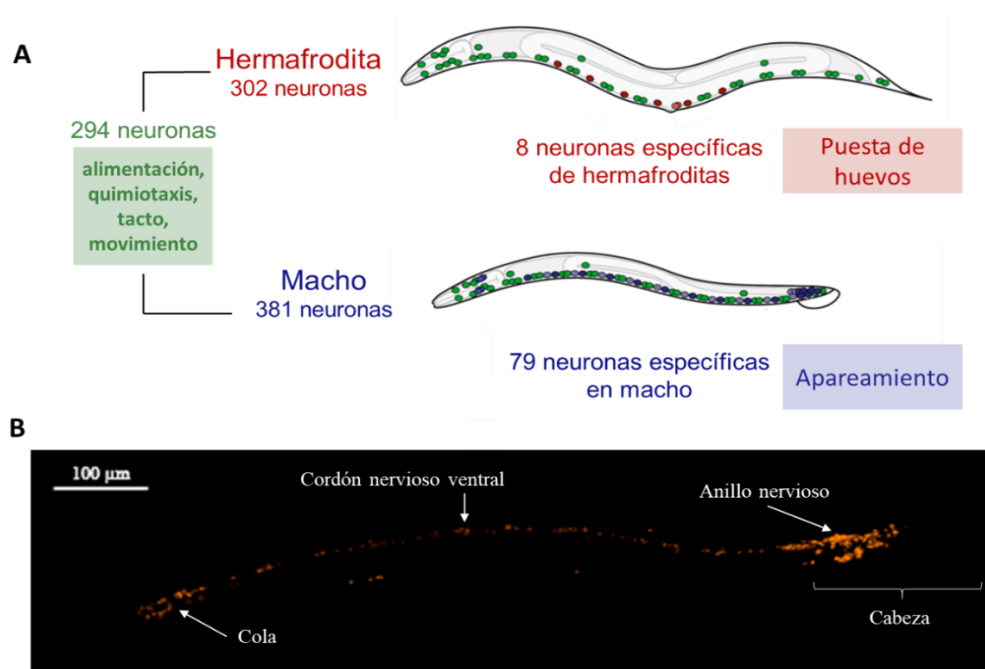


Figura 2. Sistema Nervioso de *C. elegans*. En A se esquematizan a grandes rasgos las diferencias entre el

sistema nervioso de hermafroditas y machos (Modificado de Lee & Portman, 2009). En **B** se observa una fotografía de microscopía confocal obtenida en nuestro laboratorio de una cepa que expresa RFP (OH10690) en todas las neuronas de un individuo hermafrodita adulto.

A pesar de lo “simple” que pudiera parecer el sistema nervioso de *C. elegans*, este se conforma de una gran diversidad celular. Por ejemplo, se han caracterizado al menos 118 clases neuronales diferentes, las cuales poseen la maquinaria para sintetizar o bien, responder a los neurotransmisores clásicos: acetilcolina, GABA, glutamato, serotonina y dopamina (Hobert, 2005; Serrano-Saiz *et al*, 2017). Anatómicamente, los somas de las neuronas se encuentran agrupados en ganglios, como es común en animales invertebrados, ubicados principalmente en la cola y en la cabeza, resaltando que la mayoría de las neuronas se encuentran agrupadas en el anillo nervioso (**Figura 2.B**), mientras que otros somas neuronales se distribuyen a lo largo del cuerpo del animal como en el cordón nervioso ventral (Altun & Hall, 2011). Una de las grandes ventajas de este modelo es que las conexiones y los circuitos neuronales de *C. elegans* se encuentran caracterizadas en su totalidad (White *et al*, 1986; Cook *et al*, 2019).

Funcionalmente, al igual que en animales filogenéticamente superiores, la decodificación de la información ambiental ocurre de manera jerárquica, donde neuronas sensoriales detectan estímulos externos, y estas señales aferentes son integradas y direccionadas por interneuronas, para finalmente activar neuronas efectoras (motoneuronas), resultando en una conducta particular (Liu *et al*, 2019).

Se calcula que las 302 neuronas de *C. elegans* se conectan en unas 7000 sinapsis químicas y alrededor de 600 gap junctions a lo largo del cuerpo del animal, controlando desde la actividad locomotora del nematodo, hasta comportamientos sociales y reproductivos (Richmond, 2007; Jang *et al*, 2017). Además, a pesar de que en *C. elegans* no hay mielinización, cuenta con 56 células gliales que cumplen funciones de soporte para la sinapsis, extensión neurítica y estructuración del anillo nervioso, uno de los principales ganglios nerviosos del animal (Shao *et al*, 2013; Oikonomou y Shaham, 2011).

C. elegans al ser un animal de vida libre, cuya alimentación consiste principalmente de bacterias que crecen en su entorno, es capaz de aprender a asociar positiva o negativamente distintos estímulos ambientales. Para ello, es preciso mencionar que las neuronas tienen una sencilla morfología mono o bipolar, y 60 células de las 302 neuronas son consideradas sensoriales, las cuales se caracterizan por presentar cilios (**Figura 3**). Los somas de estas neuronas sensitivas se encuentran localizadas adyacentes al bulbo faríngeo, mientras que sus axones se extienden y asocian al anillo

nervioso; las dendritas, por otra parte, se despliegan a la parte anterior de la cabeza y terminan con diversas estructuras ciliadas no motiles (Inglis *et al*, 2007).

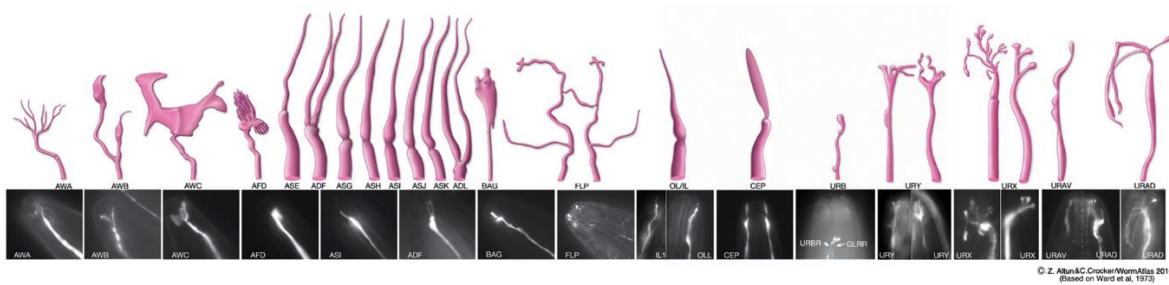


Figura 3. Morfología de los cilios de algunas neuronas sensoriales (Ryder, *WormAtlas*).

La importancia de estas estructuras ciliadas de las neuronas del sistema quimio-sensor, radica en su contenido proteico, ya que cada neurona posee un abanico de receptores sensoriales, lo que le confiere a *C. elegans* la capacidad para responder a estímulos ambientales como temperatura, ósmosis, disponibilidad de oxígeno, estímulos mecánicos, quimioatrayentes, patógenos, entre otros (Altun y Hall, 2011).

Una de las neuronas sensoriales más estudiadas es la AWC que posee cinco tipos de receptores diferentes, entre foto-, electro-, termo- y odo-sensores. Respecto a los receptores a odorantes, se ha caracterizado que estos sólo reconocen cinco odorantes atractivos: benzaldehído, 2-butanona, alcohol isoamílico, 2,3-pentanodiona y 2,4,5-trimetiltiazol (Bargmann *et al*, 1993). El caso de la 2-butanona es interesante, ya que esta cetona es producida en vida silvestre por la bacteria *Serratia marcescens* y que a una primera exposición resulta una fuente de alimento muy atractiva para los nematodos, sin embargo, su potencial patogénico crea a largo plazo un comportamiento aversivo (Worthy *et al*, 2018); además de que se ha observado que este odorante pareado con alimento puede ser establecido como un aprendizaje y memoria asociativos (Kauffman *et al*, 2010).

3.3 Cambios conductuales asociados al ayuno

La habilidad de búsqueda, aversión y elección a distintas fuentes de alimento de *C. elegans* constituye uno de los comportamientos evolutivamente más conservados filogenéticamente, y esta capacidad por parte del nematodo puede verse modificada cuando el animal se enfrenta a situaciones adversas en su entorno como es la falta de alimento (Zhang *et al*, 2005). En particular, se ha observado que el ayuno en el estadio larvario L1 induce un comportamiento colectivo de agregación, lo que se cree podría ser una estrategia colectiva de sobrevivencia (Artyukhin *et al*, 2015). Además, se ha reportado

que inicialmente el ayuno incrementa el comportamiento exploratorio, pero la ausencia de alimento a tiempos prolongados reduce la exploración y motilidad de los gusanos, mientras que el estado de alerta y la ingesta de alimento aumentan cuando son expuestos de nuevo a la presencia de bacteria (Pradhan *et al*, 2018; Avery & You, 2012).

Cabe recalcar que el impacto de la respuesta conductual en *C. elegans* depende del tiempo que duren los periodos de ausencia de alimento, ya que entre más largos éstos sean, más se verá afectada la velocidad con la que responden a un estímulo quimioatrayente como el alcohol isoamílico, así como movimientos circulares y piruetas que alteran la direccionalidad con la que se dirigen los gusanos (Shimizu *et al*, 2019). En cuanto a la quimiotaxis, Kauffman *et al* (2010) reportaron que un periodo extremo de 16 horas de ayuno incrementaba de manera dramática la preferencia basal al odorante 2-butanona.

Por otro lado, en gusanos adultos se ha reportado que periodos de ayuno de 6h pueden inducir un comportamiento aversivo hacia el NaCl, cuando la sal es usualmente un estímulo que el animal asocia como positivo y más importante aún, que son las neuronas sensoriales las que median fisiológicamente este comportamiento (Nagashima *et al*, 2019; Jang *et al*, 2019).

Por lo anterior, es posible afirmar que la ausencia de alimento trae consigo respuestas conductuales muy variadas que dependen del tiempo de ayuno, así como de la etapa larvaria del nematodo al momento del estrés; no obstante, pocos han sido los reportes que describan a detalle estos cambios conductuales en *C. elegans* y escasas aproximaciones por comprender cómo se regulan estos comportamientos en respuesta a un estresor medioambiental como la falta de alimento.

3.4 El ciclo de vida de C. elegans y el efecto del ayuno prolongado en los estadios larvarios

Como se mencionó anteriormente *C. elegans* es un nematodo de vida libre de fácil propagación y con un ciclo de vida relativamente corto, lo cual lo hace un excelente modelo biológico para trabajar. En el laboratorio, este gusano crece a 20°C y en condiciones *ad libitum* de alimento, de esta manera un ovocito fertilizado alcanza la etapa reproductiva en 72 h, atravesando antes por cuatro etapas larvarias *ex útero* (L1, L2, L3 y L4) tal como se muestra en la **Figura 4**. Una vez que alcanzan la etapa adulta, un hermafrodita posee 2 a 3 días reproductivos donde normalmente pone 4-10 embriones/hora. Después del periodo fértil, los hermafroditas pueden vivir por aproximadamente 20 días y presentan un fenotipo de envejecimiento con una tasa metabólica disminuida (Lints & Hall, 2009; Yasuda *et al*, 2006).

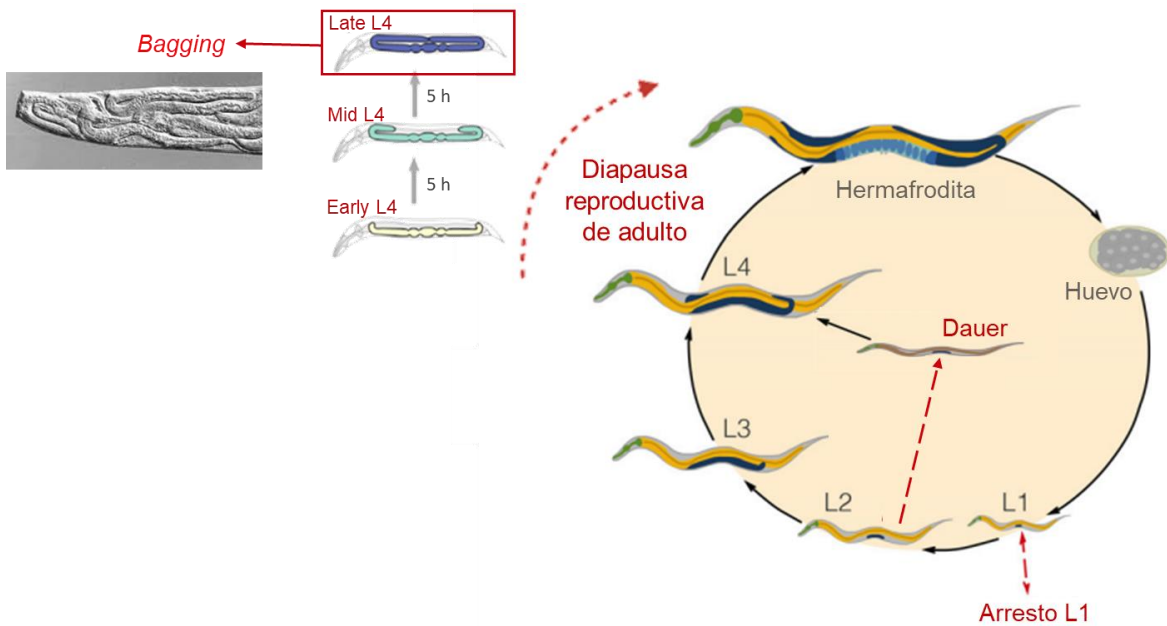


Figura 4. Ciclo de vida de *C. elegans*. Se muestran las cuatro etapas larvianas que atraviesa el nematodo para convertirse en adulto, así como los arrestos y diapausas que se inducen por ayuno en rojo (Modificado de Seidel & Kimble, 2011; Chen & Caswell-Chen, 2003; Angeles-Albores *et al*, 2017).

No obstante, cuando *C. elegans* experimenta condiciones en las cuales la disponibilidad de alimento es escasa o situaciones de estrés medioambiental como hipoxia, sobrepoblación y/o altas temperaturas que comprometan el término del desarrollo larvario, es capaz de detener la progresión del ciclo de vida de manera reversible y completarlo cuando las condiciones medioambientales sean favorables de nuevo; estos estados se conocen como arrestos y diapausas. A nivel fisiológico y bioquímico han sido caracterizados hasta cierto punto, por ejemplo, se ha visto como característica común, que enzimas de la β -oxidación de ácidos grasos y gluconeogénesis se encuentran sobreexpresados, mientras que el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria mitocondrial están a la baja (van Gilst *et al*, 2005). Se ha sugerido que esto es una estrategia de los nematodos para la obtención de carbohidratos y energía frente a la falta de alimento prolongada.

A continuación, se describen las características de los principales estados hipometabólicos de *C. elegans*:

❖ Arresto L1

En este arresto, las larvas L1 detienen su desarrollo cuando los embriones eclosionan en ausencia de una fuente de alimentación y cursan por periodos prolongados de ayuno (semanas) sin que se vea afectada la supervivencia del animal. El arresto en L1 previene que el desarrollo post-embrionario transcurra si no existen las condiciones ambientales adecuadas (Kaplan y

Baugh, 2016). Se ha caracterizado que durante este estado hipometabólico hay un incremento en la resistencia al estrés oxidante, mientras que una vez que los animales se recuperan y reinician su desarrollo, estos presentan un incremento en la resistencia a otros estresores como al choque de calor (Baugh, 2013; Jobson *et al*, 2015). Además, se ha caracterizado que hay una reducción global de la expresión génica (Baugh *et al*, 2009).

❖ Diapausa dauer

Las larvas que se encuentran en la transición a la etapa larvaria L2 y durante ésta experimentan una alta densidad poblacional o recursos nutrimentales escasos, e incluso un incremento de temperatura a 26°C, entran a una diapausa conocida como Dauer que es también inducida por una feromona que secretan los nematodos en estas condiciones de estrés. Esta diapausa es uno de los estados hipometabólicos mejor caracterizados en *C. elegans*. Además, es considerada una trayectoria de desarrollo alternativa, en la que los animales cursan cambios morfológicos como engrosamiento de cutícula donde este tejido sella el ano, hay alargamiento del cuerpo y la faringe se contrae deteniéndose la ingesta de comida. En este estado los animales pueden perdurar por meses hasta que las condiciones adecuadas se reestablezcan, y continuar con el desarrollo (Hu, 2007; Baugh y Hu, 2020).

❖ Diapausa reproductiva del adulto

Esta es la diapausa reproductiva que se induce por ayuno durante el desarrollo del estadio L4. Exhibe distintos fenotipos dependiendo del estado de avance de esta etapa larvaria, que dura aproximadamente 10 horas. Si el ayuno ocurre en un periodo temprano o a la mitad del L4 sucede un arresto en el desarrollo de los gusanos y en los nematodos ocurren cambios morfofisiológicos, destacándose la reducción dramática de la gónada, independiente de apoptosis, donde la línea germinal se reduce a un pequeño número de células troncales quiescentes, por lo que, posterior a la recuperación la viabilidad embrionaria se ve disminuida (Carranza y Navarro, 2019; Seidel y Kimble, 2011; Baugh y Hu, 2020). Por otro lado, si el ayuno sucede al final del L4, ocurre un fenómeno conocido como *bagging*, en el que debido a que ya inició el proceso de ovogénesis hay una retención de embriones *in utero*, los que eclosionan dentro del gusano hermafrodita, y de esta manera la primera generación es la que sobrevive (Seidel y Kimble, 2011).

3.5 Vías de señalización implicadas en la respuesta al ayuno en *C. elegans*

Cada uno de los arrestos y diapausas tienen mecanismos de regulación particulares, donde para cada estado se ven implicadas múltiples vías de señalización que incluyen remodelares de la cromatina, canales TRPV neuronales, la vía de señalización de TGF β , etc (Baugh y Hu, 2020). Sin embargo, a continuación, se abordarán unas de las vías de señalización conocidas por su activación durante periodos de ayuno, así como en arrestos y diapausas inducidos por la ausencia de alimento, que se retomaron para el desarrollo del presente trabajo: la vía de señalización de insulina, la actividad del factor transcripcional CRH-1/CREB, y la regulación por RNA de interferencia endógena del nematodo.

3.5.1 La vía de señalización de la insulina (IIS) en la regulación del arresto por ayuno

En *C. elegans* la vía de señalización de insulina (IIS: *Insulin/Insulin-like growth factor signaling*) participa en múltiples procesos biológicos involucrados en metabolismo, desarrollo, envejecimiento, resistencia a estrés e incluso comportamiento; siendo modulada principalmente por las fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes (Murphy & Hu, 2013; Baugh, 2013). El genoma del nematodo codifica para 40 péptidos tipo insulina (ILP, *insulin like peptides*) sobre los que recae en parte, la especificidad de la vía en respuesta a diferentes estímulos, ya que estos ILP pueden actuar como agonistas o antagonistas del DAF-2, el único receptor de insulina en *C. elegans*: (Pierce *et al*, 2001; Kaplan & Baugh, 2016). Por otro lado, se ha caracterizado que estos 40 ILP del nematodo se expresan en tejidos específicos, sobre todo en el sistema nervioso, pero también en intestino, epitelio, músculo y tejido reproductor (Ritter *et al*, 2013; Altintas *et al*, 2016). Por su parte, el receptor DAF-2 se encuentra especialmente enriquecido en neuronas del anillo nervioso (Kimura *et al*, 2011), reflejo de la importancia de esta vía sobre el funcionamiento del sistema nervioso en el nematodo.

A grandes rasgos, esta vía funciona de manera muy similar en mamíferos (**Figura 5**). A nivel molecular se ha caracterizado que los ILP al unirse a DAF-2 desencadenan una serie de fosforilación mediadas por las proteínas AGE-1/PI3K (fosfoinositol-3-cinasa) y posteriormente PDK-1 (fosfatidil inositol-3 fosfato), la cual a su vez promueve la actividad de las cinasas AKT-1/2 (serin-treonin cinasas), las cuales fosforilan al factor de transcripción FOXO/DAF-16 lo que inhibe su translocación al núcleo (**Figura 5**). Sin embargo, cuando no están presentes los ILPs, lo que puede ocurrir por diferentes estresores incluido el ayuno, la vía no se activa y DAF-16 no se fosforila lo que permite su translocación al núcleo donde induce la transcripción de genes que facilitan la formación del estado dauer, arresto L1, pero también de genes de resistencia a estrés como antioxidantes, y

proteínas de señalización y regulación génica como cinasas y otros factores de transcripción (Altintas *et al*, 2016; Lapierre & Hansen, 2012; Houthoofd *et al*, 2003).

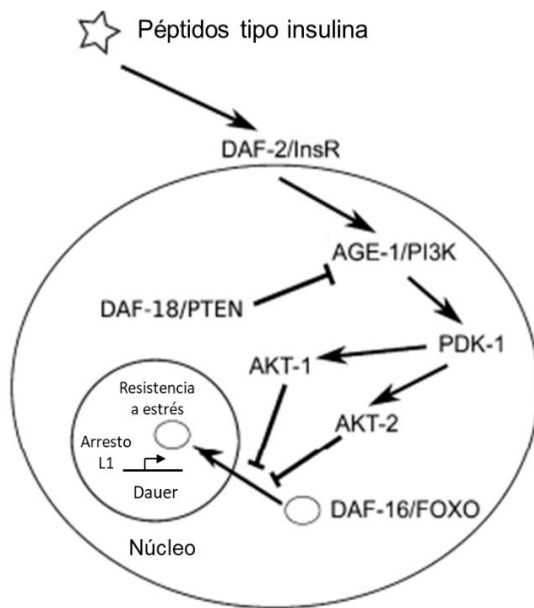


Figura 5. Vía de señalización de insulina en *C. elegans*. Se observa la vía de señalización de insulina en donde péptidos tipo insulina (ILP, *insulin like peptides*) pueden actuar como agonistas y activar al receptor transmembranal DAF-2, quien a su vez promueve una cascada de fosforilación a través de las cinasas AGE-1/PI3K, posteriormente PDK-1, y finalmente AKT-1/2 las cuales al fosforilar a DAF-16 retienen a este factor transcripcional en el citosol. Sin embargo, cuando DAF-2 no se activa o ILP actúan como antagonistas, las proteínas AKT-1/2 no se activan y la ausencia de fosforilación en DAF-16 promueve la translocación a núcleo donde en condiciones de arresto promueve la transcripción de genes de resistencia a estrés, principalmente. Otro regulador de la vía es DAF-18/PTEN, quien inhibe a la cinasa AGE-1/PI3K (Modificado de Baugh, 2013).

Ahora bien, en cuanto a la implicación de la vía de insulina en condiciones de ayuno, se conoce que DAF-16 funciona en el sistema nervioso, intestino y epidermis existiendo una interconexión muy importante entre estos tejidos para regular los diferentes arrestos (L1, L2 y L3) y la transición a dauer (Kaplan *et al*, 2015). En ese sentido, es interesante como Kaplan & Baugh (2016) plantean que la actividad de DAF-16 ocurre de manera secuencial entre estos tipos celulares siendo primero las neuronas quimiosensoras las que censan el estatus nutrimental en su entorno para controlar la secreción de ILP en un periodo de tiempo corto, cambios a los que el intestino es susceptible al detectar el estatus nutrimental del organismo y controlar a tiempos más largos la secreción de ILP, aunque aún falta por dilucidar el rol de la epidermis en esta señalización, ya que se ha descrito que su papel es importante en estos procesos.

