



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de alta glucosa sobre la memoria
asociativa del nemátodo *Caenorhabditis
elegans***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Mariana Zurita León

TUTOR

Dr. Víctor Julián Valdés





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.

ÍNDICE

Agradecimientos

Resumen

Clave

1. Introducción

- 1.1. **Problemática de la hiperglucemia**
- 1.2. **Glucotoxicidad**
- 1.3. **Efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso**
- 1.4. ***Caenorhabditis elegans* como modelo**
 - 1.4.1. **Ciclo de vida**
 - 1.4.2. **El Sistema nervioso de *C. elegans***
- 1.5. **Conducta en *C. elegans***
 - 1.5.1. **Paradigmas de memoria y aprendizaje en *C. elegans***
- 1.6. **Vías de respuesta a estímulos ambientales conservadas en *C. elegans***
 - 1.6.1. **Vía de señalización de tipo insulina**
 - 1.6.2. **CREB/crh-1**
 - 1.6.3. **Apoptosis**
- 1.7. ***C. elegans* como modelo para estudiar glucotoxicidad**
- 1.8. **Transgeneracionalidad**

2. Justificación

3. Pregunta de investigación

4. Hipótesis

5. Objetivos

- 5.1. **Objetivo general**
- 5.2. **Objetivos particulares**

6. Materiales y métodos

- 6.1. **Cepas de *Caenorhabditis elegans***
- 6.2. **Cuantificación de tamaño**
- 6.3. **Cuantificación de vida media**
- 6.4. **Evaluación de ovoposición**
- 6.5. **Ensayos de memoria asociativa al benzaldehído**
- 6.6. **Cruzas**

7. Resultados

- 7.1. **La exposición a glucosa tiene efectos fenotípicos en *C. elegans***
- 7.2. **La exposición a alta glucosa afecta la quimioatracción y memoria asociativa al benzaldehído**
- 7.3. **El efecto de la glucosa sobre la memoria asociativa no es transgeneracional**
- 7.4. **El efecto sobre la quimiotaxis naïve depende de DAF-2 y DAF-16**
- 7.5. **CREB/crh-1 está involucrado en el aumento de la quimiotaxis naïve**
- 7.6. **ced-3 es necesario para la memoria asociativa**
- 7.7. **Cruzas *CL2166::OH10690* y *pCREB::OH10690***

8. Discusión

8.1. Construcción del modelo

8.2. La glucosa tiene efectos en la memoria y quimiotaxis a benzaldehído

8.3. El efecto de la glucosa es intergeneracional más no intergeneracional

8.4. La vía de la insulina

8.5. CREB

8.6. Efectos de la apoptosis para la quimiotaxis

9. Conclusiones

10. Perspectivas

Referencias

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que son apoyo e inspiración. Al Dr. Julián y los miembros del 302 Oriente. A mis familiares y amigos. Y a Miso, que siempre fue un apapacho en el momento más necesitado.

RESUMEN

La exposición a altas concentraciones de glucosa tiene efectos adversos en el organismo, los cuales en parte se deben a la glucotoxicidad; sin embargo, esta no ocurre de igual manera en todos los órganos. Uno de los órganos que se ve mayoritariamente afectado por la exposición a la glucosa es el sistema nervioso central, donde tiene efectos que van desde daño a la microvasculatura hasta problemas cognitivos. En este trabajo se utilizó al nematodo *Ceanorhabditis elegans* como modelo de estudio de los efectos de la exposición a altas concentraciones de glucosa. Por medio del paradigma de memoria asociativa al benzaldehído se determinó que la exposición a glucosa tiene efectos adversos sobre la memoria asociativa a dicho compuesto. Se observó que el fenotipo observado es dependiente de la vía tipo insulina y de la vía de CREB.

CLAVE

Abreviaciones usadas

RNAi	RNA de interferencia
SN	Sistema Nervioso
EROS	Especies Reactivas de Oxígeno
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
PKA	Protein Quinasa A
AGEs	Elementos de Glicosilación Avanzada
dsRNA	RNA de doble cadena
RdRP	RNA polimerasas dependientes de RNA
YA	Young Adult: Jovenes adultos.
SOD	Superóxido dismutasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Efectos de la hiperglucemia en la salud

La diabetes y la obesidad son dos de los principales problemas de salud en México. En el caso de la diabetes, ésta es una patología proveniente de una falta de producción de insulina o un impedimento en su correcta utilización, llevando a un estado hiperglucémico - es decir, un nivel elevado del azúcar en sangre- al no ser tratada (OMS). La diabetes puede originarse debido a una resistencia a la insulina, llamada diabetes tipo dos, o por la falta de insulina debido a una respuesta inmune contra las células beta pancreáticas, llamada diabetes tipo uno. La obesidad y el aumento en la ingesta calórica es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de diabetes tipo II. El 55% de los casos de diabetes tipo II están asociados a una condición de obesidad (CDC, 2004). Es decir que, tanto la obesidad como la diabetes tipo 2 están asociadas a un aumento en la ingesta calórica, la cual tiene como consecuencia estados hiperglucémicos (Mouri & Badireddy, 2020; Qi, 2009). La hiperglucemia se determina como una elevada concentración de glucosa en la sangre, que en ayuno debe de ser superior a 125 mg/dL, y en postprandia debe de ser de 180 mg/dL (Veras-Estévez *et al.*, 2018). La hiperglucemia es una condición de glucosa elevada en la sangre que supere los 125 mg/dL en condiciones de ayuno y los 180 mg/dL dos horas después del consumo de un alimento (Veras-Estévez *et al.*, 2018). Un estado de hiperglucemia prolongado causa complicaciones en tejidos vasculares resultando en distintas fallas orgánicas. Entre estas complicaciones se encuentran retinopatías, cardiopatías y complicaciones en el sistema nervioso (Aronson, 2008). Con respecto a estas últimas existen diversas neuropatías y enfermedades cerebrovasculares asociadas a hiperglucemia (Aronson, 2008; Tomas & Watkins, 1998). Se conoce que los pacientes con diabetes que han presentado la enfermedad durante un largo periodo tienen un mayor riesgo de demencia y deterioro en las habilidades cognitivas (Cuckierman *et al.*, 2005; McCrimon *et al.*, 2012). Debido a los efectos de la hiperglucemia sobre diferentes órganos, incluyendo el sistema nervioso central, esta condición presenta una problemática compleja cuyos efectos aún no se terminan de entender.

En las últimas décadas se ha observado un aumento en prevalencia de la hiperglucemia como resultado del incremento en la obesidad y del sedentarismo, al igual que un aumento en el consumo de alimentos procesados (Mouri & Badireddy, 2020; Qi, 2009). Estos cambios en el estilo de vida presentan un problema ya que existe un consumo excesivo de glucosa y calorías llevando a un aumento en el riesgo del desarrollo de estas patologías. En México el 75% de la población adulta y 35% de los niños tienen obesidad, mientras que hay aproximadamente 60,000 mexicanos diagnosticados con diabetes (ENSANUT, 2018; Rojas-Martinez, *et al.*, 2018). Como dicho anteriormente, tanto la diabetes como la obesidad están aunadas a un estado de hiperglucemia, por lo que es de vital importancia comprender los efectos causados por una exposición a alta glucosa.

1.2 Glucotoxicidad

En general, cuando las células son expuestas a hiperglucemia, se induce un deterioro debido a un fenómeno llamado glucotoxicidad. La glucotoxicidad consiste en