No obstante, se conoce que la actividad de la vía de insulina en el sistema nervioso es fundamental, ya que la expresión pan-neuronal de DAF-16 y su ausencia en el resto de los tejidos produce un fenotipo de arresto en L1 de manera constitutiva, evento que no sucede si la expresión se restringe a intestino o epidermis (Libina *et al*, 2003). En contraste, la expresión de *asna-1* (gen que codifica para una ATPasa que permite la secreción de ILP) en las neuronas sensoriales ciliadas es suficiente para detener el proceso de arresto en L1 (Kao *et al*, 2007). Finalmente, también se ha descrito como la activación de los canales de calcio TRPVs ubicados en los cilios neuronales regula

negativamente la secreción de ILP, esto en reflejo de como la percepción sensorial puede regular la entrada a arresto en L1 (Lee & Ashrafi, 2008).

3.5.2 El factor de transcripción CRH-1/CREB y su implicación en el ayuno

En *C. elegans* CRH-1 es el factor de transcripción homólogo a CREB (cAMP-response element-binding protein) el cual, aunque ha sido ampliamente descrito por su rol en el establecimiento de memoria a largo plazo en distintos organismos (Lonze y Ginty, 2002; Kandel, 2012), también se ha reportado que tiene una participación en muchos procesos biológicos, como la supervivencia celular, envejecimiento, diferenciación, control del metabolismo, actividad del sistema inmune, pero también en la regulación de respuesta a estresores como la hipoxia y el ayuno (Mayr & Montminy, 2001; Dahiya *et al*, 2019; Chen *et al*, 2016). Esta amplia gama de actividad de CREB puede radicar en que en el genoma humano hay alrededor de 750,000 sitios de unión CRE (CREB *Response Elements*), los cuales son reconocidos por el dominio bZIP de unión a DNA de CREB; aunque muchos de los sitios CRE se encuentran metilados, por lo cual CREB no tiene injerencia sobre ellos. Sin embargo, un cuarto de todo el genoma o aproximadamente 5,000 genes son sitios CRE accesibles o no metilados, y éstos se encuentran localizados en regiones cercanas a promotores, a 250 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción (revisado en Altarejos & Montminy, 2011).

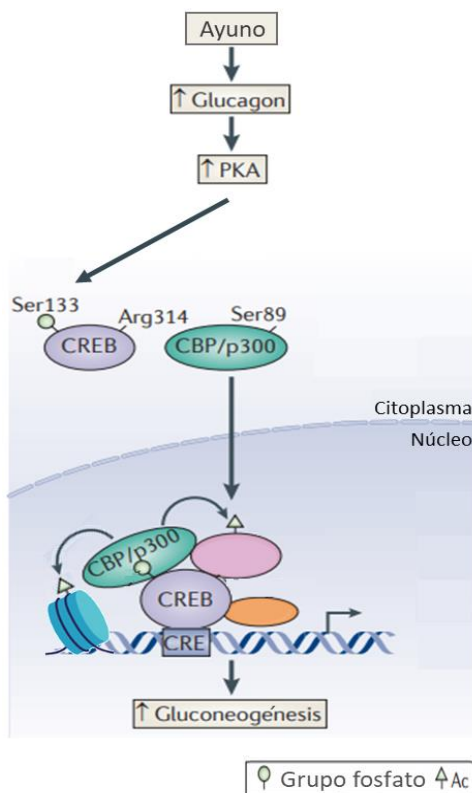


Figura 6. Actividad de CREB en condiciones de ayuno. Se observa la vía de señalización que ocurre en la célula en condiciones de ayuno por un periodo de tiempo corto, en donde ante el incremento de glucagón se estimula la actividad de la cinasa PKA, fosforilando a CREB en la Ser133 y permitiendo su traslocación al núcleo, que junto con CBP/p300 regulan la activación transcripcional de genes de la vía gluconeogénica. p300 es una proteína con un dominio de acetil transferasa, quien a través de esta marca postranscripcional en historias pudiera estar participando en esta regulación (Modificado de Altarejos & Montminy, 2011).

Ahora bien, en *C. elegans*, Suo *et al* (2006), reportaron que en las interneuronas SIA, CRH-1/CREB se activa después de un periodo de ayuno de 6 h en nematodos adultos. Por otro lado, en modelos de mamíferos se conoce que periodos cortos de ayuno (**Figura 6**) ocasionan un incremento de glucagon circulante en el organismo, que promueve la activación de la cinasa PKA quien fosforila a CREB en la Ser133, lo que permite su translocación al núcleo; sitio donde además ocurre la unión con CBP/p300, enzima que se caracteriza por un dominio de acetiltransferasa de histonas, marca asociada con la activación transcripcional.

Finalmente, un reporte reciente en una línea celular de hígado reportó que los homólogos DAF-16 y CBP-1 en *C. elegans* interactúan para regular la respuesta a la exposición de glucocorticoides (Nasrin *et al*, 2000), lo cual refleja cómo estos elementos de dos vías de señalización distintas pueden conjuntarse en la regulación ante un mismo estímulo.

3.5.3 Silenciamiento por RNA de interferencia en *C. elegans*

Por otro lado, resulta interesante conocer si los endo-siRNAs generados en *C. elegans* en una situación de arresto por ayuno podrían tener un efecto de silenciamiento en varios tejidos, como el neural, que afectaran a nivel conductual a los animales que experimentaron el arresto.

En eucariontes se han descrito diversos tipos de sRNA, no obstante, *C. elegans* se destaca por ser el organismo modelo pionero en el que se describió el mecanismo de RNA de interferencia (Fire *et al*, 1998), trabajo que fue galardonado con el premio Nobel en Fisiología en 2006. Este nematodo posee una maquinaria que regula el silenciamiento de manera transcripcional o postranscripcionalmente de mensajeros y transcritos nacientes.

A grandes rasgos, la vía de síntesis comienza a partir de RNAs de doble hebra (dsRNA) exógenos o endógenos, que son escindidos por proteínas de la familia Dicer y los fragmentos resultantes son conocidos como RNAs pequeños de interferencia primarios (siRNAs primarios). Posteriormente, éstos se unirán por complementariedad al transcrito blanco, donde una de las proteínas Argonauta será la encargada de guiar y mediar dicha unión. Finalmente, polimerasas de RNA dependientes de RNA (RdRP por sus siglas en inglés), se encargarán de la amplificación de los siRNA primarios, dando como resultado los siRNA secundarios (**Figura 7.A**). En *C. elegans*, estos siRNA pueden tener injerencia en la misma célula en la que son amplificados, o bien, actuar en otras células y/o tejidos por un mecanismo de internalizados mediado por los canales transmembranales SID-1 y SID-2. Ya en el citosol, la hebra guía del siRNA se une al complejo ribonucleoproteico RISC (*RNA induced silencing complex*, por sus siglas en inglés), el cual a grandes rasgos está conformado

por Argonauta, Dicer, y proteínas accesorias que pueden reconocer marcas postranscripcionales del RNA. Este complejo se va a encargar de cortar al mensajero o transcrito complementario al siRNA, degradándolo y controlando así la abundancia proteica en el caso de complementariedad perfecta, o inhibir su traducción, en el caso de no que haya una complementariedad absoluta entre el siRNA y el mRNA (**Figura 7.B**) (Chapman & Carrington, 2007; Billi *et al*; 2014).

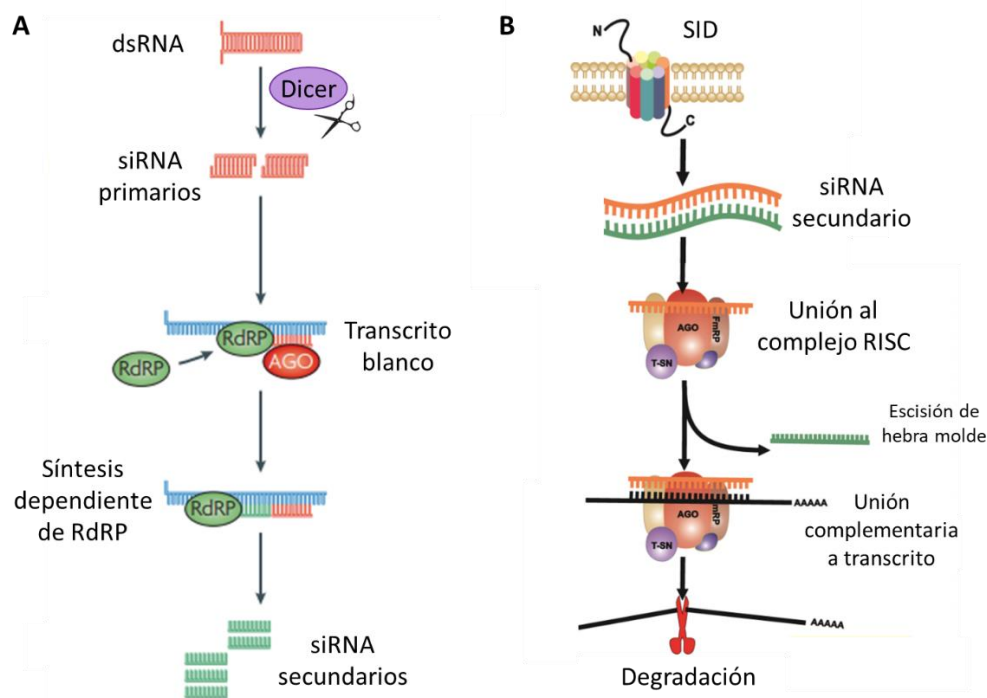


Figura 7. Mecanismo de interferencia por RNA de doble cadena endógeno en *C. elegans*. En **A** se esquematiza la vía general de síntesis de srRNAs, donde dsRNA son procesados por proteínas DICER para dar lugar a siRNA primarios, los cuales son de cadena sencilla y son dirigidos por proteínas argonautas (AGO) a un transcrito blanco para ser amplificados por RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRP) y formar siRNA secundarios para amplificar la señal de silenciamiento (Modificado de Chapman & Carrington, 2007). En **B**, se observa a grandes rasgos la vía de silenciamiento canónica, donde siRNAs son integrados a la célula a través de SID-1, que es un transportador transmembranal, una vez en el citosol, son reconocidos por el complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*) que dirigen por complementariedad la unión del siRNA con el mRNA blanco e inducir su degradación (Modificado de Barnard *et al*, 2012).

Es preciso considerar que, dependiendo del estímulo y con ello la maquinaria proteica específica utilizada, la interferencia por RNAi puede seguir la vía canónica que provee de un silenciamiento postranscripcional inmediato en las células expuestas a dsRNA degradando principalmente mRNAs; o bien la vía nuclear, donde el silenciamiento es a nivel transcripcional, y

comúnmente proteínas de tipo Argonauta unen el siRNA con un transcrito naciente al interior del núcleo, donde además la actividad de la Pol II es inhibida, e incluso, se promueve la acción de proteínas remodeladoras de la cromatina contribuyendo a la regulación a nivel transcripcional; esta vía ocasiona efectos heredables, por lo que se ha asociado a la vía nuclear de RNAi a eventos transgeneracionales (Kalinava *et al*, 2018; Billi *et al*; 2014).

Por otro lado, *C. elegans* produce siRNAs de diversos tipos, encontrando miRNAs, endo-siRNAs (primarios y secundarios), y piRNAs; cada grupo tiene características particulares, las cuales se resumen en la **Tabla 1**; sin embargo, tienen como función común el silenciamiento de genes a través de la degradación de transcritos por su unión por complementariedad ya sea completa o parcial. Cada grupo de siRNAs involucran diversas familias de proteínas para su biogénesis y su función muchas veces se restringe a un tejido o etapa dentro del ciclo de vida del animal particular (Billi *et al*; 2014).

Tabla 1. Clases de sRNA identificados en eucariontes.

Clase	Descripción	Biogénesis y origen genómico	Función
miRNA	microRNA	Procesamiento por proteínas de la familia Dicer y RNasa III	Regulación postranscripcional de transcritos de una amplia gama de genes
siRNA primarios	RNAs pequeños de interferencia	Procesamiento de dsRNA por proteínas de la familia Dicer	Unión a RNA complementario, guía para el inicio de la síntesis secundaria de siRNAs dependiente de RdRP
siRNA secundarios	RNAs pequeños de interferencia	Actividad de RdRPs	Regulación postranscripcional de transcritos. Mantenimiento de la heterocromatina
piRNA	Piwi-interacting RNA	Biogénesis dependiente de Argonautas, pero no de proteínas Dicer	Supresión de transposones. Expresión prominente en línea germinal.

Tomada de Chapman & Carrington (2007) e información de Billi *et al* (2014).

A nivel experimental, se ha reportado en algunos casos que el silenciamiento mediado por dsRNA en *C. elegans* puede persistir por más de 80 generaciones, esto debido a que la misma maquinaria endógena del animal a través de RdRPs se encarga de la amplificación y propagación de endo-siRNAs principalmente en línea germinal (Vastenhouw *et al*, 2006; Fire *et al*, 1998). No obstante, resulta interesante que muchos de estos endo-siRNAs pueden transmitirse de células somáticas a células de la línea germinal; por ejemplo, Devanapally *et al* (2015), demostraron que dsRNA producidos en neuronas (*mobile RNAs*) tienen la capacidad de silenciar genes en otros tejidos

incluyendo la línea germinal, señalando que estos RNAs móviles de procedencia neuronal tenían un efecto de silenciamiento más fuerte en comparación a los provenientes de intestino o músculo (Jose *et al*, 2009). Por lo cual, sería interesante conocer si una desregulación en el metabolismo de endo-siRNAs durante un arresto por ayuno pudiera tener un efecto de silenciamiento a largo plazo que afectaran a nivel conductual a las subsecuentes generaciones.

3.5.3.1 Rol del metabolismo de endo-siRNAs en el ayuno y/o comportamiento

Se ha reportado que el ayuno en *C. elegans* puede inducir un cambio drástico en la expresión genética, donde la transcripción de alrededor del 27 % de los genes que codifican a proteínas se ve alterada, esto incluso constituye un cambio a nivel transcripcional mayor al observado en todas las etapas larvarias durante el desarrollo (Maxwell *et al*, 2012; Rechavi *et al*, 2014). No obstante, la sobrevivencia y recuperación a un evento de arresto inducido por ayuno en gusanos L1 es en parte regulado por las vías endógenas de RNA de interferencia en el gusano, así como la inhibición de genes de la vía de señalización de insulina por parte de micro RNAs (Zhang *et al*, 2011).

También se ha caracterizado tras un periodo de ayuno de 12 horas en larvas L4, que hay un cambio importante en la expresión de miRNAs, evento que contribuye a la regulación del metabolismo, así como del desarrollo ante esa condición de estrés (Garcia-Segura *et al* 2015). Un caso particular es miR-235, que se expresa en las células gliales que rodean a las neuronas quimiosensoras, siendo además uno de los reguladores clave del arresto en L1 (Kasuga *et al*, 2013); no obstante, aún falta por conocer a detalle de qué manera estas moléculas actúan en el organismo en una condición de arresto.

Por otro lado, en *C. elegans* se ha demostrado el involucramiento del metabolismo de siRNAs en el comportamiento. Por ejemplo, en un modelo de aprendizaje asociativo de aversión a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* se demostró que, ante la ausencia de proteínas de la maquinaria endógena de interferencia, los nematodos son incapaces de asociar la exposición a la bacteria como estímulos patógenos; algunas de las proteínas eran el canal SID-2, la proteína Dicer DCR-1, la Argonauta de piRNAs PRG-1, y las polimerasas de RNA RRF-1 y RRF-2 (Kaletsky *et al*, 2020). Lo anterior es reflejo de que la vía de procesamiento de siRNAs es fundamental para el establecimiento de un comportamiento para asegurar la supervivencia del individuo. Particularmente, el trabajo de este grupo ha aportado las únicas evidencias que se conocen al respecto de la importancia del metabolismo y actividad de endo-siRNAs en el establecimiento de una batería conductual asociada a procesos cognitivos, como lo es el aprendizaje y memoria asociativa, por lo que es probable que,

en otros estímulos medioambientales como el ayuno, endo-siRNAs participen en algunos de los comportamientos asociados a la falta de alimento.

4. Antecedentes

El comportamiento de *C. elegans* se modifica ante distintas señales y ambientes, que por su naturaleza estimulan circuitos neuronales sensoriales específicos resultando en comportamientos asociativos o aversivos ante diferentes fuentes de alimentación o señales de peligro (Bono y Maricq, 2005; Hart y Chao, 2010).

Uno de los antecedentes parteaguas para el desarrollo de este proyecto fue el reportado por Kauffman *et al* (2010), ya que si bien se conoce que uno de los ambientes que modifican el comportamiento de *C. elegans* es el ayuno, este grupo reportó que tras 16 horas sin alimento, los nematodos adultos exhiben mayor preferencia al odorante 2-butanona, que es producto del metabolismo de diversas bacterias; lo anterior probablemente se deba a que los animales se encuentran receptivos a cualquier estímulo dada la necesidad de adquirir alimento. Sin embargo, esta observación formó parte de un control en el reporte original, y el enfoque del trabajo no se centró en describir a detalle este comportamiento ni en cómo se regula. Otro grupo de investigación en 2019 se centró en detallar deficiencias conductuales conforme los periodos de ayuno se incrementan, observando que la velocidad de reacción del animal ante un estímulo disminuye, así como la direccionalidad del movimiento se ve afectada (Shimizu *et al*, 2019). Es importante mencionar que en ambos reportes la evaluación de la conducta de los gusanos fue mientras se encontraban ayunados, sin embargo, no se ha explorado a detalle si existen cambios conductuales a largo plazo ocasionados por estos periodos de inanición; por lo que, para evaluarlo se planteó una de las ventajas que representa el uso de *C. elegans* como organismo modelo, ya que periodos de ayuno prolongados en etapas larvarias específicas ocasionan arrestos en el desarrollo reversibles, lo que permitiría conocer las consecuencias a largo plazo en el comportamiento de los animales, al menos a la preferencia de odorantes.

Ahora bien, en cuanto a los mecanismos que actúan en el establecimiento de arrestos y diapausas, se conoce en gran medida la participación del factor transcripcional DAF-16 y particularmente en el sistema nervioso del nematodo (Kaplan & Baugh, 2016), aunque, su rol en la regulación de cambios conductuales en el contexto de ayuno y arrestos inducidos por éste no había sido tan explorada hasta que un reporte reciente de Nagashima *et al* (2019), demostró que en la

neurona sensorial ASER, DAF-16 se transloca a núcleo tras 6 horas en ausencia de alimento en nematodos adultos, causando defectos en eventos de aprendizaje aversivo, lo cual refuerza la participación de la vía de insulina no sólo en eventos conductuales, sino en fenómenos más complejos como el aprendizaje. Este reporte en particular plantea la posibilidad de que DAF-16 regule la actividad de neuronas involucradas en censar estímulos ambientales durante o posterior a arrestos en el desarrollo inducidos por periodos prolongados de ayuno.

Por otro lado, a partir de los trabajos de Suo *et al* (2006) y Lakhina *et al* (2015), en el que demuestran en nematodos adultos que el factor transcripcional CREB/CRH-1 se activa de manera focalizada en las interneuronas SIA tras un periodo de ayuno de 6 h, y que éste se encuentra altamente activo coadyuvando en el establecimiento de un comportamiento en el nematodo en un contexto de memoria asociativa a largo plazo, respectivamente; planteamos la posibilidad de CREB/CRH-1 participe en la regulación de algún cambio conductual que sea consecuencia de un arresto en una etapa temprana de la vida de *C. elegans*, que a pesar de que las evidencias mencionadas fueron con nematodos adultos o periodos cortos de ayuno, arrojan un indicio de que la actividad de este factor transcripcional tiene repercusiones incluso una vez terminado el estímulo que lo activó.

Finalmente, otra de las vías que decidimos abordar es la de interferencia por RNA, esto particularmente a que un reporte de Rechavi *et al* (2014), describió que tras un arresto en L1 inducido por un ayuno de 6 días, promueve una desregulación en la expresión de diversos endo-siRNAs, los cuales se dirigen a genes involucrados en múltiples eventos metabólicos como la regulación de ácidos grasos, recambio de proteínas, así como de resistencia a estrés, longevidad y reproducción, y que de alguna manera, permanecen hasta la tercera generación incluso al mismo nivel que la P0. Donde a su vez, la maquinaria de síntesis y procesamiento de RNA se ve involucrada. Lo anterior es fundamental, debido a que gracias a este reporte se conoce que un arresto en el desarrollo ocasiona cambios a nivel molecular perdurables, y planteamos como una posible consecuencia fenotípica la alteración conductual del animal. En ese sentido, un soporte a esta hipótesis es el trabajo de Kaletsky *et al* (2020), quienes reportaron que la maquinaria de síntesis de endo-siRNAs en *C. elegans* es un importante mediador en la respuesta conductual en modelos de aprendizaje asociativo.

Además, es preciso mencionar que hay trabajos en los que a nivel conductual se ha caracterizado que comportamientos resultantes de protocolos de memoria asociativa al odorante benzaldehído (Remy y Hobert, 2005), así como de memoria aversiva con la bacteria patógena *P. aeruginosa* (Moore *et al*, 2019), pueden ser mantenidos transgeneracionalmente gracias a que la regulación de interferencia de RNA endógena aseguran el mantenimiento de la respuesta fenotípica conductual en la progenie; por lo que sería interesante investigar si un estresor tan fuerte como el

arresto en el desarrollo promueve cambios conductuales que persistan durante el resto del periodo de vida del nematodo, así como en su progenie.

Así pues, aunque el comportamiento de un animal tiene como cimiento programas genéticos que resultan en conductas intrínsecas, se requieren forzosamente de mecanismos altamente dinámicos que respondan a estímulos específicos y de esta manera el animal pueda reaccionar de manera eficiente asegurando su supervivencia y la de su progenie; por lo que estudiar cómo un ambiente estresor como el ayuno desencadena cambios conductuales a largo plazo en *C. elegans* representa una oportunidad única para caracterizar las vías de señalización involucradas en estos procesos.

5. Justificación

Todos los animales son capaces de modificar su conducta y comportamiento ante las condiciones medioambientales cambiantes; esta capacidad de adaptación les confiere una mayor adecuación y supervivencia. Distintos mecanismos están involucrados en los cambios conductuales destacando la plasticidad sináptica, sin embargo, uno de los aspectos menos estudiados a nivel molecular, son los mecanismos que regulan el establecimiento de un comportamiento ante un estímulo de estrés. En este sentido, el estudio del comportamiento del nematodo *C. elegans* representa una oportunidad única para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes que inducen cambios conductuales ante estímulos ambientales adversos como el ayuno.

La mayoría de estos estudios describiendo cambios conductuales inducidos por el ambiente en *C. elegans* han sido meramente descriptivos, y aún es una pregunta abierta cómo se regulan estos comportamientos y qué elementos participan en su establecimiento y permanencia. No obstante, por la evidencia a nivel celular que se conoce durante los arrestos en el desarrollo ocasionados por periodos prolongados de ayuno, en este estudio, por primera vez, nos enfocamos en revelar la participación de factores transcripcionales como DAF-16 y CREB, así como la maquinaria endógena de procesamiento de RNAs pequeños propia de *C. elegans*, específicamente en el establecimiento de un comportamiento a largo plazo en el animal adulto en nematodos que se sometieron a este estrés por ausencia de alimento en etapas larvarias.

Por lo anterior, en este proyecto se pretende establecer un modelo conductual perdurable en respuesta a un estresor medioambiental como el ayuno, a través de los arrestos y diapausas en el desarrollo que induce, para dilucidar el o los mecanismos de regulación que resultan en

comportamientos específicos ocasionados por una situación medioambiental adversa en el nematodo *C. elegans*. Caracterizar estos mecanismos en el nematodo, podría dar luz para comprender en mamíferos (e incluso en humanos) cómo condiciones ambientales adversas extremas tales como la desnutrición en etapas tempranas del desarrollo, pueden tener efectos permanentes en la conducta e incluso contribuir a explicar algunos de los efectos intergeneracionales descritos en situación de hambruna.

6. Hipótesis

En *C. elegans* los arrestos y diapausas inducidos por ayuno se asocian a cambios conductuales en la preferencia de odorantes. Las vías de señalización de insulina, CREB y el metabolismo de RNA participan en el establecimiento de estos cambios en el comportamiento.

7. Objetivo

Determinar si el ayuno modifica la preferencia a odorantes a largo plazo en *C. elegans* y explorar las vías de señalización involucradas en estos cambios conductuales.

7.1 Objetivos particulares

1. Establecer si arrestos o diapausas ocasionadas por periodos prolongados de ayuno desencadenan cambios conductuales persistentes en la preferencia a odorantes en *C. elegans*.
2. Dilucidar si la vía de insulina, a través del factor transcripcional DAF-16 está involucrado en los cambios conductuales inducidos por ayuno.
3. Explorar si el factor de transcripción CREB está involucrado en los cambios conductuales en la preferencia a odorantes inducidos por ayuno.
4. Definir si la maquinaria endógena de procesamiento de sRNA está involucrada en el establecimiento del comportamiento observado tras un ayuno prolongado.

8. Metodología

8.1 Mantenimiento de *C. elegans*

El nematodo *C. elegans* fue cultivado en medio NGM-lite (Nematode Growth Medium lite), que es una modificación del medio NGM originalmente descrito por Sun y Lambie (1997). El medio NGM-lite contiene NaCl 3 mM, bacto triptona 4 %, KH₂PO₄ 22 mM, K₂HPO₄ 3 mM, colesterol 13 mM y agar 20 %, una vez preparado se esteriliza y es colocado en cajas de Petri (60 y 100mm de diámetros) donde se deja secar *over night* (ON). Posteriormente, las cajas son inoculadas con bacteria *E. coli* de la cepa OP50-1 con la finalidad de servir de fuente de alimento para los nematodos. Esta bacteria es crecida por 16h a 37°C en agitación (250 rpm) en medio Luria Bertani (LB) adicionado con estreptomicina (50µg/mL) hasta alcanzar una densidad óptica de (OD₆₀₀ 0.4).

Las cepas utilizadas en este trabajo se enlistan a detalle en la Tabla 2, manteniéndose a 20°C (a excepción de la DR1309, la cual se mantiene a 15°C). En su mayoría, las cepas fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetics Center (CGC) de la Universidad de Minnesota. Para cada experimento se trabajó con gusanos sincronizados en diferentes etapas larvarias; los animales controles y experimentales pertenecieron al mismo lote.

Tabla 2. Cepas de *C. elegans* utilizadas para los experimentos desarrollados en esta tesis.

Cepa	Genotipo	Descripción
N2	Silvestre	
YT17	crh-1(tz2)	Deficiente del ortólogo de CREB en <i>C. elegans</i> , CRH-1, deleción en el dominio bZIP (Kimura <i>et al</i> , 2002).
pcre::gfp *	tzIs3[cre::gfp; lin-15(+)]	Reportero de actividad, promotor con elemento CRE fusionado a la proteína verde fluorescente GFP (Kimura <i>et al</i> , 2002).
pcre::gfp X OH10690	OH10690 (rab-3p(prom1)::2xNLS::Tag RFP)	Cruza de la cepa pcre::gfp con OH10690 (expresión pan-neuronal de TagRFP (Stefanakis <i>et al</i> , 2015)).
GR1307	daf-16(mgDf50)	Mutante con la región codificante para <i>daf-16</i> eliminada (Lee <i>et al</i> , 2003).
DR1309	daf-16(m26); daf-2(e1370)	Doble mutante deficiente de <i>daf-16</i> y <i>daf-2</i> (Larsen <i>et al</i> , 1995).
TJ1052	age-1(hx546)	Mutación en Age-1 (Friedman & Johnson, 1987).
NL3321	sid-1(pk3321)	Mutante nula del transportador <i>sid-1</i> (Tijsterman <i>et al</i> , 2004).

WM207	mut-7(ne4255)	Mutación en la exonucleasa <i>mut-7</i> (Gu <i>et al</i> , 2009).
YY158	nrde-3(gg66)	Mutante nula de la argonauta <i>nrde-3</i> (Guang <i>et al</i> , 2009).
DCL569	mkcSi13 [sun-1p::rde-1(mkc36)::sun-1 3'UTR+unc-119(+)]	Rescate en línea germinal de la mutación indel de la argonauta <i>rde-1</i> (Zou <i>et al</i> , 2019).
SX2499	prde-1(mj207)	Mutación sin sentido de la proteína precursora de piRNAs <i>prde-1</i> (Weick <i>et al</i> , 2014).
YY538	hrde-1(tm1200)	Mutante nula de la argonauta <i>hrde-1</i> (Buckley <i>et al</i> , 2012).
MT17463	set-25(n5021)	Mutante con una deleción correspondiente a la acetil transferasa de histonas <i>set-25</i> (Andersen y Horvitz, 2007).
ZG31	hif-1(ia4)	Mutante con una deleción del segundo, tercero y cuarto exones del factor transcripcional <i>hif-1</i> , pérdida de función (Jiang <i>et al</i> , 2001).
CX3260	odr-10::GFP + lin-15(+)	Reportero del receptor ODR-10 fusionado a GFP (Sengupta <i>et al</i> , 1996).

* Cepa proporcionada por el laboratorio de Coleen Murphy.

8.2 Protocolo de ayunos prolongados

Con la finalidad de inducir estados de arresto y diapausa ya descritos en *C. elegans*, se eligieron 5 etapas dentro del desarrollo larvario del nematodo. Para ello, se partió de un proceso de sincronización en el cual, a partir de cloro y NaOH (5 M), se lisaron nematodos adultos grávidos para la obtención de embriones, los cuales se lavaron 6 veces con buffer M9 (Na₂HPO₄ 17 mM, KH₂PO₄ 23 mM, NaCl 86 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM).

Una vez que los embriones eclosionan en alimento, a excepción de los arrestados en L1, se rastreó cada etapa del desarrollo para inducir los demás estados hipometabólicos. Las larvas L2 se colectaron 8h posteriores, mientras que las L4 a las 48, 52 y 56 h correspondientes a los tiempos early L4, mid L4 y late L4, respectivamente. Éstos últimos se inducen a un estado *bagging* cuya descendencia permaneció en ayuno por 6 días, colectando a los nematodos en etapa dauer. Los animales control se mantuvieron siempre en presencia de alimento posterior a la lisis.

Es importante mencionar que para inducir el ayuno en *C. elegans*, se requiere realizar una ronda de 6 lavados con 15 mL de M9 cada uno, ya que de esta manera se reduce al mínimo la cantidad de bacteria remanente. Las larvas fueron colocadas en cajas sin comida y se mantuvieron así durante

6 días. Tras ese periodo de ayuno prolongado, los nematodos en dauer se recuperaron con buffer M9 suplementado con SDS 1 % como elemento selectivo, dado a que esta diapausa se caracteriza por un engrosamiento en la cutícula y un bajo movimiento faríngeo, rasgos que le confieren resistencia ante este detergente (Cassada y Rusell, 1975). Para la recuperación del resto de las larvas ayunadas en los diferentes estadios, sólo fue con M9. Inmediatamente, con la finalidad de detener el arresto, dichas larvas fueron nuevamente expuestas a la presencia de *E. coli* OP50 en cajas de NGM, y se observaron continuamente hasta que alcanzaran la etapa de adulto joven y evaluar así su comportamiento por ensayos de quimiotaxis (**Figura 8**).

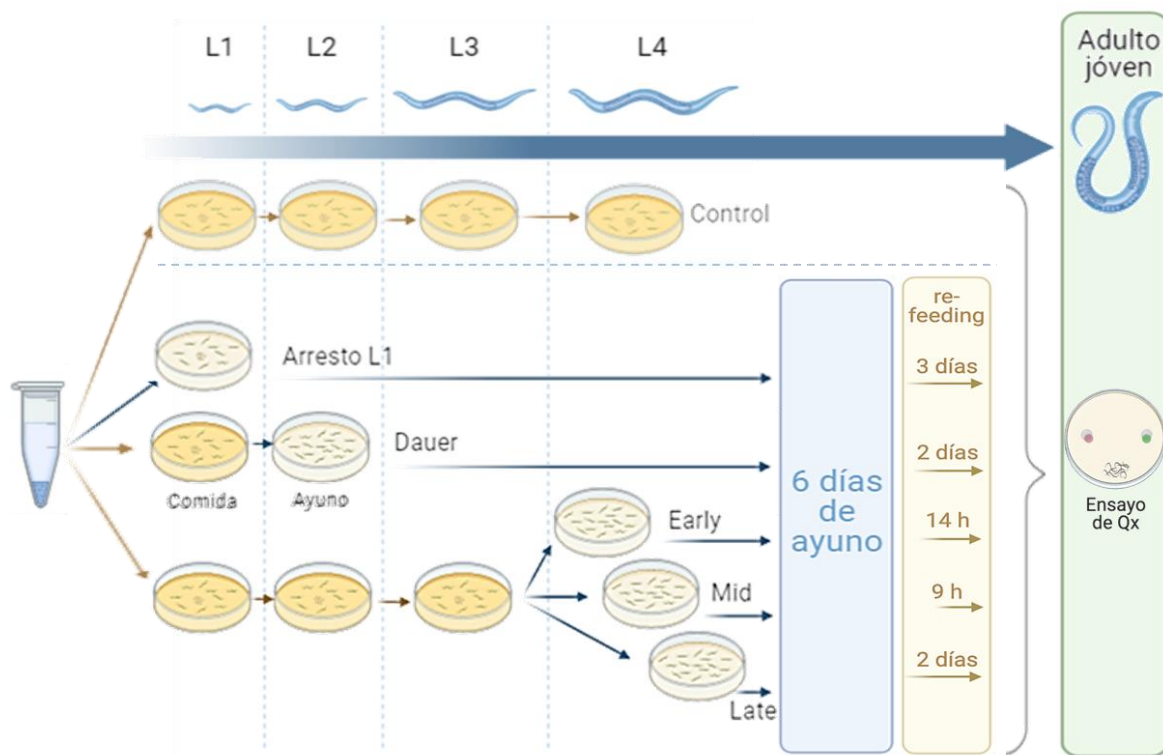


Figura 8. Esquema de la estrategia metodológica seguida para la inducción de estados hipometabólicos o arrestos por ayuno en *C. elegans*.

8.3 Ensayos de quimiotaxis

El comportamiento de los gusanos se evaluó por medio de ensayos de quimiotaxis, para los que se emplearon cajas de 100 mm con NGM y sin bacteria OP50-1. En ellas se trazó un triángulo escaleno imaginario, en donde uno de los vértices funcionó como punto de partida u origen, y los dos restantes como puntos experimentales. En estos últimos, primero se colocó en cada uno 1 μ L de NaN_3 (1 mM), un anestésico que inhibe al complejo IV de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Stannard y Horecker, 1947). Posteriormente, se colocó 1 μ L del odorante de interés en uno de ellos

y en el otro 1 μL del vehículo (etanol 95 %). Un promedio de 150-250 gusanos fueron colocados en el punto de origen y éstos migraron durante un periodo de 2 h. El índice de quimiotaxis (IQ) se calculó de acuerdo con el número de animales ubicados en los puntos experimentales y el número total de gusanos por ensayo, tal como se observa en la **Figura 9**.

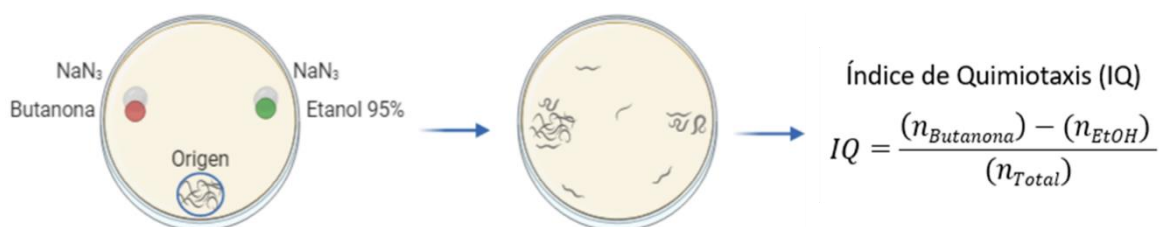


Figura 9. Ensayos de quimiotaxis y ecuación para la obtención del Índice de Quimiotaxis (IQ).

Es importante señalar que, para los gráficos correspondientes a los resultados con ensayos de quimiotaxis, se muestran los índices de cada experimento independiente (N), con sus respectivas réplicas técnicas, número que puede ser variable dependiendo de los animales totales obtenidos en cada experimento.

8.4 Microscopía

Para visualizar las cepas que expresan proteínas reporteras fluorescentes, se procedió con la preparación de portaobjetos con una capa de agarosa al 2 %, colocando 4 μL de NaN_3 (1 mM) con la finalidad de inmovilizar a los nematodos.

La adquisición de las imágenes fue a través del microscopio confocal Zeiss LSM800 y la edición de las mismas con el programa Zen2 blue edition de Zeiss. También se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 con cámara Neo Andor Scmos con sistema de enfriamiento. El análisis para cuantificar la intensidad de fluorescencia, por otro lado, fue con el software Image J (Wayne Rasband), expresando los resultados en unidades relativas de fluorescencia (URF). Por otro lado, los índices de correlación de Pearson para corroborar colocación fueron obtenidos con el software Fiji (Schindelin *et al*, 2012).

8.5 Análisis estadísticos

Todos los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron analizados y graficados con el paquete estadístico GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, US San Diego, California) para Windows y se expresaron como la media estadística \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia se determinó a partir de análisis *t* de student o de varianza (ANOVA de una vía), seguida por una prueba *post hoc* de Bonferroni, para la comparación múltiple entre control y arrestos. Para el caso particular de aquellos datos correspondientes a un único experimento independiente (N=1) se decidió realizar una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron bajo el supuesto de datos no pareados, debido a que el grupo control y el arresto se trataban de grupos independientes. Para todas las pruebas se consideraron estadísticamente significativos aquellos datos con un valor de $p < 0.05$.

9. Resultados

9.1 El arresto en L1 y diapausas inducidas por ayunos prolongados inducen cambios conductuales a la preferencia de odorantes

El primer objetivo de este trabajo fue identificar si un estresor ambiental como el ayuno era capaz de inducir cambios conductuales en *C. elegans*. Para esto, ensayamos si 3 h de ayuno en gusanos adultos jóvenes (cepa silvestre N2) tenían cambios en la preferencia al odorante 2-butanona, donde transcurrido el tiempo en ausencia de alimento, a través de ensayos de quimiotaxis evaluamos si la preferencia basal al odorante cambiaba. Nuestros resultados demostraron que a pesar de que los gusanos en condiciones *ad libitum* muestran una preferencia basal por el odorante 2-butanona de 0.1 (± 0.21) (**Figura 10.A**), esta preferencia se incrementa casi 7 veces después de un ayuno de 3 h llegando a un índice de quimiotaxis (IQ) de 0.73 (± 0.25) cuando el odorante se les presenta al 0.1 % (**Figura 10.A**). Estos resultados nos muestran que un ayuno corto es suficiente para desencadenar una atracción a la 2-butanona.

Por lo anterior, decidimos evaluar si condiciones extremas que supusieran un reto mucho mayor para el animal como son los arrestos y diapausas, también inducían cambios conductuales y si éstos eran permanentes, pudiéndose observar aún después de que los animales se recuperaran en ambientes favorables. Para esto, se ayunaron nematodos silvestres N2 sincronizados en distintas etapas larvarias durante 6 días para inducir diferentes arrestos en el desarrollo, es decir arresto en L1, Dauer, así como en L4 (early, mid y P0 late L4/F1 Dauer). Posteriormente, los animales ayunados por 6 días se volvieron a alimentar permitiéndoles alcanzar la etapa de adulto joven para entonces evaluar por ensayos de quimiotaxis su comportamiento ante diferentes odorantes.

En primera instancia, se evaluó la preferencia por 2-butanona mostrando que tanto el arresto en L1 como el resto de las diapausas ocasionan que los animales muestren un aumento significativo en la quimiotaxis (**Figura 10.A**). Esto demuestra que un estrés durante el desarrollo y la inducción de estados hipometabólicos en *C. elegans* ocasiona cambios conductuales que perduran a largo plazo aun cuando el ambiente es de nuevo favorable.

Posteriormente, evaluamos si se trataba de una respuesta específica para la cetona 2-butanona, o si ocurría algún cambio en la preferencia con otros odorantes, por lo que decidimos evaluar la quimiotaxis a los odorantes benzaldehído y citronela posterior a la inducción del arresto en L1, dauer y de la diapausa reproductiva del adulto provocados por ayuno. De manera inesperada, los diferentes arrestos provocan una disminución a la preferencia por estos dos odorantes: con

benzaldehído se observó un decremento en el IQ de $0.51 (\pm 0.04)$ en nematodos alimentados, a $0.19 (\pm 0.4)$ en gusanos arrestados en L1. En el caso de dauers se observa un IQ de $0.0 (\pm 0.04)$ y cercano a 0.1 para la diapausa reproductiva del adulto que correspondería al ayuno durante la etapa L4 (mid y late) (**Figura 10.B**). En el caso del odorante citronela la preferencia natural registró un IQ de 0.29 , sin embargo, únicamente fue posible observar que tras un arresto en L1 ésta disminuye a -0.3 y en arresto mid L4 el índice observado fue de -0.47 , resultando en un comportamiento aversivo a este odorante (**Figura 10.C**). Lo anterior es un efecto opuesto al observado con la 2-butanona, que podría asociarse a una disminución en la sensibilidad a estos odorantes. En conjunto, estos resultados sugieren que los cambios conductuales inducidos por ayunos prolongados son específicos para distintos odorantes y conductas en *C. elegans*.

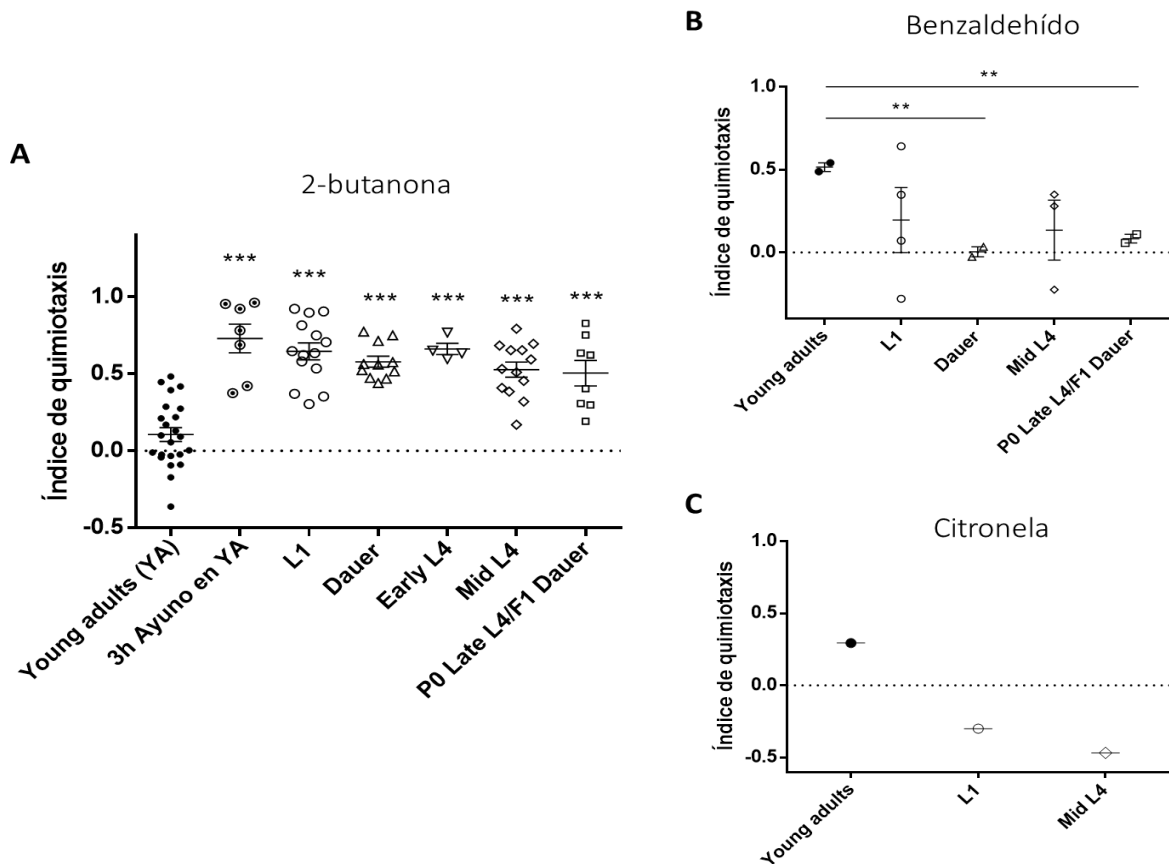


Figura 10. Estados hipometabólicos inducen cambios conductuales a largo plazo en la cepa silvestre N2. En **A** se observan los índices de quimiotaxis (IQ) a la 2-butanona (0.1 %) después de 3 h de ayuno en adultos jóvenes o tras la recuperación de los estados hipometabólicos inducidos por 6 días de ayuno en larvas L1 (N = 6 en ayuno de 3 h, N = 5 en L1, N = 3 en Dauer y en P0LateL4/F1Dauer, N = 4 en MidL4 y N = 1 en Early L4). En **B** se observa la preferencia a benzaldehído (N = 2 en L1 y MidL4, N = 1 en Dauer y P0LateL4/F1Dauer) y en **C** a citronela (N = 1); tras la recuperación de los estados hipometabólicos señalados ocasionados por ayuno de 6 días. En todas las gráficas los datos se muestran con \pm SEM, donde $p < 0.001$ (***) y $p < 0.01$ (**) son significativamente diferentes al control o adultos jóvenes y cada punto representa un ensayo de quimiotaxis (150-250 gusanos en promedio por cada uno).

Los reportes de Rechavi *et al* (2014) y Jobson *et al* (2015), describen que el arresto en L1 induce un efecto fenotípico transgeneracional que consiste en una alteración persistente en la regulación de sRNAs que de alguna manera prolongan el tiempo de vida de los nematodos; consideramos importante evaluar si el efecto antes observado (**Figura 10.A**) persistía en la progenie de estos animales bajo nuestras condiciones experimentales. Para lo cual, conservamos a la descendencia inmediata de animales que sufrieron un arresto en L1 y se recuperaron de éste, la F1 siempre estuvo en presencia de alimento y cuando turnaron en adultos jóvenes evaluamos la preferencia basal a 2-butanona. Nuestros resultados demostraron que la preferencia a este odorante se mantenía tan alta en la generación F1 como en sus progenitores que fueron expuestos al ayuno de 6 días en la etapa L1 (IQ 0.76 ± 0.22) (**Figura 11**). Esto constituyó una de las razones por las que los siguientes experimentos se desarrollaran únicamente con el arresto en L1, además de la practicidad técnica que representa.

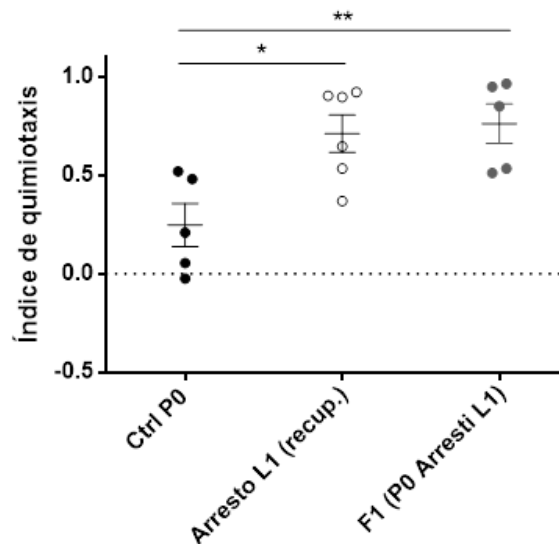


Figura 11. El arresto en L1 de la generación P0 induce cambios conductuales intergeneracionales en la cepa silvestre N2. Se muestra el índice de quimiotaxis correspondiente a la preferencia basal al odorante 2-butanona de gusanos recuperados de un arresto en L1, así como su progenie (F1), siendo que ésta última se mantuvo en condiciones *ad libitum* de alimento. N = 2, los datos se muestran con \pm SEM, donde $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**), cada punto representa un ensayo de quimiotaxis con 150-250 gusanos en promedio.

El hecho que detectemos un cambio conductual intergeneracional inducido por un arresto en L1 ocasionado por un ayuno prolongado resulta de suma relevancia, ya que fuimos capaces de detectar cambios perdurables a nivel conductual, en lo que se refiere a la quimiotaxis a odorantes, que no habían sido reportados con anterioridad en *C. elegans*. Estos resultados corroboran que un ambiente, en este caso el ayuno, es capaz de modificar la conducta a largo plazo tanto en la P0 como en la F1. Además, sugiere que este evento pudiera ser transgeneracional si el efecto perdurase por al menos tres generaciones consecutivas, reflejo de un mecanismo en el cual es posible heredar comportamientos resultado de un evento medioambiental aparentemente perjudicial para la especie, y cuyo objetivo pudiera ser el favorecer la supervivencia de la progenie ante condiciones adversas.

9.2 El arresto en L1 ocasiona cambios en la expresión del receptor a odorantes ODR-10

Con la finalidad de conocer si los cambios conductuales observados en la preferencia a odorantes estaban ligados a cambios en la expresión de alguno de los receptores a estos compuestos volátiles, decidimos estudiar al receptor transmembranal ODR-10 de las neuronas AWA, cuyo único ligando conocido es el odorante diacetilo. Esto se hizo utilizando la cepa reportera CX3260 que expresa al receptor ODR-10 fusionado a la proteína verde fluorescente GFP. En estos animales, observamos que tras 6 días de ayuno en la etapa L1 ocurre un aumento importante en la expresión del ODR-10 pudiéndose observar incluso la silueta de los cilios de este par neuronal (**Figura 12**). No obstante, este incremento sólo ocurre al momento del arresto por ayuno, ya que como se puede observar en la **Figura 12**, no hay diferencia aparente entre los animales adultos que permanecieron en alimento en todo momento, o aquellos que se recuperaron del arresto inicial en L1.

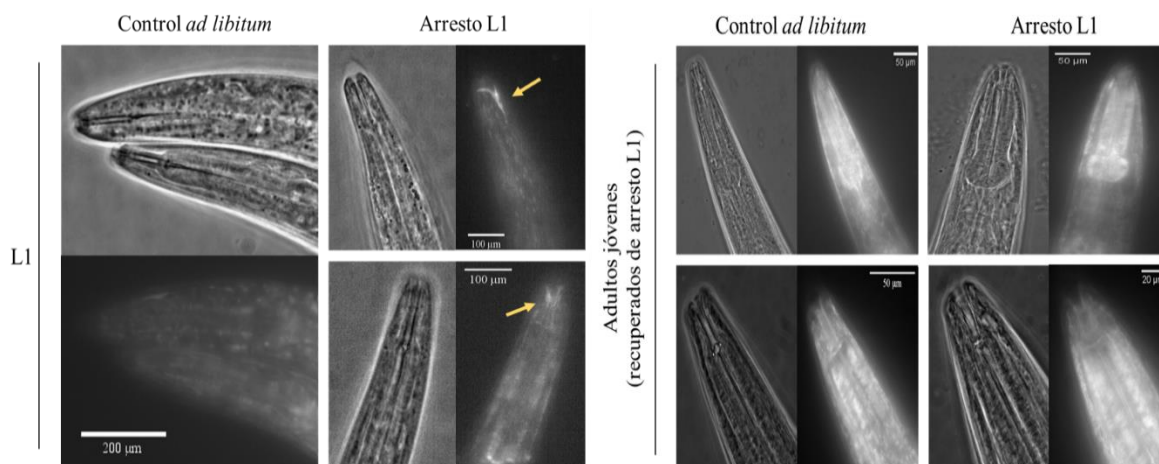


Figura 12. Incremento de la expresión del odoreceptor ODR-10 neuronal ocasionado por un arresto en L1. Se utilizaron nematodos que expresan la proteína transmembranal ODR-10 fusionada al reportero GFP de la cepa CX3260. Se observan animales en etapa L1 en condiciones *ad libitum* de alimento y en arresto en L1 después de 6 días de ayuno. Ala derecha se observan animales adultos jóvenes en condiciones *ad libitum* de alimento y animales adultos jóvenes que se recuperaron en comida tras el arresto de 6 días en L1. Cada imagen de fluorescencia va acompañada por su contraparte en campo claro (N = 1) El incremento de ODR-10 en animales arrestados en L1 se señala con flechas.

Lo anterior apunta a que, si bien el ayuno puede inducir una sobreexpresión de ODR-10 durante el arresto en L1, ésta no se mantiene cuando los animales se recuperan del ayuno y llegan a adulto. No obstante, sería importante evaluar el comportamiento de los nematodos al odorante diacetilo, único ligando conocido para ODR-10 y, además, determinar la expresión de los receptores para benzaldehído y citronela durante y posterior al arresto en L1, con la finalidad de conocer si el patrón de expresión es similar al observado con ODR-10.

9.3 El cambio de comportamiento resultante del arresto en L1 depende de la vía de señalización de insulina

Como se mencionó en el apartado introductorio de este trabajo, una de las vías de regulación más importantes del proceso de arresto por ayuno es la vía de señalización de insulina, donde uno de los elementos clave es el factor transcripcional DAF-16 (ortólogo de FOXO en mamíferos) que está involucrado con longevidad, metabolismo y respuesta a estrés (Lapierre y Hansen, 2012). Por esta razón, en esta tesis decidimos comprobar el papel regulatorio de la vía de insulina en la respuesta conductual observada posterior a la inducción de un arresto inducido por ayuno en L1. Para ello, se utilizaron cepas mutantes donde la vía de insulina está inactivada. A continuación, se describen los resultados:

En la cepa carente de *daf-16(mgDf50)* (GR1307) se observó que una vez recuperados a adultos jóvenes los nematodos arrestados en L1 no muestran un aumento en el índice de quimiotaxis posterior al ayuno como lo hace la cepa silvestre (**Figura 13.A**), lo cual puede ser indicio de que el factor transcripcional FOXO/DAF-16 tiene un papel relevante en el cambio de conducta inducido por ayuno y el estado hipometabólico. En ese sentido, otro de los elementos de la vía es DAF-2, un receptor a péptidos tipo insulina que es, además, un regulador negativo de DAF-16, impidiendo su translocación al núcleo a través de una cascada de fosforilaciones. En una doble mutante de *daf-16* con *daf-2*, los animales no mostraron un cambio en su preferencia por 2-butanona posterior a la recuperación de un ayuno de 6 días en la atapa larvaria L1 (**Figura 13.B**). Estos datos apoyan la importancia de la vía de insulina por DAF-16 en el efecto conductual observado tras un arresto en el desarrollo; aunque, para confirmar totalmente esto último, restaría confirmar que en la mutante de *daf-2*, se observa un incremento a la preferencia por 2-butanona.

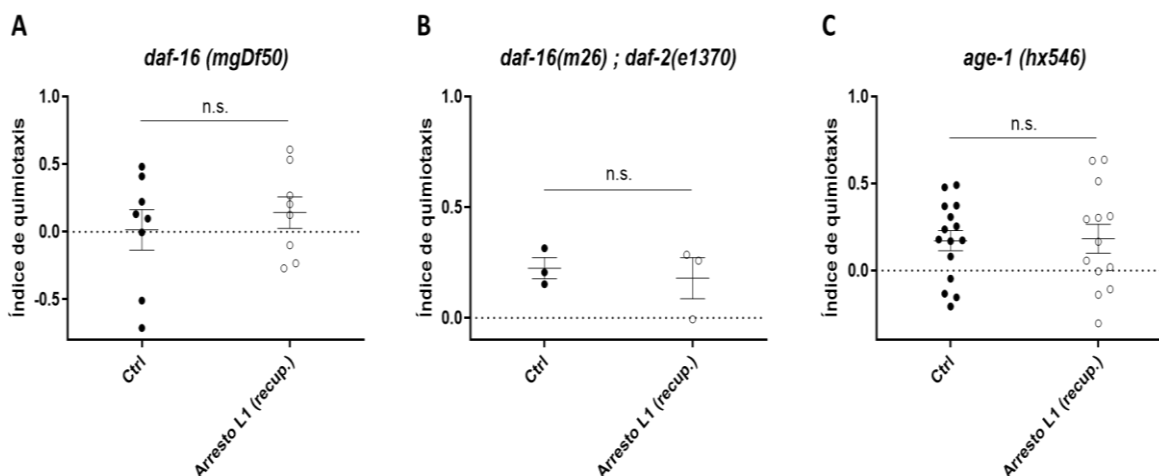


Figura 13. El cambio conductual resultante del arresto en L1 depende de la vía de insulina. En A se observa la preferencia a 2-butanona tras la recuperación de un arresto de 6 días en L1 en la cepa mutante de

daf-16 (N = 3), mientras que en **B** los índices de quimiotaxis correspondientes a la doble mutante de *daf-16;daf-2* (N = 1). Por otro lado, en **C** la quimiotaxis de adultos jóvenes recuperados del ayuno en L1 de la mutante de *age-1* (N = 5). Los datos se muestran con \pm SEM y cada punto representa un ensayo de quimiotaxis (150-250 gusanos en promedio por cada uno).

Otro abordaje a la vía de insulina fue evaluar una mutante de *age-1(hx546)*, la cual carece de la proteína del complejo PI3K que se encuentra río abajo de la activación del receptor DAF-2, que como parte de la cascada de fosforilaciones impide la traslocación a núcleo de DAF-16 (Baugh, 2013). Dado que DAF-2 es un regulador negativo de DAF-16, se esperaría que en la mutante de *age-1* no interviniera en la activación de DAF-16 en respuesta al ayuno y, por tanto, que los animales recuperados del arresto en L1 demostraran una preferencia marcada por 2-butanona. Por lo que, con esta mutante seguimos el mismo protocolo de ayuno por 6 días en nematodos L1 y posterior al periodo de realimentación, en adulto joven evaluamos por ensayos de quimiotaxis la preferencia basal a 2-butanona. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que los animales mutantes de *age-1(hx546)* no presentan un aumento en la preferencia a 2-butanona al recuperarse del arresto en L1 en comparación a animales *age-1* no ayunados (**Figura 13.C**), lo cual podría sugerir que AGE-1 se encuentra activo incluso una vez finalizado el arresto y, por tanto, su participación es importante en la respuesta conductual. No obstante, AGE-1 como parte del complejo PI3K, participa en otras vías de señalización (varias relacionadas a estrés) y su activación no depende exclusivamente de DAF-2, por lo que este resultado no desecha del todo la hipótesis sobre la importancia de DAF-16.

Por lo anterior, nos preguntamos si la respuesta observada al incremento en la preferencia a 2-butanona en la cepa silvestre de *C. elegans* (**Figura 10.A**) se debía a que varias vías de señalización en estrés se mantenían activas a pesar de la recuperación del arresto. Para evaluar esta posibilidad, consideramos relevante evaluar alguna otra proteína de respuesta a estrés, por lo que decidimos evaluar al factor de transcripción HIF-1 el cual se ha descrito como elemento importante en respuesta a hipoxia en distintos organismos (Wagner, 2011). En este caso, la mutante de *hif-1(ia4)* mostró un leve incremento (aunque no significativo) en la preferencia a 2-butanona después del desarresto, aunque al tratarse de 1 N experimental, es preciso corroborarlo con la adición de más réplicas independientes (**Figura 14**). De ser el caso que se confirme un incremento en la preferencia a 2-butanona en animales que fueron ayunados, sugeriría que la vía de HIF no participa en los cambios conductuales inducidos por los estados hipometabólicos inducidos por ayuno.

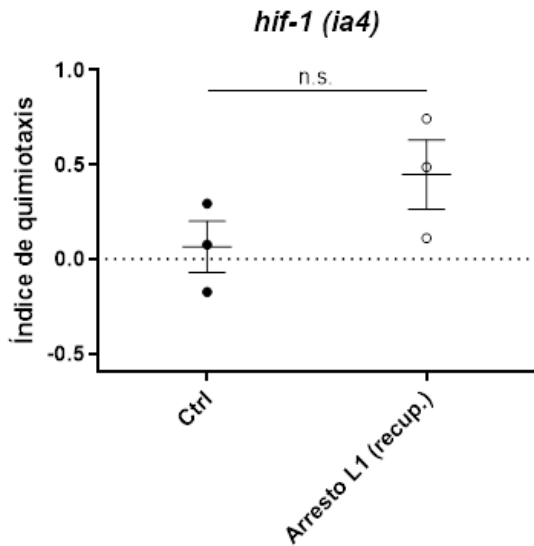


Figura 14. La actividad de HIF-1 durante el cambio conductual resultante del arresto en L1. Índices de quimiotaxis correspondientes a gusanos adultos jóvenes que fueron arrestados en L1 por 6 días en la cepa mutante de *hif-1*. Los datos se muestran con \pm SEM, N = 1 con 3 réplicas técnicas de un experimento con 150-250 gusanos en promedio por cada ensayo.

Además, tal como corroboramos en la cepa *wild type* N2, donde la primera generación (F1) a pesar de nunca haber experimentado un arresto, muestra una preferencia exacerbada a 2-butanona, al mismo nivel que sus progenitores (P0) que durante la etapa larvaria L1 se ayunaron por 6 días (**Figura 11**); decidimos evaluar si este evento era dependiente también de la actividad de DAF-16. Por lo que, al trabajar con la mutante nula de *daf-16(mgDf50)* y realizar el mismo experimento para evaluar la preferencia basal al odorante en la F1 de animales que se arrestaron en L1, notamos que al igual que en la **Figura 13.A**, en la P0 no hay diferencias en la preferencia a 2-butanona comparado al control en condiciones *ad libitum* de alimento, pero este fenotipo conductual se mantiene en la F1 (**Figura 15**), reflejo de la importancia de DAF-16 en el establecimiento de un comportamiento que conocemos se mantiene en la descendencia inmediata tras un estímulo estresor, como es el arresto por ayuno.

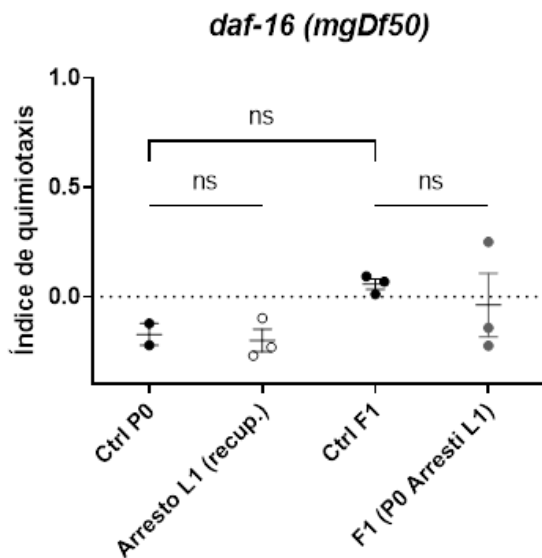


Figura 15. El cambio conductual resultante del arresto en L1 depende de *daf-16*. Índices de quimiotaxis correspondientes a gusanos arrestados en L1 (F0), así como su progenie inmediata (F1) en la cepa mutante de *daf-16*. Los datos se muestran con \pm SEM; N = 1 con 3 réplicas técnicas de un experimento con 150-250 gusanos en promedio por cada ensayo.

En conjunto, estos resultados apuntan a la relevancia de la señalización de insulina en *C. elegans* para regular la fisiología del proceso de arresto, que es fundamental en las consecuencias a nivel conductual observadas a largo plazo en los nematodos que sufrieron un estresor fuerte durante el desarrollo, así como de su progenie inmediata (F1), siendo que la primera generación de los nematodos ayunados muestra una conducta similar a sus progenitores.

9.4 El ayuno induce un incremento en la quimiotaxis a 2-butanona dependiente del factor de transcripción CREB

Con la finalidad de conocer la implicación de CREB en la conducta observada por la falta de alimento, así como su posible participación como un activador de vías de estrés celular se sometió a la cepa YT17 (deficiente de CREB/CRH-1) a 3 h de ayuno. El factor de transcripción CREB ha sido implicado en procesos de memoria a largo plazo en distintos organismos, desde *C. elegans* hasta mamíferos (Altarejos & Montminy, 2011). Interesantemente, en la cepa carente de CREB no fue posible observar cambios en la quimiotaxis a 2-butanona en comparación a los gusanos que no fueron ayunados (**Figura 16**), lo que demuestra que CREB es requerido para mediar la respuesta conductual inducida por ayuno en *C. elegans*.

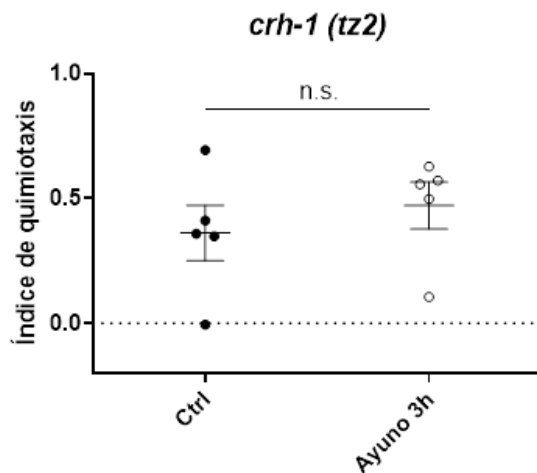


Figura 16. El factor de transcripción CREB es necesario en el cambio conductual inducido por periodos cortos de ayuno. Gusanos adultos jóvenes de la cepa YT17 (mutante nula de CREB) se mantuvieron por 3 h sin alimento y posteriormente se evaluó su preferencia a 2-butanona. Los datos se muestran con \pm SEM; N = 5, cada punto representa un ensayo con 150-250 gusanos en promedio por cada réplica.

Ante el involucramiento de CREB/CRH-1 en el cambio conductual, decidimos explorar si el ayuno de 3 h en adultos jóvenes estaba induciendo la expresión de CREB en *C. elegans*. Para esto, empleamos la cepa reportera *pcre::gfp*, la cual posee un promotor con el elemento CRE fusionado con la secuencia de la proteína GFP. Para confirmar que el fenotipo conductual resultante del ayuno en la cepa reportera no fuera distinto al observado en la cepa silvestre, se evaluó la preferencia al odorante en la cepa *pcre::gfp* donde corroboramos el mismo incremento en el índice de quimiotaxis

inmediatamente después del ayuno (**Figura Sup. 1**). Una vez corroborado este comportamiento, se evaluó la expresión del reportero *pcre::gfp* por microscopía confocal donde observamos que células con morfología neuronal y ubicadas anatómicamente cerca del anillo nervioso en la cabeza del animal muestran una fluorescencia que no se observa en los gusanos control (**Figura 17**). Estos resultados coinciden con un reporte previo de Suo *et al* (2006), donde se identificó a las interneuronas SIA como sitios donde CREB se expresa tras un ayuno de 6 h.

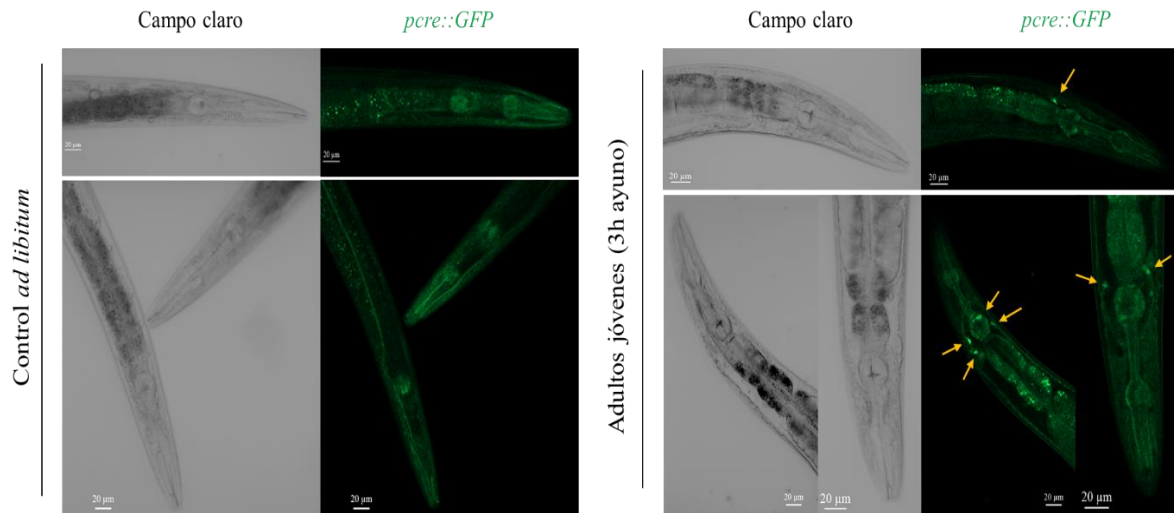


Figura 17. La expresión del reportero *pcre::gfp* se induce durante y tras un periodo corto de ayuno. Imágenes de microscopía confocal de gusanos reporteros que poseen un arreglo extracromosomal para expresar GFP bajo el promotor de CREB. Se observa un incremento focalizado de la fluorescencia en células de la cabeza de nematodos (flechas) que fueron ayunados por 3 h que podrían ser neuronas (N = 1).

Ahora bien, para corroborar la participación de CREB en los cambios conductuales inducidos por arresto en L1, se retomó el mismo esquema experimental de 6 días de ayuno con la cepa YT17 deficiente del ortólogo de CREB en *C. elegans*, CRH-1, la cual tiene una delección en el dominio bZIP (Kimura *et al*, 2002). Aunque quizás se sugiera una tendencia, las diferencias en el índice de quimiotaxis entre animales control y ayunados no fueron estadísticamente significativas en los animales carentes de *crh-1* (**Figura 18**). Este resultado confirma la participación de CREB en la respuesta conductual inducida por el arresto en L1 inducido por ayuno prolongado en *C. elegans*.

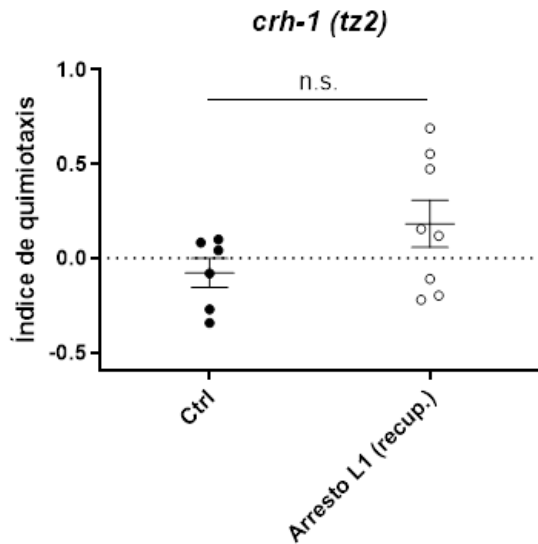


Figura 18. El factor de transcripción CREB es necesario en el cambio conductual inducido por arresto en L1. Se cuantificó el índice de quimiotáxis a 2-butanona en gusanos adultos jóvenes de la cepa YT17 (mutante nula de CREB/CRH-1) después de que se recuperaron de 6 días en arresto en L1 sin comida. Los datos se muestran con \pm SEM (N = 3, cada punto representa un ensayo con 150-250 gusanos en promedio por cada réplica).

Por otro lado, nos interesaba corroborar que la inducción de CREB en respuesta al ayuno ocurriera en el sistema nervioso de *C. elegans* por lo que se realizó una cruza de la cepa reportera de CREB (*pcre::gfp*) con la cepa OH10690 que expresa RFP en todas las neuronas, esto con la finalidad de verificar si había activación neuronal de CREB en gusanos ayunados por 6 días en L1 y si esta activación se mantenía una vez recuperados del arresto en el sistema nervioso del gusano.

Nuestros análisis en los animales dobles reporteros (CREB/neuronas) demostraron que tras 6 días de arresto en L1 los nematodos exhiben una fluorescencia clara en GFP en varias células a lo largo de todo el cuerpo del animal, corroborado por la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de GFP (**Figura 19.A y C**); siendo que pocas de las células con señal de CREB colocalizan con la marca neuronal (RFP), corroborada por los índices de correlación de Pearson en estas células. Sin embargo, la mayoría de las células con señal en GFP parecieran pertenecer a la región del intestino.

Por otro lado, una vez recuperados del arresto y los gusanos alcanzaran a ser adultos jóvenes, CREB pareciera seguir activo, pero en distintas células no neuronales, dado que únicamente poseen señal en GFP; éstas se encuentran localizadas en la región inicial del intestino, lo que pareciera formar parte del primer y segundo anillo de este tejido, constituido por 6 células multinucleadas con 6 núcleos cada uno. Es importante señalar también que fue difícil hallar neuronas con la marca de CREB a pesar de observar fluorescencia basal en algunas células neurales de animales que nunca fueron ayunados (**Figura 19.B**). Asimismo, la cuantificación de las URF (unidades relativas de fluorescencia) para GFP muestra un leve incremento en la fluorescencia en los animales recuperados de arresto de los controles nunca ayunados (**Figura 19.D**), en comparación del aumento dramático en los animales en L1 (**Figura 19.A y C**).

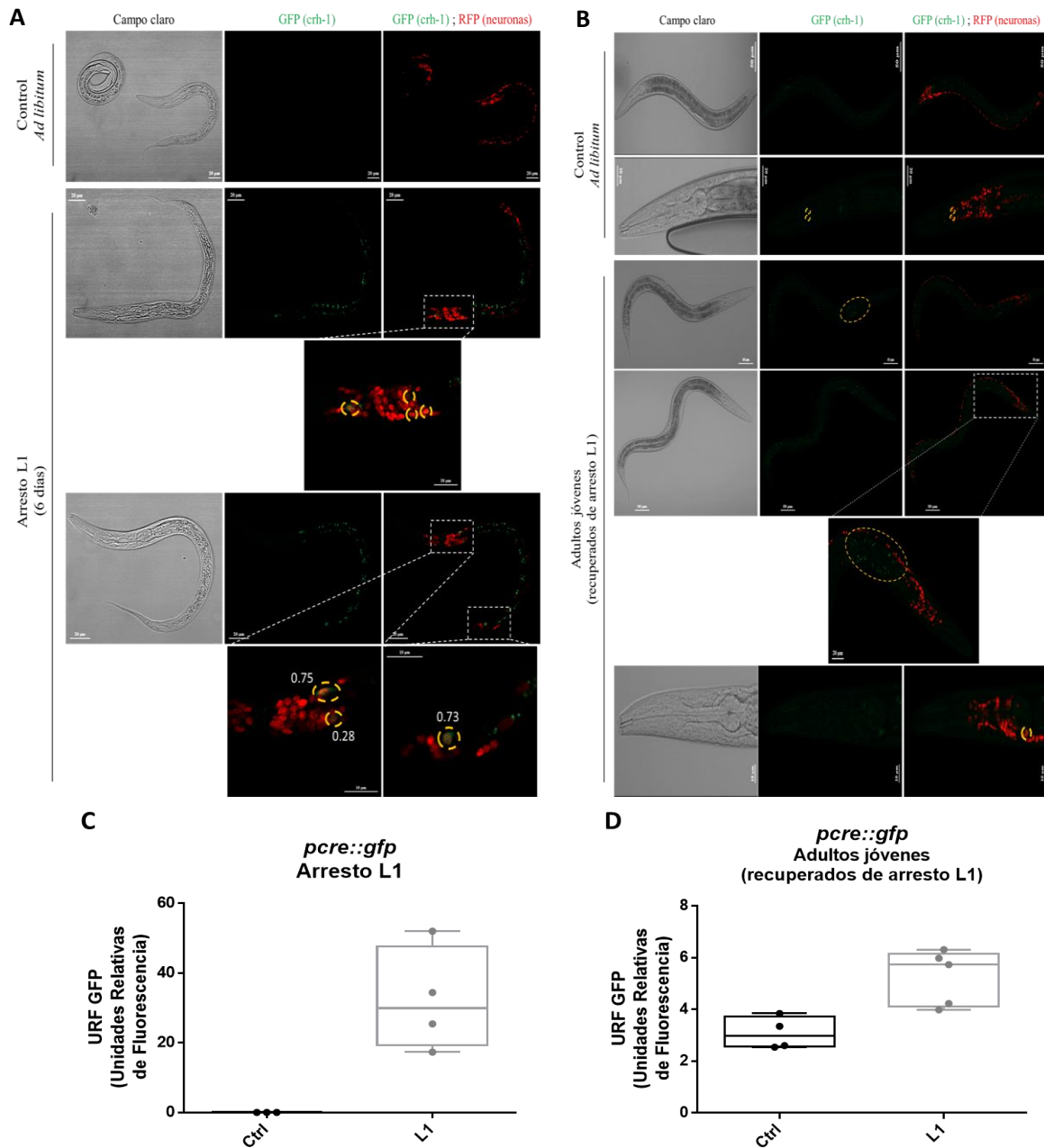


Figura 19. La expresión de CREB se incrementa durante y tras un arresto en L1 en *C. elegans*. **A** y **B** corresponden a imágenes de microscopía confocal de nematodos que expresan RFP en todas las neuronas junto con GFP bajo el promotor de CREB, en animales control (comida *ad libitum*) o ayunados por 6 días para inducir un arresto en L1. Se muestran acercamientos para observar a detalle las neuronas (RFP) del anillo nervioso donde se indujo CREB (GFP) en nematodos arrestados durante 6 días en L1, mostrando además los índices de correlación de Pearson corroborando la colocación de ambas marcas (**A**), mientras que en **B** corresponden a imágenes de nematodos adultos que siempre estuvieron alimentados y gusanos que se recuperaron del arresto en L1, con acercamientos a la zona de la cabeza donde se aprecia un conjunto de células con fluorescencia únicamente en GFP. Además, se muestra la cuantificación correspondiente a la intensidad de fluorescencia de GFP durante el arresto por 6 días en L1 (en **C**) y en adultos jóvenes desarrestados (en **D**), con \pm SEM y cuyos datos se encuentran expresados en unidades relativas de fluorescencia o URF (N = 1).

Los datos anteriores demuestran que la actividad de CREB es fundamental para el establecimiento de un aumento en la preferencia al odorante 2-butanona posterior a periodos de ayuno cortos (3 h) y prolongados (6 días), estos últimos resultando en un arresto en el desarrollo. Además, su activación ocurre en células neuronales y posiblemente intestinales, lo que demuestra una actividad dinámica entre tejidos por su localización temporal a lo largo del establecimiento del arresto y su posterior recuperación, que resultará fundamental en el establecimiento de una conducta en este modelo.

9.5 Múltiples vías de procesamiento de RNA participan en establecimiento conductual tras un arresto en L1

Uno de los antecedentes de este trabajo es el reporte de Rechavi *et al* (2014) en el cual se observó que existen mecanismos transgeneracionales en *C. elegans* a través de la transcripción de *small RNA* (sRNA) que confieren a los nematodos mayor longevidad y resistencia al estrés tras un arresto en L1. En ese sentido, y con la finalidad conocer si la mayor preferencia al odorante 2-butanona que nosotros observamos tras el arresto en L1 depende del metabolismo de RNA y disectar qué vía en específico está involucrada, realizamos un screening con varios animales mutantes de proteínas involucradas en el procesamiento de RNA a distintos niveles. En todas ellas, el experimento consistió en inducir un arresto en L1 mediante 6 días de ayuno, para posteriormente dejarlos alcanzar el estado adulto joven en presencia de comida para entonces evaluar su preferencia a 2-butanona al 0.1 %

El primer abordaje fue evaluar si el transporte de RNA de doble cadena era necesario para coadyuvar en la regulación del cambio conductual que observamos a la preferencia de 2-butanona en animales adultos que sufrieron un arresto por ayuno en L1. Utilizamos una cepa deficiente del canal transmembranal SID-1 encargado de la translocación de RNA de doble hebra (dsRNA) dentro de la célula mediando la interferencia de RNA sistémico (Shih y Hunter, 2011). En esta cepa observamos que tras la recuperación del arresto en L1 los gusanos no aumentan su preferencia por la 2-butanona (**Figura 20.A**) e incluso exhiben un decremento estadísticamente significativo en la preferencia a 2-butanona (de 0.1 ± 0.16 control vs -0.09 ± 0.15 ayunados), reflejo de la importancia de la presencia de este transportador en la quimiotaxis del gusano.

Otras proteínas relevantes en el procesamiento de dsRNA en *C. elegans* son MUT-7 y RDE-1, la primera una exonucleasa que forma parte de la vía canónica del RNAi endógeno en línea germinal y la segunda, parte del complejo RISC encargado de la degradación del mRNA. Animales carentes tanto de *mut-7* como de *rde-1* presentaron un incremento en el índice de quimiotaxis a la 2-

butanona posterior al ayuno (**Figura 20.B y 20.C**), lo que descarta la participación de estas proteínas en el establecimiento del cambio conductual inducido por ayuno en L1. Cabe mencionar, que la particularidad de la cepa carente de *rde-1(mkc36)* (DCL569) es que la expresión de RDE-1 únicamente ocurre en la gónada, lo que sugiere que la presencia de RDE-1 en la gónada (más que en el resto de los tejidos) es suficiente para mantener el cambio de comportamiento a la preferencia a 2-butanona tras un arresto en L1 (**Figura 20.C**).

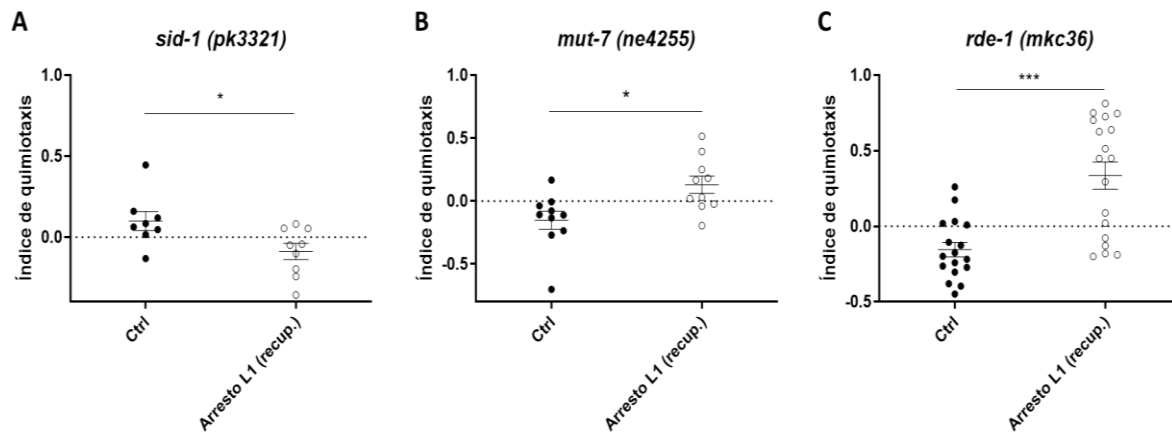


Figura 20. Preferencia por 2-butanona posterior al ayuno en mutantes de proteínas de metabolismo de RNA. Se evaluó el índice de quimiotaxis en adultos jóvenes posterior al arresto en L1 por 6 días de ayuno en animales mutantes de proteínas involucradas en las vías endógenas de RNA de interferencia del gusano: el canal SID-1 (**A**, N = 3), la exonucleasa MUT-7 (**B**, N = 4) y la proteína RDE-1 como parte del complejo RISC (**C**, N = 6). Para todos los ensayos, los datos se muestran con \pm SEM, (*) $p < 0.05$ y (***) $p < 0.001$, cada punto representa una réplica para las que se contó con 150-250 gusanos en promedio por cada una.

Por otro lado, también se evaluó la respuesta de animales deficientes de las proteínas de la familia Argonauta: NRDE-3 y de HRDE-1. En cuanto a la primera se ha caracterizado que su expresión es mayoritariamente en células somáticas y existen reportes que apuntan a su importancia para la herencia de una sola generación en el silenciamiento de alguna diana somática mediada por exoRNAi (Billi *et al*, 2014); mientras que HRDE-1 se encuentra únicamente en línea germinal y su ausencia previene que se herede la señal de silenciamiento de RNAi a la progenie (Moore *et al*, 2019). Nuestros resultados mostraron que, aún en ausencia de *nrde-3* fue posible observar un incremento (aunque discreto) en la preferencia a 2-butanona en gusanos adultos jóvenes que sufrieron un arresto por ayuno en etapa L1 (**Figura 21.A**), no así en la mutante de *hrde-1* en donde no hubo un cambio en la preferencia al odorante en comparación a los animales que siempre se mantuvieron en presencia de alimento (**Figura 21.B**). Estos resultados sugieren que se puede descartar la participación de NRDE-3 y por tanto parte de la vía de silenciamiento por sRNA en tejidos somáticos,

sin embargo, en el caso del tejido de la línea germinal la actividad de RNAi a través de HRDE-1 es fundamental en el establecimiento de la respuesta conductual del nematodo inducida por ayuno.

Tanto para NRDE-3 y HRDE-1 se ha reportado que ambas actúan uniéndose a RNA mensajeros nacientes inhibiendo así la unión de la RNA Pol II y, además, río abajo de su unión por complementariedad con el RNA mensajero, reclutan complejos modificadores de la cromatina, como SET-25, una enzima con actividad de metiltransferasa de histonas que cataliza la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3), una marca asociada a represión epigenética (Billi *et al*, 2014). Por lo anterior, decidimos evaluar la participación de estas vías de silenciamiento por RNA en el establecimiento del comportamiento observado tras un arresto en L1, por lo que trabajamos la mutante de *set-25*. En esta mutante observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas en el índice de quimiotaxis a 2-butanona comparado con el IQ de animales en condiciones *ad libitum* de alimento (**Figura 21.C**). Cabe mencionar que probablemente sea necesario consolidar estas observaciones agregando por lo menos otra réplica biológica para tener mayor poder estadístico.

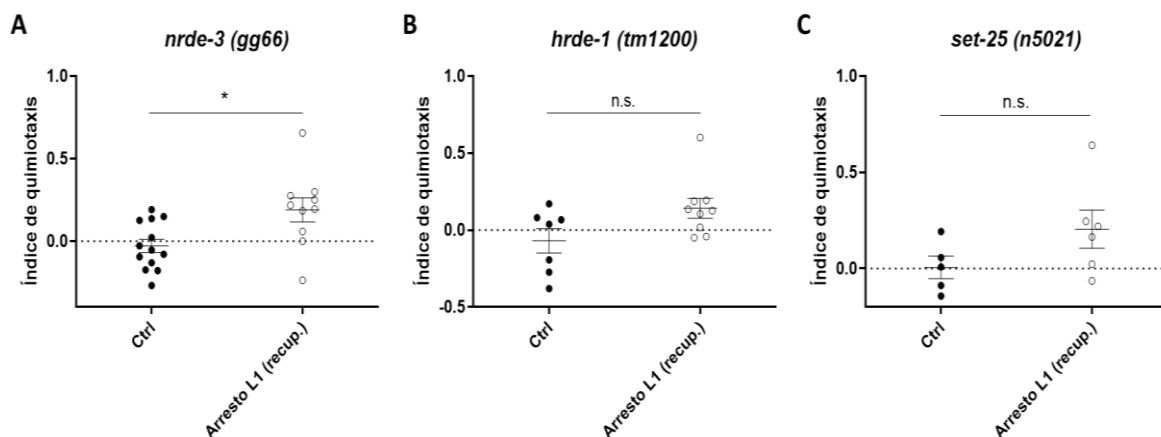


Figura 21. Participación de otras vías de procesamiento de sRNA en la conducta de gusanos adultos jóvenes tras un arresto en L1. Los animales fueron ayunados por 6 días en etapa L1 para luego permitirles llegar a la etapa de adulto joven en presencia de comida. Los índices de quimiotaxis fueron evaluados en la mutante de la proteína Argonauta NRDE-3 (**A**, N = 4), la Argonauta HRDE-1 (**B**, N = 3), y la proteína SET-25, una metil transferasa de histonas (**C**, N = 2). Para todos los ensayos, los datos se muestran con \pm SEM, donde (*) $p < 0.05$ y cada punto representa una réplica para las que se contó con 150-250 gusanos en promedio por cada una.

Finalmente, también evaluamos una posible participación de PRDE-1, una proteína involucrada en la biogénesis de piRNAs y que participa en la transcripción de los precursores de estas moléculas en células de la línea germinal. En animales carentes de *prde-1* se observó que la quimiotaxis es idéntica en los animales controles y en los recuperados de un arresto en L1 (**Figura**

22). Esto demuestra que PRDE-1 es necesario para el cambio conductual inducido por ayuno y sin duda es un reflejo de la importancia de la regulación de los piRNAs en la conducta de los nematodos.

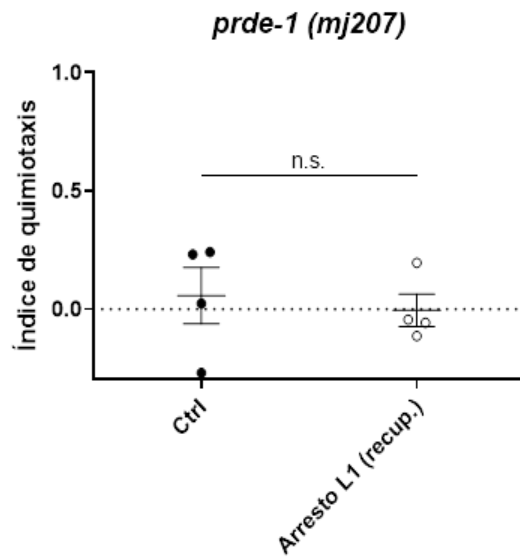


Figura 22. Participación de la vía de síntesis de piRNAs en la conducta de gusanos adultos jóvenes tras un arresto en L1. Los animales mutantes de *prde-1* fueron sometidos a un arresto en L1 mediante 6 días de ayuno y posteriormente se les permitió recuperarse en presencia de comida y llegar a adulto joven. Los índices de quimiotaxis correspondientes a la mutante de la proteína PRDE-1 correspondiente a la síntesis de piRNAs. Los datos se muestran con \pm SEM (N = 1, cada punto representa un ensayo con 150-250 gusanos en promedio por cada réplica).

En conclusión, estos resultados indican que en *C. elegans*, tras sufrir un arresto por 6 días de ayuno en L1, los sRNA que son transcritos constituyen un elemento fundamental en el establecimiento de un comportamiento relacionado a cómo el animal censa estímulos en su ambiente. Además, apuntan a que algunos elementos de la vía de interferencia canónica, como de biosíntesis de piRNAs, en conjunto, participan en el establecimiento de esta conducta; pudiendo ser reflejo también, de la intercomunicación entre tejidos, destacando la importancia de estas vías en gónada para observar un efecto conductual.

10. *Discusión*

10.1 *Un arresto larvario por ayuno tiene consecuencias conductuales a largo plazo a la preferencia de odorantes*

Una de las más relevantes aportaciones de este trabajo fue el establecimiento de un modelo de cambios conductuales inducidos por ayuno en *C. elegans* que pudieran ser observados a largo plazo. A la fecha, poco se conoce respecto a las consecuencias conductuales que el ayuno por sí mismo ocasiona en *C. elegans* y mucho menos sobre vías de señalización involucradas en la regulación de estos cambios conductuales.

En cuanto a la búsqueda de fuentes de alimento por periodos de inanición en *C. elegans*, Shimizu *et al* (2019) reportó que periodos de ayuno de 6 h en adultos jóvenes inducen una reducción en la motilidad y la velocidad con la que se dirigen a un estímulo que por naturaleza les parece atractivo como es el alcohol isoamílico (AI); sin embargo, no reportaron cambios en la preferencia a este odorante, aunque es interesante que incluso en el control siempre en alimento obtuvieron quimiotaxis cercanas al 100 % de preferencia, lo que probablemente indica que las concentraciones utilizadas no permitieran discernir entre cambios en la preferencia al AI. En el caso de la 2-butanona hay trabajos publicados que emplean concentraciones de 10 % en los ensayos de quimiotaxis (Kauffman *et al*, 2010), pero en nuestras manos, estas concentraciones son demasiado altas y no permiten discriminar cambios conductuales finos, por lo que decidimos trabajar con una concentración mucho más baja, de 0.1 %, que permitiese observar cambios reales y sutiles en la predilección del odorante por parte del nematodo.

En este trabajo demostramos que un periodo de ayuno de únicamente 3 horas en adultos jóvenes es suficiente para inducir un cambio importante en la preferencia a 2-butanona, potenciando la predilección a este odorante, para lo cual es preciso tener en cuenta que *C. elegans* es un nematodo de vida libre que habita en suelos de todo el mundo, por lo que probablemente este resultado sugiere la incesante búsqueda de fuentes de alimentación inducida por un ambiente sin disponibilidad de alimento. En ese sentido, otro antecedente directo a nuestro trabajo es el de Kauffman *et al* (2010), donde observaron que un periodo más prolongado de ayuno: 16 horas (también en adultos jóvenes), es suficiente para que la preferencia a 2-butanona se incremente de manera dramática; sin embargo, no se evaluó el efecto sobre la conducta que tienen los arrestos y diapasas inducidos por ayuno.

Nosotros demostramos que todos los estados hipometabólicos (arresto en L1, dauer, diapausa reproductiva del adulto) inducidos en *C. elegans* incrementan la preferencia al odorante 2-butanona, y más importante se trata de un efecto permanente, es decir, que el cambio conductual es aún

observado posterior al arresto y que el gusano haya completado su desarrollo a adulto joven. Esto podría sugerir que este aumento en la preferencia al odorante es un mecanismo de protección a futuros eventos similares de ayuno, donde los animales cambian su sensibilidad a diferentes fuentes de alimento. Particularmente, el incremento en la preferencia a 2-butanona, podría estar relacionado con la detección de metabolitos de las bacterias *Serratia marcescens* y otras bacterias del género *Methylomonas* y *Methylobacter* (Zhang *et al*, 2005; Hou *et al*, 1979) que en vida silvestre son fuentes de alimento de *C. elegans*. Este hecho cobra particular relevancia si tomamos en cuenta que nosotros observamos el cambio conductual en la progenie F1 de nematodos ayunados. Al mismo tiempo debemos considerar que estos cambios conductuales podrían suponer también una desventaja. Como se mencionó, la 2-butanona al ser producto de *Serratia marcescens* y ésta ser una bacteria patógena que de ser consumida les ocasiona una infección intestinal e incluso la muerte (Pradel *et al*, 2007), podría significar un riesgo para la sobrevivencia de la especie. Además, otro posible efecto perjudicial sea la alteración permanente a la sensibilidad a odorantes en el animal, teniendo como resultado comportamientos de escape, como fue el caso de nuestros ensayos a citronela y el benzaldehído, reportados inicialmente como atrayentes naturales (Bargmann *et al*, 1993).

En cuanto a la durabilidad de la conducta, únicamente existe una evidencia en la que se reporta un efecto conductual en nematodos adultos que sufrieron un arresto en el desarrollo: Pradhan *et al* (2018) reportó que hay una reducción del comportamiento exploratorio o de forrajeo en animales que cursaron por una etapa dauer tanto en la cepa silvestre N2, y mayoritariamente en la cepa hawaiana. Este decremento en la exploración quizás sea una manera de los gusanos para prevenir encontrarse de nuevo en periodos de ayuno asegurando permanecer en el mismo lugar donde las condiciones son favorables. Sin embargo, con respecto a la herencia de algún fenotipo conductual en consecuencia al ayuno, nada se había investigado y mucho menos en relación con la sensibilidad a odorantes por lo que, resulta interesante definir si el efecto a la alta preferencia a 2-butanona que se mantiene en la F1 de animales que fueron arrestados en L1, también se observa en la F2 e incluso en la F3, tratándose de un fenómeno de transgeneracionalidad.

Por otro lado, desde el punto de vista mecanístico, sería relevante evaluar los cambios en la percepción de otros odorantes posteriores al ayuno, sobre todo tomando en cuenta que en *Drosophila melanogaster*, cuando las larvas pasan por periodos de ayuno, se altera la percepción olfativa de ciertos odorantes, incrementando su preferencia a ellos (Slankster *et al*, 2020), y además incrementa la sensibilidad en las ORNs que son las neuronas receptoras de olor (Root *et al*, 2011). Esta alta sensibilidad neuronal ocasionada por ayuno también se ha reportado en humanos, donde un periodo de ayuno de 24 h en adultos sanos mejoró la función olfativa permitiendo una mejor identificación y

discriminación de olores (Cameron *et al*, 2012). Sin embargo, algo inesperado de nuestro trabajo fue lo observado con los odorantes benzaldehído y citronela. Inicialmente nosotros esperábamos un aumento en la preferencia, similar a lo que observamos con 2-butanona, no obstante, nuestros resultados demuestran que la preferencia a benzaldehído y citronela, que suelen encontrarse en la materia orgánica en descomposición que es el ambiente que *C. elegans* habita en estado libre, disminuye drásticamente en los nematodos adultos jóvenes que atravesaron por un arresto o diapausa. En ese sentido, se ha reportado que el ayuno puede cambiar la manera en que varios estímulos son percibidos. Por ejemplo, la aversión por el CO₂ puede ser suprimida por tan sólo 5 h de ayuno en gusanos adultos (Bretscher *et al*, 2008); y en paradigmas de aprendizaje asociativo con benzaldehído o NaCl, se ha reportado que aparear estos estímulos con ayuno puede producir efectos conductuales totalmente contrarios a que si se pareara con alimento (Lin *et al*, 2010; Baugh y Hu, 2020; Nagashima *et al*, 2019). Finalmente, en otro modelo de estudio con nematodos con fenotipo dauer constitutivo (mutante en *daf-2*), se observó que la preferencia por alcohol isoamílico resulta en un índice de quimiotaxis negativo, es decir, se vuelve repulsivo siendo que en condiciones control, este odorante es considerado un atrayente (Neto *et al*, 2016). Por lo tanto, es evidente que los cambios en cuanto a la preferencia a odorantes no son siempre en el mismo sentido, probablemente resultado de que diferentes odorantes se relacionan con distintos aspectos de la ecología de *C. elegans* en la naturaleza.

Además, estos resultados con benzaldehído y citronela pueden asociarse a una disminución en la sensibilidad a estos odorantes a nivel transcripcional donde la expresión de sus receptores se vea afectada o bien, alguna alteración en la función neuronal, posibilidades que deben ser evaluadas a futuro. Por lo anterior, consideramos relevante caracterizar si la alteración en la sensibilidad a odorantes en *C. elegans* se relacionaba directamente con la expresión de sus receptores. En ese sentido, nosotros observamos que ODR-10, un receptor de siete dominios transmembranales presente en los cilios de la neurona AWA (Sengupta *et al*, 1996), incrementa su expresión durante el arresto y una vez que los nematodos regresan a condiciones de alimento y completan su desarrollo regresa a niveles basales (**Figura 12**). Justamente, un reporte reciente mostró que en nematodos hermafroditas se incrementa la expresión de *odr-10* tras un periodo de ayuno de 12 a 18 horas, relacionando a esta proteína como un “receptor asociado a comida” (Wexler *et al*, 2020). Por otro lado, se sabe que el gen quimiorreceptor *srh-234* de *C. elegans*, en condiciones de ayuno baja su expresión y una vez que retorna al alimento regresa a niveles basales (Gruner y van der Linden, 2015). Lo anterior es reflejo de un evento temporal que sólo ocurre ante un estímulo particular, en este caso el ayuno, lo que le permitirá al animal ser más sensible a estímulos medioambientales que representen alimento y de esta manera terminar con el estrés ambiental. Sin embargo, hasta el momento se conoce que el receptor ODR-10 tiene como único ligando al odorante diacetil, no

pudiendo censar 2-butanona por la ausencia de un grupo ceto de ésta (Zhang *et al*, 1997), por lo cual sería relevante conocer cuál es la respuesta del gusano al diacetil y otros odorantes siendo que *C. elegans* posee más de 100 genes de receptores con siete dominios transmembranales que se expresan justamente en las neuronas quimiosensoras (Troemel *et al*, 1995).

La 2-butanona es un odorante que está reportado como ligando de los receptores ODR-1 y ODR-3, los cuales se expresan únicamente en el par neuronal AWC de *C. elegans* (Wes y Bargmann, 2001), por lo que sería interesante explorar qué sucede con la expresión de ambos receptores durante y posterior al arresto. Las neuronas AWC a pesar de que estructural y funcionalmente son muy similares, se caracterizan por una asimetría que radica en un perfil transcripcional distinto, gracias al cual pueden discriminar entre distintos odorantes, entre ellos la 2-butanona y el benzaldehído (Wes y Bargmann, 2001; Torayama *et al*, 2007). Por ello sería importante conocer lo que sucede a nivel neuronal y transcripcional con estas neuronas y receptores, y más considerando nuestros resultados donde observamos una preferencia exacerbada a 2-butanona, mientras que para el benzaldehído la preferencia se ve disminuida tras sufrir un arresto en L1. Además, se conoce que si ODR-1 se sobreexpresa, el animal es incapaz de discriminar entre ambos odorantes afectando directamente a la maquinaria de adaptación a la 2-butanona (L'Etoile y Bargmann, 2000), lo que pudiera explicar la elevada preferencia a 2-butanona que se mantiene en la adultez.

10.2 La participación de DAF-16 en el cambio conductual inducido por ayuno

Está bien caracterizado que la vía de señalización de insulina (IIS), a través del factor transcripcional DAF-16, es fundamental en el establecimiento de los diferentes arrestos y diapausas y sobre todo en arresto en L1, lo cual ha sido ampliamente revisado (Baugh, 2013; Baugh y Hu, 2020). Por lo anterior, no fue sorpresa observar en nuestros experimentos que el aumento a la preferencia a 2-butanona posterior al ayuno, es dependiente de la presencia de DAF-16, incluso en la F1 de estos animales. Pese a ello, desconocemos el mecanismo molecular detrás de este cambio conductual, y consideramos interesante conocer los blancos de DAF-16 posterior al ayuno, además de identificar si DAF-16 regula la expresión de receptores a odorantes u otros moduladores conductuales en *C. elegans*. Lo anterior tomando en cuenta que 809 pares de bases río arriba del codón de inicio de ODR-10 existe un sitio putativo de unión a DAF-16, y que al menos en nematodos macho, se ha comprobado la participación de este factor de transcripción en la expresión de ODR-10 por ayuno (Hahm *et al*, 2015; Wexler *et al*, 2020). Además, en condiciones de ausencia de alimento el gen quimiorreceptor *srh-234* baja su expresión debido a que DAF-16 actúa como represor (Gruner y van der Linden, 2015).

Aunado a conocer los blancos de DAF-16 en nuestro modelo de ayuno y conducta, es importante considerar también una posible regulación epigenética que esté teniendo lugar en el establecimiento conductual observado. Esto sobre todo tomando en cuenta que al menos en mamíferos se ha reportado que la actividad de FOXO1 (ortólogo de DAF-16) se ve facilitada en ayunos prolongados por medio de SIRT1 quien desacetila genes de la vía gluconeogénica (Cantó *et al*, 2010), mostrando que DAF-16/FOXO también puede ir de la mano con cambios en la accesibilidad de la cromatina en condiciones de ayuno. Además, se ha planteado previamente que SET-32, una metiltransferasa de histonas, se ve afectada por la actividad de DAF-16 (Kishore y Arnaboldi, 2020), por lo que sería interesante evaluar si fenómenos como la acetilación o metilación de histonas están regulando la expresión génica a través de DAF-16 y contribuyendo al establecimiento del comportamiento tras el arresto en L1 que observamos al odorante 2-butanona.

Por otro lado, cobra relevancia el hecho de que *C. elegans* posee en su genoma una gran familia de péptidos tipo insulina (ILP) que regulan respuestas olfativas en varias neuronas, incluidas las AWC que se encargan de detectar diversos odorantes, entre ellos 2-butanona (Chen *et al*, 2012; Leinwand y Chalasani, 2013). Mientras que en *Drosophila*, neuropéptidos e insulina actúan sobre neuronas receptoras olfativas para regular el comportamiento de forrajeo durante condiciones de ayuno (Root *et al*, 2011). Por lo tanto, conocer si hay alteraciones en la expresión y actividad de estos ILP en nuestro modelo de ayuno-conducta sería muy relevante para caracterizar si actúan de manera coordinada como agonistas o antagonistas de la vía, y sobre si su actividad se restringe a algún tejido en particular.

Un resultado inesperado fue el observado en la mutante de *age-1*, (proteína del complejo PI3K que actúa río abajo de la activación de DAF-2 para mantener inactivo a DAF-16), donde no observamos una alteración en la quimiotaxis a 2-butanona en nematodos arrestados en L1, que es contrario a lo esperado, un fenotipo similar a la cepa silvestre, donde la preferencia al odorante incrementara en animales que sufrieron el arresto. Esto quizás sea reflejo de la necesidad de AGE-1 en el establecimiento de un comportamiento; sin embargo, este resultado hay que analizarlo con cautela y no necesariamente desecha la hipótesis acerca de la importancia de la vía de insulina en el establecimiento de la conducta tras un arresto, dado que se conoce que AGE-1 se activa tras largos periodos de ayuno para contrarrestar al estrés oxidante (Weinkove *et al*, 2006). Además, se ha demostrado que en *dauers* y condiciones de ayuno, PI3K es muy importante para favorecer la formación de autofagosomas (Palmisano y Meléndez, 2019), mientras que Kang *et al* (2007), demostraron que arresto de días en L1 por ayuno incrementa la autofagia como mecanismo para asegurar la supervivencia durante el estado hipometabólico. Estas evidencias sugieren la posibilidad

de que, en nuestro modelo la ausencia de AGE-1 afecte la activación de mecanismos -independientes a la vía de insulina- para contrarrestar el daño celular del estado hipometabólico y, por consiguiente, la respuesta conductual no sea la adecuada en concordancia a los animales silvestres.

Dada la naturaleza del estímulo de ayuno de nuestros protocolos, existía la incertidumbre en cuanto a que, a pesar de que los gusanos se recuperaron y cumplieron su desarrollo hasta adultos, vías de estrés celular permanecieran activas y fueran la causa de la exacerbada preferencia a 2-butanona. Para descartar esta posibilidad decidimos trabajar con una mutante de HIF-1, un factor de transcripción cuya actividad ha sido reportada en modelos de restricción calórica en *C. elegans* (Chen *et al*, 2009), y que ante la ausencia de la vía de respuesta a estrés en la que HIF-1 es fundamental, siguiéramos observando el comportamiento de la cepa *wild type*. Sin embargo, nuestros resultados no fueron concluyentes, (**Figura 14**): por un lado, observamos una clara tendencia a que a pesar de la deficiencia de *hif-1*, los gusanos aumentan su preferencia a 2-butanona tras el arresto, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. Consideramos necesario corroborar este dato aumentando el número de repeticiones biológicas, ya que actualmente sólo tenemos una repetición y es preciso mencionar que los ensayos conductuales y más los referentes a quimiotaxis, se reportan a partir de 4 experimentos independientes, debido a la alta variabilidad observada en ensayos de conducta en *C. elegans*. No obstante, es preciso tener en cuenta que hay reportes que señalan la participación de HIF-1 en modelos de restricción calórica en nematodos modulando su esperanza de vida (Chen *et al*, 2009), por lo que, al tratarse de un factor transcripcional, es posible que su actividad sea necesaria para mantener una conducta en el animal. Por lo anterior, un abordaje interesante sería evaluar también otras mutantes de elementos de vías de señalización de estrés celular conocidos en condiciones de ausencia de alimento como TOR y/o SKN-1 (Chen *et al*, 2009; Paek *et al*, 2013), o RAS/MAPK reportada en ayuno río abajo de la activación del quimiorreceptor SRA-13 (Battu *et al*, 2003). Sin embargo, de igual manera, estos resultados deben tomarse con cautela, al tratarse de mutantes de reguladores globales en la célula que podrían originar efectos pleiotrópicos de diversa índole y que pudieran repercutir al fenómeno conductual observado, de manera independiente al efecto del ayuno mismo.

10.3 Dinámica de actividad de CREB/CRH-1

Con base en las observaciones realizadas en este trabajo, pudimos concluir que la presencia de CREB/CRH-1 en *C. elegans* es fundamental para el establecimiento del comportamiento ya sea tras un periodo corto de ayuno (3 h), o bien posterior a un arresto en L1 inducidos por 6 días de ayuno en L1; sin embargo, aún desconocemos los blancos de CREB/CRH-1 y el tejido dónde está actuando.

Se ha reportado que la octopamina, una molécula similar a la norepinefrina puede activar la vía de CREB en distintos organismos (Crocker *et al*, 2010). En el caso de *C. elegans*, hay reportes que señalan que durante un arresto en L1, el nematodo secreta a la hormona osas#9 o succinil ascarósido de octopamina, a la cual los animales muestran un comportamiento aversivo naïve durante los diferentes estadios larvarios (Artyukhin *et al*, 2013). La octopamina funciona como un neurotransmisor que se une al receptor membranal SER-3 y se ha demostrado que, durante un ayuno de 6 horas en nematodos adultos, esta interacción lleva a una cascada de señalización en interneuronas que culmina con la activación de CREB/CRH-1 (Baugh y Hu, 2020; Suo *et al*, 2006). Por lo anterior, consideramos interesante evaluar los niveles de octopamina en los animales ayunados y evaluar si es la responsable de la activación de CREB/CRH-1 que observamos en algunas neuronas y células intestinales durante y tras el arresto en L1. Además, otra posibilidad a tomar en cuenta es TOR, cuya actividad durante periodos de ayuno se incrementa para garantizar la supervivencia a través de la transcripción de blancos de CREB/CRH-1 en el cerebro de *Drosophila* (Wang *et al*, 2008). Por lo anterior, una perspectiva a concretar a futuro es evaluar qué factores son los encargados en instaurar la activación de la vía de CREB/CRH-1, que tiene un rol fundamental en el establecimiento del comportamiento que observamos en gusanos que sufrieron un arresto en L1.

Por otro lado, con respecto a los tiempos de ayuno evaluados en este trabajo (3 h en adultos jóvenes, y 6 días en larvas L1), resalta que, al menos en mamíferos se conoce que existe una dualidad interesante en la actividad de CREB/CRH-1 dependiente del tiempo de ayuno. En periodos cortos uno de los primeros eventos fisiológicos es el incremento de glucagón circulante, quien a través de la translocación de CREB/CRH-1 al núcleo, estimula la vía gluconeogénica llevando a la sobreexpresión de genes como el que codifica para la fosfoenol piruvato carboxilasa y la glucosa-6-fosfatasa, y también del coactivador del receptor γ 1 α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α), mientras que en tiempos prolongados de ayuno, CREB/CRH-1 induce la expresión de miembros del grupo A subfamilia 4 de receptores nucleares (NR4A); éstos últimos actuando como amplificadores para la expresión de genes de la vía gluconeogénica (Altarejos & Montminy, 2011). Lo anterior es un reflejo de la participación de CREB/CRH-1 en la regulación del metabolismo ante la ausencia de alimento. Sería interesante conocer si en nuestros dos modelos de ayuno (3 h y 6 días) hay diferencias en los genes regulados por CREB/CRH-1.

Al igual que con DAF-16, conocer los blancos de CREB/CRH-1 a nivel genómico resultaría fundamental para dilucidar a través de qué factores se está estableciendo un comportamiento a largo plazo inducido por los ayunos. También sería relevante explorar los mecanismos epigenéticos involucrados, sobre todo tomando en cuenta que en *C. elegans* CREB/CRH-1 promueve la expresión

de SET-30, una metil transferasa de histonas (Lakhina *et al*, 2015). Este efecto de CREB/CRH-1 se observó en un protocolo de memoria a largo plazo por aprendizaje asociativo a 2-butanona que utiliza como recurso periodos intermitentes de ayuno, promoviendo así cambios en el epigenoma que probablemente coadyuven en el establecimiento de memoria. También habría que tomar en cuenta que, la actividad de CREB/CRH-1 en ayuno va de la mano de p300/CBP, acetil transferasas de histonas que son reclutadas por CREB/CRH-1 a la cromatina (Altarejos y Montminy, 2011), lo que sin duda indica una regulación epigenética mediada por este complejo.

Otro dato relevante de esta tesis fue la localización celular de CREB/CRH-1, ya que durante el ayuno la detectamos en neuronas y células a lo largo del intestino, pero una vez que los animales son reexpuestos a comida y retoman su desarrollo, ahora pareciera que la expresión neuronal de CREB/CRH-1 se pierde, pero permanece en una localización muy puntual en la parte anterior del intestino del nematodo. En cuanto a las células neurales resulta complicado identificar con precisión cuáles y de qué naturaleza son las neuronas donde detectamos CREB/CRH-1; sin embargo, podrían tratarse de las interneuronas SIA, dado que la activación de CREB/CRH-1 en éstas durante un periodo de ayuno de 6 horas se reportó por el grupo de Suo *et al* (2006). Por lo anterior, consideramos relevante evaluar a futuro la implicación de CREB/CRH-1 únicamente en estos dos tipos celulares, donde experimentos con RNA de interferencia para realizar *knock down* en neuronas y células intestinales únicamente, definirían de manera más particular en qué tejido CREB/CRH-1 juega un papel relevante en el establecimiento conductual observado tras un arresto en L1.

Es importante señalar que el intestino de *C. elegans* se compone de 20 células organizadas en pares que forman 10 discos o anillos alrededor del lumen del intestino (McGhee, 2007; Asan *et al*, 2016). Por la localización que nosotros observamos de CREB/CRH-1 en la región inicial del intestino en los adultos que se recuperaron del arresto, inferimos que se trata del primer anillo denominado Int1 y el segundo anillo o Int2. En comparación al resto de los discos intestinales, el Int1 y el Int2 tienen la particularidad morfológica de poseer las microvellosidades más cortas, además de formar un depósito cónico plegable a manera de contenedor del alimento (McGhee, 2007). Dada la particularidad de que estos discos parecen almacenar alimento, resulta plausible que sea en ellos donde la permanencia de la expresión de CREB/CRH-1 juegue un papel preponderante para mantener los cambios inducidos por el ayuno aun después de que los animales se recuperan.

Nuestras observaciones respecto a que CREB/CRH-1 se activa en las neuronas e intestino de *C. elegans* plantea una posible intercomunicación entre tejidos para el establecimiento de una conducta. En ese sentido, durante el desarrollo, el contacto con las neuronas ventrales juega un papel muy importante para el establecimiento de la correcta morfología del intestino (Asan *et al*, 2016). Y

no sólo el contacto directo neurona-intestino es importante si no que se ha demostrado que a través de señalización parácrina y/o endócrina, el tejido nervioso controla la expresión de genes en el intestino para la defensa ante patógenos en el nematodo (Wani *et al*, 2019). Además, se conoce que miRNAs sintetizados en el sistema nervioso del nematodo regulan de manera no autónoma la proteostasis en el intestino dependiendo de diferentes fuentes bacterianas de alimento disponibles, como una manera en la que el sistema nervioso “prepara” al tejido intestinal para lo que será consumido (Kaletsky y Murphy, 2019). Asimismo, recientemente se reportó en *Drosophila* que CREB junto con Crtc (coactivador de transcripción regulado por cAMP), estimulan la expresión del neuropéptido pequeño F (sNPF), que además se conoce que incrementa su expresión durante el ayuno (Shen *et al*, 2016; Root *et al*, 2011) y, sobre todo, que el sNPF en moscas ayunadas incrementa la atracción a odorantes (Ko *et al*, 2015). En ese sentido, es preciso considerar a futuro en este proyecto evaluar el posible rol de los péptidos, si ocurre una alteración en la expresión de éstos y si tienen injerencia en el comportamiento que observamos tras un arresto en L1 a la preferencia de 2-butanona. Lo anterior cobra relevancia en el sentido de que reportes en *Drosophila* señalan que el sNPF es capaz de regular la integridad epitelial del intestino, debido a la localización de receptores al neuropéptido en este tejido (Shen *et al*, 2016), mientras que en mamíferos, la comunicación bidireccional cerebro-intestino a través de neuropéptidos ha sido abordada por varios grupos de investigación en condiciones de respuesta inmune e inclusive en desordenes psicológicos (Wei *et al*, 2020); lo que da luz de la existencia de una regulación y comunicación entre distintos tipos celulares, en este caso el tejido neuronal y el intestinal.

10.4 El metabolismo de siRNAs en el establecimiento del comportamiento

Un tema de frontera es esclarecer como el RNA no codificante tiene injerencia en diversos procesos celulares. *C. elegans* ha sido un excelente modelo de estudio para abordar estas preguntas, debido a que posee una basta maquinaria de procesamiento de RNAs pequeños endógenos (siRNAs) y parece que en general, el RNA juega un papel preponderante en muchos procesos de regulación del nematodo.

En ese proyecto, decidimos evaluar la contribución de diversas proteínas involucradas en el metabolismo de siRNAs en los cambios conductuales inducidos por ayuno en *C. elegans*. Comenzamos por evaluar elementos de la vía canónica como SID-1, un transportador transmembranal de RNA con actividad de unión a RNA de doble cadena, encontrando que su actividad resulta fundamental para observar el cambio en el comportamiento que se presenta en la cepa silvestre tras un arresto. Esto implica el transporte o intercambio de RNA como un elemento

importante para el establecimiento de un comportamiento inducido por ayuno en *C. elegans*. En soporte a esta idea, Kaletsky *et al* (2020) demostró que SID-2, que tiene la misma función que SID-1 pero cuya localización se restringe a células intestinales únicamente, es necesario para que el gusano realice un correcto aprendizaje asociativo. Ahora bien, por la ubicación de SID-1 al encontrarse en todos los tipos celulares excepto el neuronal, una posibilidad es que ocurra un transporte de dsRNA entre varios tejidos para modular el cambio conductual a la preferencia de 2-butanona en animales que fueron arrestados y, sobre todo, sabiendo que por nuestros resultados al menos con CREB/CRH-1, hay una participación activa de varios tipos celulares, neuronas y células intestinales.

En ese sentido, conocer la procedencia de estos siRNAs, y sobre en qué tejido tienen injerencia, abriría una ventana a estudiar la intercomunicación entre tejidos. No sería la primera ocasión en la que se describe la entrada de RNAs móviles neuronales en otros tejidos somáticos y células germinales para inducir silenciamiento de genes en *C. elegans* (Devanapally *et al*, 2015). Una de las grandes incógnitas que queda por ser estudiada es cómo se mueven los RNAs a través de los tejidos y un reporte reciente parece apuntar a la formación de partículas proteicas tipo virus (VLP) (Moore *et al*, 2020).

Además, resulta interesante que hay una desregulación de sRNAs provocada por un arresto en L1 en *C. elegans* (Rechavi *et al*, 2014) y a pesar de que se conoce que tienen injerencia sobre la traducción de genes asociados al metabolismo, sería conveniente revisar si también se ven afectados genes relacionados al funcionamiento neuronal que pudieran explicar esta alteración en la preferencia a distintos odorantes. Otra de las aproximaciones para determinar la importancia de los siRNAs es la realizada por el grupo de Kaletsky *et al* (2020), donde los nematodos en condiciones *ad libitum* de alimento serían expuestos de manera ambiental al RNA (total, RNAs largos, sRNA) proveniente de animales arrestados para observar si a pesar de que los animales nunca se arrestaron, hay un cambio conductual reflejado en la quimiotaxis a odorantes.

En cuanto a MUT-7, una exonucleasa de línea germinal, observamos que los animales mutantes de esta proteína y que sufrieron arresto mantuvieron un incremento en la preferencia a 2-butanona, descartando la participación de esta proteína de línea germinal en el cambio conductual. Sin embargo, podría ser el caso de que la participación de MUT-7 se relacione únicamente a la herencia dada su expresión en línea germinal, y no al establecimiento de la conducta inicial en los parentales; tal como ocurre en el modelo de aprendizaje aversivo a *P. aeruginosa* (Moore *et al*, 2019). Será importante establecer si nuestro cambio conductual inducido por ayuno es transgeneracional y si es el caso, reevaluar el papel de MUT-7.

Por otro lado, el caso de RDE-1, una ribonucleasa que como parte del complejo RISC se encarga de la conversión de dsRNA a ssRNA, el resultado obtenido fue interesante, ya que la característica de la cepa mutante utilizada es que expresa únicamente esta proteína en las células de la gónada. Los resultados muestran que la presencia de RDE-1 únicamente en las células de la línea germinal es suficiente para que ocurra un cambio conductual provocado por un arresto en etapas larvarias tempranas. Sin embargo, para confirmar por completo la participación de RDE-1 es necesario repetir el experimento con un KO completo, esperando no observar ningún cambio en la quimiotaxis a 2-butanona con respecto a animales en condiciones *ad libitum*. En relación con esto último, existe evidencia que indica que la presencia y actividad de proteínas exclusivas de línea germinal son necesarias para que los animales muestren un comportamiento específico, tal y como ocurre con la argonauta exclusiva de línea germinal, HRDE-1 (Posner *et al*, 2019; Kaletsky *et al*, 2020); aunque aún se desconoce el mecanismo específico por la que esto ocurre.

Por su parte, las Argonautas NRDE-3 (proteína somática) y HRDE-1 (línea germinal) se unen a los siRNAs secundarios en el citoplasma y se translocan al núcleo, donde interactúan por complementariedad a los transcritos nacientes y coadyuvados por otras proteínas de la maquinaria de siRNAs, inhibiendo la unión de la RNA Pol II y regulando la deposición de la marca represiva de histonas H3K9me3 por metiltransferasas como SET-25 y SET-32 (Spracklin *et al*, 2017; Billi *et al*, 2014). A diferencia de NRDE-3, en las mutantes de la argonauta HRDE-1 y de la metilasa SET-25, no fue posible observar un cambio en la preferencia a 2-butanona en gusanos adultos recuperados de un arresto en L1, signo de que estos elementos y su regulación son necesarios para el establecimiento de una conducta. Los resultados con la mutante de HRDE-1 sugieren que su actividad en línea germinal es necesaria para que el animal tenga un comportamiento específico; en contraste con lo observado con la cepa deficiente de NRDE-3, que demuestra que parte de la vía endógena de RNAi que ocurre en tejidos somáticos no son de importancia al menos, para que el animal establezca una conducta específica a un odorante. Particularmente, HRDE-1 es una argonauta que ha sido asociada en el establecimiento de herencia transgeneracional (Rechavi *et al*, 2014) por lo que, en el supuesto de que el fenotipo conductual que observamos en la cepa silvestre tras un arresto en L1 resulte transgeneracional, resultaría interesante conocer cuál es el efecto de esta mutante en la descendencia y saber de esta manera la participación de esta argonauta en la herencia.

También decidimos evaluar la participación de PRDE-1, una proteína involucrada en la transcripción de precursores de piRNAs (Kim *et al*, 2018). En esta mutante, no observamos un cambio aparente en la quimiotaxis a 2-butanona posterior al ayuno, lo cual sugiere la importancia de

estos elementos no codificantes en la regulación del comportamiento; resta por conocer el mecanismo por el cual actúan los piRNAs en este fenómeno.

Es preciso tomar en cuenta que, en este trabajo se emplearon mutantes deficientes en proteínas que, en su mayoría, se expresan de manera ubicua en *C. elegans*. Esto debe ser también evaluado con cautela, tomando en cuenta que es posible que la ausencia misma de estos reguladores pudiera estar afectando, de manera independiente al efecto del ayuno, el cómo el nematodo procesa la información ambiental y la integra para modificar su conducta. A pesar de que no existieron dificultades observables al momento de realizar los ensayos de quimiotaxis, como el tiempo de migración, la velocidad o motilidad en los nematodos, que reflejaran alguna alteración en el rendimiento motor del animal; es preciso que a futuro estos resultados se acompañen de mutantes en otros alelos, e incluso, de experimentos *knock down* a través del silenciamiento por RNAi de manera tejido-específico que redujeran, de ser el caso, posibles eventos pleiotrópicos que pudieran enmascarar las consecuencias del arresto por ayuno en las mutantes nulas en cuerpo completo.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos en esta tesis podemos concluir e hipotetizar que durante un arresto en L1 ocasionado por ayuno, la falta de alimento es inicialmente detectada por neuronas y células intestinales a través de CREB/CRH-1 quien podría inducir la transcripción de sRNAs y/o péptidos que ocasionen un cambio conductual a la preferencia a diversos odorantes; lo anterior junto con DAF-16 al incrementar la transcripción de receptores a odorantes, entre ellos ODR-10; además de que el metabolismo y silenciamiento de RNAi es un factor fundamental, donde siRNAs a través de SID-1 y/o posiblemente VLP tengan injerencia en distintos tejidos. Ahora, la persistencia del cambio conductual una vez que los animales retoman su desarrollo, ocurre probablemente por CREB/CRH-1 quien permanece activo únicamente en células intestinales como posibles sensores del estado interno del animal, además, es factible que la señal por RNAi siga siendo amplificada incluso en línea germinal con la Argonauta HRDE-1, por lo que el incremento en la preferencia a 2-butanona persiste en la F1 (**Figura 23**).

Es así como este proyecto permitió establecer un modelo conductual perdurable ante un estresor medioambiental, como lo es el ayuno en etapas tempranas del desarrollo, y conocer parte de los mecanismos que están regulando el establecimiento de un comportamiento específico; siendo relevante para entender de qué manera el ambiente modifica la conducta en animales, incluidos mamíferos y con ello, la especie humana; resultando imperioso este tema debido al incremento en reportes apuntando a eventos como la malnutrición infantil afectando severamente a los individuos y su descendencia a nivel fisiológico y conductual (Galler y Galler, 2014; Martorell y Zongrone, 2012).

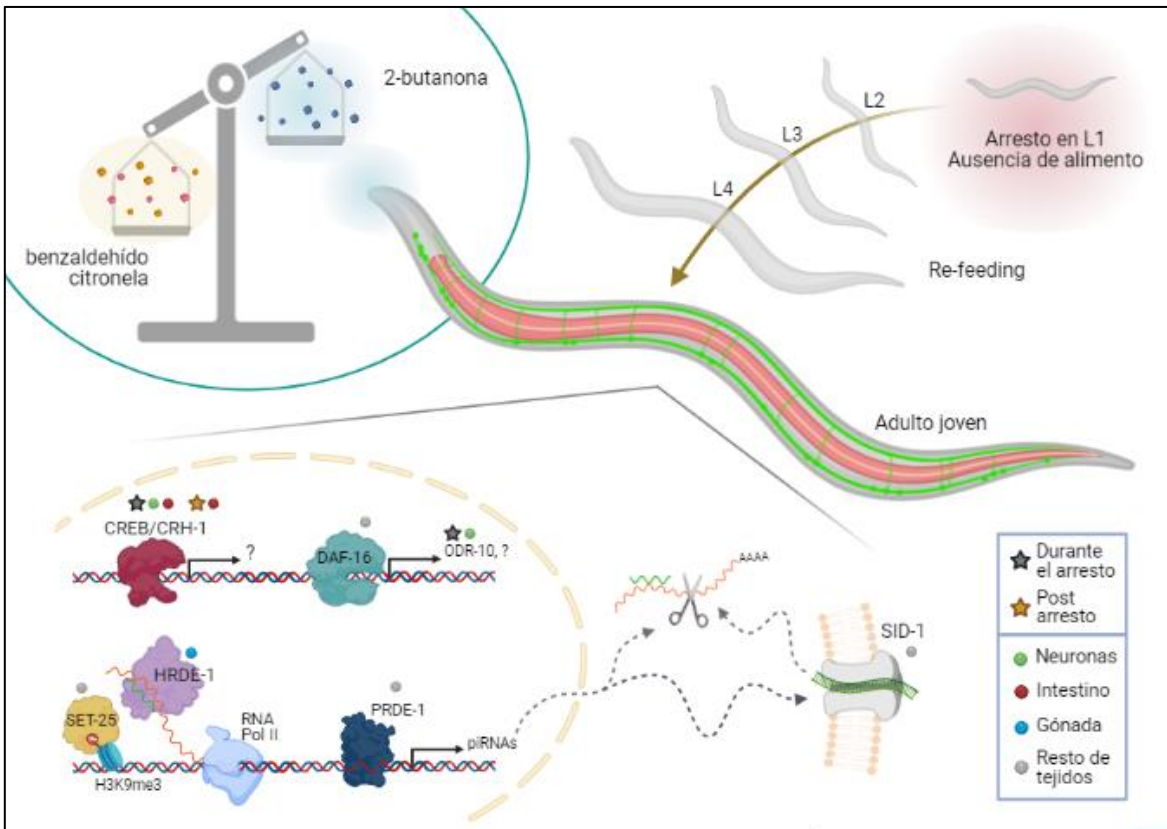


Figura 23. Resumen gráfico.

11. Conclusiones

1. Tanto ayunos cortos de 3 h en adultos jóvenes como la inducción de un arresto en L1 o las diapausas dauer y reproductiva del adulto por ayunos prolongados (6 días), promueven un cambio conductual hacia odorantes en *C. elegans*: mientras que se incrementa la preferencia a 2-butanona, disminuye la preferencia a benzaldehído y citronela. Lo cual podría deberse a la dinámica de expresión de algunos receptores de odorantes, como el caso de ODR-10, que únicamente incrementa su expresión al momento del arresto en L1.
2. En el caso de la 2-butanona, el cambio conductual inducido por un ayuno de 6 días en etapa larvaria L1 se mantiene por lo menos en la primera generación (F1) y parece depender de la presencia de DAF-16 desde los parentales para su trasmisibilidad a la F1.
3. La actividad de la vía de señalización de insulina, a través del factor transcripcional DAF-16, además de regular la fisiología del animal en condiciones de ayuno y el establecimiento de arrestos en el desarrollo, también participa en el establecimiento de una conducta a largo plazo inducida por ayuno en *C. elegans*.
4. El factor transcripcional CREB/CRH-1 es fundamental en la respuesta conductual de animales que sufrieron un ayuno de 3 h, así como de nematodos adultos que sufrieron un arresto larvario por efecto de la ausencia de alimento. Además, CREB/CRH-1 muestra una expresión dinámica: durante el arresto se expresa en distintos tipos celulares incluidas neuronas y células intestinales, pero una vez que se recuperan del arresto y llegan a adultos la expresión parece ser exclusiva en células intestinales.
5. El metabolismo del RNA, probablemente sRNA transcritos durante el arresto y que provienen de vías de biosíntesis endógenas (interferencia y piRNAs) son elementos esenciales para el establecimiento del cambio conductual observado a largo plazo en animales que fueron arrestados en L1. Y, sobre todo, sugieren una comunicación importante entre tejidos para lograr establecer un comportamiento, siendo que elementos propios de la línea germinal como HRDE-1 y PRDE-1 son necesarios para observar la conducta de preferencia exacerbada a 2-butanona tras un arresto en L1.

12. *Perspectivas*

1. Corroborar la participación de la vía de señalización de insulina a través de DAF-16 con una mutante de *daf-2*.
2. Determinar la participación de CREB/CRH-1 en células intestinales y neuronales.
3. Confirmar la actividad conjunta de CREB/CRH-1 con las acetiltransferasas de histonas p300/CBP-1 y, explorar si SET-30, una metilasa de histonas conocida por ser blanco de CREB, ejerce algún efecto sobre la conducta de *C. elegans*.
4. Conocer los blancos genómicos de regulación de los factores transcripcionales DAF-16 y CREB al igual que la acetilación de las histonas en nematodos adultos jóvenes que sufrieron un arresto en L1 por ayuno.
5. Consolidar estadísticamente las observaciones de PRDE-1 y completar un screening con elementos clave de las vías endógenas de RNAi del nematodo (MUT-2, ALG-1, DRH-1, DCR-1, RRF-3, etc), con la finalidad de disectar el mecanismo primordial que dicta un cambio conductual duradero.
6. Confirmar si la exposición ambiental al RNA proveniente de gusanos ayunados en L1 por 6 días en nematodos en condiciones *ad libitum* ocasiona un efecto conductual similar a los animales arrestados.
7. Realizar un perfil transcripcional (RNA-seq) de neuronas de *C. elegans* para identificar reguladores clave que participen en el cambio conductual observado tras la recuperación de un arresto larvario.
8. Definir si el efecto conductual del ayuno prolongado es intergeneracional o transgeneracional.

13. Figuras Suplementarias

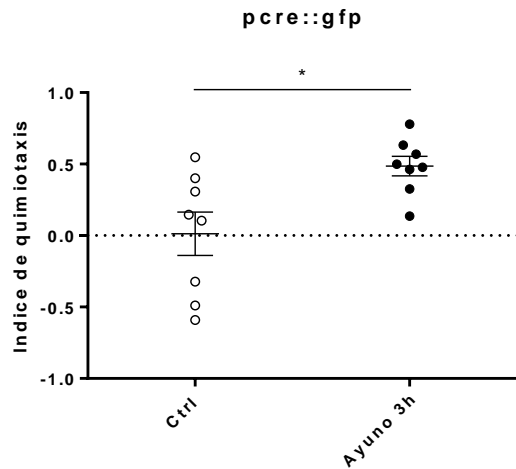


Figura Suplementaria 1. El ayuno induce un cambio conductual en la cepa reportera de CREB. Se cuantificó el índice de quimiotaxis a 2-butanona tras un periodo de ayuno de 3 h en gusanos adultos jóvenes de la cepa reportera que expresa GFP bajo el promotor de CRE en un arreglo extracromosomal. Los datos se muestran con \pm SEM; N=5 con 150-250 gusanos en promedio por cada ensayo.

14. Bibliografía

- Allis D. y Jenuwein T. (2016) “The molecular hallmarks of epigenetic control” en *Nat Rev Genet* 17(8):487-500.
- Altarejos J. & Montminy M. (2011) “CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals” en *Molecular Cell Biology* 12(3):141-151.
- Altintas O., Park S. & Lee S. (2016) “The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*” en *BMB Reports* 49(2):81-92.
- Altun Z. y Hall D. (2009) “Introduction to *C. elegans* anatomy” en *WormAtlas*.
- Altun Z. y Hall D. (2011) “Nervous system, general description” en *WormAtlas*.
- Andersen E. & Horvitz R. (2007) “Two *C. elegans* histone methyltransferases repress *lin-3* EGF transcription to inhibit vulval development” en *Development* 134(16):2991-2999.
- Angeles-Albores D., Leighton D., Tsou T., Khaw T., Antoshechkin I. & Sternberg P. (2017) “The *Caenorhabditis elegans* female-like state: decoupling the transcriptomic effects of aging and sperm status” en *G3 (Bethesda)* 7(9):2969-2977.
- Arney K. y Fisher A. (2004) “Epigenetic aspects of differentiation” en *Journal of Cell Science* 117:4355-4363.
- Artyukhin A., Yim J., Cheong M. & Avery L. (2015) “Starvation-induced collective behavior in *C. elegans*” en *Scientific Reports* 5:10647.
- Asan A., Raiders S. & Priess J. (2016) “Morphogenesis of the *C. elegans* intestine involves axon guidance genes” en *PLoS Genetics* 12(4):e1005950.
- Avery L. & You Y. (2012) “*C. elegans* feeding” en *WormBook*.
- Bannister A. y Kouzarides T. (2011) “Regulation of chromatin by histone modifications” en *Cell Res* 21(3):381-95.
- Bargmann C., Hartweg E. y Horvitz R. (1993) “Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*” en *Cell* 74:515-527.
- Barnard A., Nijhof A., Fick W., Stutzer C. & Maritz-Oliver C. (2012) “RNAi in Arthropods: insight into the machinery and applications for understanding the pathogen-vector interface” en *Genes (Basel)* 3(4):702-741.
- Battu G., Froehli E. & Hajnal A. (2003) “The *C. elegans* G-protein-coupled receptor SRA-13 inhibits RAS/MAPK signalling during olfaction and vulval development” en *Development* 130:2567-2577.
- Baugh L., Demodena J. & Sternberg P. (2009) “RNA Pol II accumulates at promoters of growth genes during developmental arrest” en *Science* 324:92-94.
- Baugh L. (2013) “To grow or not to grow: nutritional control of development during *Caenorhabditis elegans* L1 arrest” en *Genetics* 194:539-555.
- Baugh L. & Hu P. (2020) “Starvation responses throughout the *Caenorhabditis elegans* life cycle” en *Genetics* 216(4):837-878.
- Billi A., Fischer S. & Kim J. (2014) “Endogenous RNAi pathways in *C. elegans*” en *WormBook*.

- Bono M. y Maricq A. (2005) “Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*” en *Annu Rev Neurosci* 28:451-501.
- Brandt J. y Ringstad N. (2015) “Toll-like receptor signaling promotes development and function of sensory neurons required for a *C. elegans* pathogen-avoidance behavior” en *Curr Biol* 25(17):2228-37.
- Brenner S. (1974) “The genetics of *Caenorhabditis elegans*” en *Genetics* 77(1):71-94.
- Bretscher A., Busch K. & de Bono M. (2008) “A carbon dioxide avoidance behavior is integrated with responses to ambient oxygen and food in *Caenorhabditis elegans*” en *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(23):8044-8049.
- Buckley B., Burkhardt K., Gu S., Spracklin G., Kershner A., Fritz H., Kimble J., Fire A. & Kennedy S. (2012) “A nuclear argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality” en *Nature* 489(7416):447-451.
- Cameron J., Goldfield G. & Doucet E. (2012) “Fasting for 24 h improves nasal chemosensory performance and food palatability in a related manner” en *Appetite* 58(3):978-981.
- Cantó C., Jiang L., Deshmukh A., MATAKI C., Coste A., Lagouge M., Zierath J. & Auwerx J. (2010) “Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle” en *Cell Metab* 11(3):213-219.
- Carranza E. & Navarro R. (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*” en *PLoS one* 14(6):e0218265.
- Cassada R. & Rusell R. (1975) “The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*” en *Dev. Biol.* 46:326–342.
- Chapman E. & Carrington J. (2007) “Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways” en *Nat Rev Genet* 8(11):884-896.
- Chen D., Lynn E. & Kapahi P. (2009) “HIF-1 modulates dietary restriction-mediated lifespan extension via IRE-1 in *Caenorhabditis elegans*” en *PLoS Genetics* 5(5):e1000486.
- Chen J. & Caswell-Chen E. (2003) “Why *Caenorhabditis elegans* adults sacrifice their bodies to progeny” en *Nematology* 5(4):641-645.
- Chen Y., Chen H., Tseng W., Hsu J., Huang T., Chen C. & Pan C. (2016) “A *C. elegans* thermosensory circuit regulates longevity through crh-1/CREB-dependent flp-6 neuropeptide signaling” en *Developmental Cell* 39(2):209-223.
- Chen Z., Hendricks M., Cornils A., Maier W., Alcedo J. & Zhang Y. (2012) “Two insulin-like peptides antagonistically regulate aversive olfactory learning in *C. elegans*” en *Neuron* 77:572-585.
- Cook S., Jarrell T., Brittin C., Wang Y., Bloniarz A., Yakovlev M., Nguyen K., Tang L., Bayer E., Duerr J., Bülow H., Hobert O., Hall D. & Emmons S. (2019) “Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes” en *Nature* 571(7763):63-71.
- Corsi A., Wightman B. & Chalfie M. (2015) “Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*” en *Wormbook*.
- Crocker A., Shahidullah M., Levitan I. & Sehgal A. (2010) “Identification of a neural circuit that underlies the effects of octopamine on sleep: wake behavior” en *Neuron* 65(5):670-681.

- Dahiya Y., Rose S., Thapliyal S., Bhardwaj S., Prasad M. & Babu K. (2019) “Differential regulation of innate and learned behavior by Creb1/Crh-1 in *Caenorhabditis elegans*” en *The Journal of Neuroscience* 39(40):7934-7946.
- Devanapally S., Revikumar S. & Jose A. (2015) “Double-stranded RNA made in *C. elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing” en *PNAS* 112(7):2133-2138.
- Emmons S. (2005) “Male development” en *WormBook*.
- Fire A., Xu., Montgomery M., Kostas S., Driver S. & Mello C. (1998) “Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*” en *Nature* 391:806-811.
- Friedman D. & Johnson T. (1988) “A mutation in the *age-1* gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility” en *Genetics* 118:75-86.
- Galler J. & Galler D. (2014) “Chapter Seven – The intergenerational effects of early adversity” en *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 128:177-198.
- Gapp K., Jawaid A., Sarkies P., Bohacek J., Pelczar P., Prados J., Farinelli L., Miska E. & Mansury I. (2014) “Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice” en *Nat Neurosci* 17(5):667-669.
- García-Segura L., Abreu-Goodger C., Hernández-Mendoza A., Dimitrova T., Padilla-Noriega L., Perez-Andrade M., Miranda-Rios J. (2015) “High-throughput profiling of *Caenorhabditis elegans* starvation-responsive microRNAs” en *PLoS ONE* 10(11):e0142262.
- Gruner M. & van der Linden A. (2015) “Plasticity of chemoreceptor gene expression: Sensory and circuit inputs modulate state-dependent chemoreceptors” en *Worm* 4(2):e1023497.
- Gu W., Shirayama M., Conte D., Vasale J., Batista P., Claycomb J., Moresco J., Youngman E., Keys J., Stoltz M., Chen C., Chaves D., Duan S., Kasschau K., Fahlgren N., Yates J., Mitani S., Carrington J. & Mello C. (2009) “Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in *C. elegans* germline” en *Mol Cell* 36(2):231-244.
- Guang S., Bochner A., Pavelec D., Burkhart K., Harding S., Lachowiec J. & Kennedy S. (2009) “An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus” en *Science* 321(5888):537-541.
- Hahm J., Kim S., DiLoreto R., Shi C., Lee S., Murphy C. & Nam H. (2015) “*C. elegans* maximum velocity correlates with healthspan and is maintained in worms with an insulin receptor mutation” en *Nature Communications* 6:8919.
- Hart A. y Chao M. (2010) “From odors to behaviors in *Caenorhabditis elegans*” en *The neurobiology of olfaction*.
- Hobert O. (2005) “Specification of the nervous system” en *WormBook*.
- Hou C., Patel R., Laskin A., Barnabe N. & Marczak I. (1979) “Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: production of methyl ketones from their corresponding secondary alcohols by methane- and methanol-grown microbes” en *Appl Environ Microbiol* 38(1):135-142.
- Houthoofd K., Braeckman B., Johnson T. & Vanfleteren J. (2003) “Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*” en *Experimental gerontology* 38(9):947-954.
- Inglis P., Ou G., Leroux M. y Scholey J. (2007) “The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*” en *WormBook*.

- Jan H., Levy S., Flavell S., Mende F., Latham R., Zimmer M y Bargmann C. (2017) “Dissection of neuronal gap junction circuits that regulate social behavior in *Caenorhabditis elegans*” en *Proc Natl Acad Sci USA* 114(7):E1263-E1272.
- Jang M., Toyoshima Y., Tomioka M., Kunitomo H. & Iino Y. (2019) “Multiple sensory neurons mediate starvation-dependent aversive navigation in *Caenorhabditis elegans*” en *PNAS* 116(37):18673-18683.
- Jiang H., Guo R. & Powell-Coffman J. (2001) “The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia” en *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7916-7921.
- Jobson M., Jordan J., Sandrof M., Hibshman J., Lennox A. & Baugh R. (2015) “Transgenerational effects of early life starvation on growth, reproduction, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*” en *Genetics* 200:201-212.
- Jose A., Smith J. & Hunter C. (2009) “Export of RNA silencing from *C. elegans* tissues does not require the RNA channel SID-1” en *Proc Natl Acad Sci USA* 106(7):2283-2288.
- Kaletsky R, Moore R., Vrla G., Parsons L., Gitai Z. & Murphy C. (2020) “*C. elegans* “reads” bacterial non-coding RNAs to learn pathogenic avoidance” en *bioRxiv*.
- Kaletsky R. & Murphy C. (2019) “Gut feelings: microRNAs tune protein quality control and ageing to odours” en *Nature Metabolism* 1:306-307.
- Kalinava N., Zhouli J., Gajic Z., Kim M., Ushakov H. & Guoping S. (2018) “*C. elegans* heterochromatin factor SET-32 plays an essential role in transgenerational establishment of nuclear RNAi-mediated epigenetic silencing” en *Cell Reports* 25:2273-2284.
- Kandel E. (2012) “The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB” en *Molecular Brain* 5(14).
- Kang C., You Y. & Avery L. (2007) “Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation” en *Genes & Development* 21:2161-2171.
- Kao G., Nordenson C., Still M., Ronnlund A., Tuck S. & Naredi P. (2007) “ASNA-1 positively regulates insulin secretion in *C. elegans* and mammalian cells” en *Cell* 128(3):577-587.
- Kauffman A., Ashraf J., Corces R., Landis J. y Murphy C. (2010) “Insulin signal and dietary restriction differentially influence the decline of learning and memory with age” en *PLoS Biology* 8(5):e1000372.
- Kaplan R., Chen Y., Moore B., Jordan J., Maxwell C., Schindler A. & Baugh L. (2015) “*dbl-1*/TGF- β and *daf-12*/NHR signaling mediate cell-nonautonomous effects of *daf-16*/FOXO on starvation-induced developmental arrest” en *PLoS Genetics* 11:e1005731.
- Kaplan R. y Baugh L. (2016) “L1 arrest, *daf-16*/FoxO and nonautonomous control of post-embryonic development” en *WORM* 5(2):e1175196.
- Kasuga H., Fukuyama M., Kitazawa A., Kontani K. & Katada T. (2013) “The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state” en *Nature* 497(7450):503-506.
- Kim K., Tang N., Andrusiak M., Wu Z., Chisholm A. & Jin Y. (2018) “A neuronal piRNA pathway inhibits axon regeneration in *C. elegans*” en *Neuron* 97:511-519.
- Kim S. y Kaang B. (2017) “Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory” en *Experimental & Molecular Medicine* 49:e281.

- Kimura K., Riddle D. & Ruvkun G. (2011) “The *C. elegans* DAF-2 insulin-like receptor is abundantly expressed in the nervous system and regulated by nutritional status” en *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76:113-120.
- Kimura Y., Corcoran E., Gengyo K., Muramatsu M., Kobayashi R., Freedman J., Mitani S., Hagiwara M., Means A. & Tokumitsu H. (2002) “A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*” en *EMBO Rep* 3:962-966.
- Kishore R. & Arnaboldi V. (2020) “set-32” en *Wormbase* (version WS279). URL https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00008062#01-9fb-3
- Ko K., Root C., Lindsay S., Zaninovich O., Shepherd A., Wasserman S., Kim S. & Wang J. (2015) “Starvation promotes concerted modulation of appetitive olfactory behavior via parallel neuromodulatory circuits” en *eLife* 4:e08298.
- Lakhina V., Arey R., Kaletsky R., Kauffman A., Stein G., Keyes W., Xu D. y Murphy C. (2015) “Genome-wide functional analysis of CREB/long-term memory-dependent transcription reveals distinct basal and memory gene expression programs” en *Neuron* 85:330-345.
- Lapierre L. & Hansen M. (2012) “Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity” en *Trends in Endocrinology and Metabolism* 23(12):637-645.
- Larsen P., Albert P. & Riddle D. (1998) “Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*” en *Genetics* 139:1567-1583.
- Lee B. & Ashrafi K. (2008) “A TRPV channel modulates *C. elegans* neurosecretion, larval starvation survival, and adult lifespan” en *PLoS Genet* 4(10):e1000213.
- Lee J., Jee C. y McIntire S. (2009) “Ethanol preference in *C. elegans*” en *Genes Brain Behav* 8(6):578-585.
- Lee K. & Portman D. (2007) “Neural sex modifies the function of a *C. elegans* sensory circuit” en *Curr Biol* 17(21):1858-1863.
- Lee S., Kennedy S., Tolonen A. & Ruvkun G. (2003) “DAF-16 target genes that control *C. elegans* life-span and metabolism” en *Science* 300(5619):644-647.
- Leinwand S. & Chalasani S. (2013) “Neuropeptide signaling remodels chemosensory circuit composition in *Caenorhabditis elegans*” en *Nature Neuroscience* 16(10):1461-1468.
- L’Etoile N. & Bargmann C. (2000) “Olfaction and odor discrimination are mediated by the *C. elegans* guanylyl cyclase ODR-1” en *Neuron* 25(3):575-586.
- Libina N., Berman J. & Kenyon C. (2003) “Tissue-specific activities of *C. elegans* DAF-16 in the regulation of lifespan” en *Cell* 115:489-502.
- Lin C., Tomioka M., Pereira S., Sellings L., Iino Y. & van der Kooy D. (2010) “Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval” en *Journal of Neuroscience* 30(23):8001-8011.
- Lints R. & Hall D. (2009) “Reproductive system, egg-laying apparatus” en *WormAtlas*.
- Liu H., Qin L., Li R., Zhang C., Al-Sheikh U. y Wu Z. (2019) “Reciprocal modulation of 5-HT and octopamine regulates pumping via feedforward and feedback circuits in *C. elegans*” en *PNAS* 116(14):7107-7112.
- Lonze B. & Ginty D. (2002) “Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system” en *Neuron* 35:605-623.

- Martorell R. & Zongrone A. (2012) “Intergenerational influences on child growth and undernutrition” en *Pediatric and Perinatal Epidemiology* 26(Suppl. 1):302-314.
- Maxwell C., Antoshechkin I., Kurhanewicz N., Belsky J. & Baugh L. (2012) “Nutritional control of mRNA isoform expression during developmental arrest and recovery in *C. elegans*” en *Genome Res* 22:1920-1929.
- Mayr B. & Montminy M. (2001) “Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB” en *Molecular Cell Biology* 2:599-609.
- McGhee J. (2007) “The *C. elegans* intestine” en *WormBook*.
- Moore R., Kaletsky R. y Murphy C. (2019) “Piwi/PRG-1 Argonaute and TGF- β mediate transgenerational learned pathogenic avoidance” en *Cell* 177(7):1827-1841.
- Moore R., Kaletsky R., Lesnik C., Cota V., Blackman E., Parsons L., Gitai Z. & Murphy C. (2020) “Horizontal and vertical transmission of transgenerational memories via the *Cer1* transposon” en *bioRxiv*.
- Murphy C. & Hu P. (2013) “Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*” en *WormBook*.
- Nagashima T., Iino Y. & Tomioka M. (2019) “DAF-16/FOXO promotes taste avoidance learning independently of axonal insulin-like signaling” en *PLOS Genetics* 15(7):e1008297.
- Nasrin N., Ogg S., Cahill C., Biggs W., Nui S., Dore J., Calvo D., Shi Y., Ruvkun G. & Alexander-Bridges M. (2000) “DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells” en *PNAS* 97(19):10412-10417.
- Neto M., Quan N., Marsili J., McFall S. & Voisine C. (2016) “The nematode *Caenorhabditis elegans* displays a chemotaxis behavior to tuberculosis-specific odorants” en *J Clin Tuberc Other Mycobac Dis* 4:44-49.
- Oikonomou G. y Shaham S. (2011) “The glia of *Caenorhabditis elegans*” en *Glia* 59(9):1253-63.
- Paek J., Lo J., Devi S., Nguyen T., Glover K., Robida S., Suzuki T., Yamamoto M. & Blackwell K. (2012) “Mitochondrial SKN-1/Nrf mediates a conserved starvation response” en *Cell Metab* 16(4):526-537.
- Palmisano N. & Meléndez A. (2019) “Autophagy in *C. elegans* development” en *Developmental Biology* 447:103-125.
- Pierce S., Costa M., Wisotzkey R., Devadhar S., Homburger S., Buchman A., Ferguson K., Heller J., Platt D., Pasquinelli A., Liu L., Doberstein S. & Ruvkun G. (2001) “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” en *Genes Dev* 15(6):672-686.
- Posner R., Toker I., Antonova O., Star E., Anava S., Azmon E., Hendricks M., Bracha S., Gingold H. & Rechavi O. (2019) “Neuronal small RNAs control behavior transgenerationally” en *Cell* 177:1814-1826.
- Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C. & Ewbank J. (2007) “Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*” en *PNAS* 104(7):2295-2300.
- Pradhan S., Quilez S., Homer K. & Hendricks M. (2018) “Environmental programming of adult foraging behavior in *C. elegans*” en *bioRxiv*.

- Rechavi O., Hourli L., Anava S., Goh W., Kerk S., Hannon G. & Hobert O. (2014) "Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*" en *Cell* 158(2):277-287.
- Remy J. y Hobert O. (2005) "An interneural chemoreceptor required for olfactory imprinting in *C. elegans*" en *Science* 309(5735):787-90.
- Richmond J. (2007) "Synaptic function" en *WormBook*.
- Ritter A., Shen Y., Fuzman J., Jeyaraj S., Deplancke B., Muckhopadhyay A., Xu J., Driscoll M., Tissenbaum H. & Walhout A. (2013) "Complex expression dynamics and robustness in *C. elegans* insulin networks" en *Genome Res* 23(6):954-965.
- Root C., Ko K., Jafari A. & Wang J. (2011) "Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search" en *Cell* 145:133-144.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I. & Frise E., *et al* (2012) "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis" en *Nature methods* 9(7):676-682.
- Seidel H. & Kimble J. (2011) "The oogenic germline starvation response in *C. elegans*" en *PLoS one* 6(12):e28074.
- Sengupta P., Chou J. & Bargmann C. (1996) "odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl" en *Cell* 84(6):899-909.
- Serrano-Saiz E., Pereira L., Gendrel M., Aghayeva U., Bhattacharya A., Howell K., Garcia R. & Hobert O. (2017) "A neurotransmitter atlas of the *Caenorhabditis elegans* male nervous system reveals sexually dimorphic neurotransmitter usage" en *Genetics* 206(3):1251-1269.
- Shao Z., Watanabe S., Christensen R., Jorgensen E. Colon D. (2013) "Synapse location during growth depends on glial location" en *Cell* 154:337-350.
- Shen R., Wang B., Giribaldi M., Ayres J., Thomas J. & Montminy M. (2016) "Neuronal energy-sensing pathway promotes energy balance by modulating disease tolerance" en *PNAS* 113(23):E3307-E3314.
- Shih J. & Hunter C. (2011) "SID-1 is dsRNA-selective dsRNA-gated channel" en *RNA* 17(6):1057-1065.
- Shimizu K., Ashida K., Hotta K. & Oka K. (2019) "Food deprivation changes chemotaxis behavior in *Caenorhabditis elegans*" en *Biophysics and Physicobiology* 16:167-172.
- Slankster E., Kollala S., Baria D., Dailey-Krempel B., Jain R., Odell S. & Mathew D. (2020) "Mechanism underlying starvation-dependent modulation of olfactory behavior in *Drosophila* larva" en *Sci Rep* 10(1):3119.
- Spracklin G., Fields B., Wan G., Becker D., Walling A., Shukla A. & Kennedy S. (2017) "The RNAi inheritance machinery of *Caenorhabditis elegans*" en *Genetics* 206(3):1403-1416.
- Stannard J. y Horecker B. (1947) "The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide" en *J Biol Chem* 172:599-608.
- Stefanakis N., Carrera I. & Hobert O. (2015) "Regulatory logic of pan-neuronal gene expression in *C. elegans*" en *Neuron* 87(4):733-750.
- Sun A. y Lambie E. (1997) "Gon-2, a gene required for gonadogenesis in *Caenorhabditis elegans*" en *Genetics* 147(3):1077-89.
- Suo S., Kimura Y. & Van Tol H. (2006) "Starvation induces cAMP response element-binding-protein-dependent gene expression through octopamine-G_q signaling in *Caenorhabditis elegans*" en *The Journal of Neuroscience* 26(40):10082-10090.

- Tijsterman M., May R., Simmer F., Okihara K. & Plasterk R. (2004) “Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*” en *Curr Biol* 14:111-116.
- Torayama I., Ishihara T. & Katsura I. (2007) “*Caenorhabditis elegans* integrates the signals of butanone and food to enhance chemotaxis to butanone” en *J Neurosci* 27(4):741-750.
- Troemel E., Chou J., Dwyer N., Colbert H. & Bargmann C. (1995) “Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*” en *Cell* 83(2):207-218.
- Turner B. (2009) “Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications” en *Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci* 364(1534):3403-3418.
- van Gilst M., Hadjivassiliou H. & Yamamoto K. (2005) “A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49” en *Proc Natl Acad Sci* 102:13496-13501.
- van Steenwyk G., Roszkowski M., Manuella F., Franklin T. & Mansury I. (2018) “Transgenerational inheritance of behavioral and metabolic effects of paternal exposure to traumatic stress in early postnatal life: evidence in the 4th generation” en *Environmental Epigenetics* 4(2):1-8.
- Vastenhouw N., Brunschwing K., Okihara K., Müller F., Tijsterman M. & Plasterk R. (2006) “Gene expression: long-term gene silencing by RNAi” en *Nature* 442:882.
- Wagner P. (2011) “El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular” en *Acta Médica Peruana* 28(3):163-168.
- Wang B., Goode J., Best J., Meltzer J., Schilman P., Chen J., Garza D., Thomas J. & Montminy M. (2008) “The insulin-regulated CREB coactivator TORC promotes stress resistance in *Drosophila*” en *Cell Metab* 7(5):434-444.
- Wani K., Goswamy D. & Irazoqui J. (2019) “Nervous system control of intestinal host defense in *C. elegans*” en *Current Opinion in Neurobiology* 62:1-9.
- Wei P., Keller C. & Li L. (2020) “Neuropeptides in gut-brain axis and their influence on host immunity and stress” en *Computational and Structural Biotechnology Journal* 18:843-851.
- Weick E., Sarkies P., Silva N., Chen R., Moss S., Cording A., Ahringer J., Martinez-Perez E. & Miska E. (2014) “PRDE-1 is a nuclear factor essential for the biogenesis of Ruby motif-dependent piRNAs in *C. elegans*” en *Genes Dev* 28(7):783-796.
- Weinkove D., Halstead J., Gems D. & Divecha N. (2006) “Long-term starvation and ageing induced AGE-1/PI 3-kinase-dependent translocation of DAF-16/FOXO to the cytoplasm” en *BMC Biol* 4:1.
- Wes P. & Bargmann C. (2001) “*C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons” en *Nature* 410:698-701.
- White J., Southgate E., Thomson J. y Brenner S. (1986) “The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* (The mind of a worm)” en *Phil Trans R Soc Lond B* 314:1-340.
- Worthy S., Rojas G., Taylor C. y Glater E. (2018) “Identification of odor blend used by *Caenorhabditis elegans* for pathogen recognition” en *Chem senses* 43(3):169-180.
- Yasuda K., Hartman P., Ishii T., Suda H., Akatsuka A., Shoyama T., Miyazawa M. & Ishii N. (2006) “Interrelationships between mitochondrial fusion, energy metabolism and oxidative stress during development in *Caenorhabditis elegans*” en *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404(3):751-755.

- Zhang X., Zabinsky R., Teng Y., Cui M. & Han M. (2011) “microRNAs play critical roles in the survival and recovery of *Caenorhabditis elegans* from starvation-induced L1 diapause” en *Proc Natl Acad Sci USA* 108:17997-18002.
- Zhang Y., Lu H. y Bargmann C. (2005) “Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*” en *Nature* 438:179-184.
- Zhang Y., Chou J., Bradley J., Bargmann C. & Zinn K. (1997) “The *Caenorhabditis elegans* seven-transmembrane protein ODR-10 functions as an odorant receptor in mammalian cells” en *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22):12162-12167.
- Zou L., Wu D., Zang X., Wang Z., Wu Z. & Chen D. (2019) “Construction of a germline-specific RNAi tool in *C. elegans*” en *Scientific Reports* 9(1):2354.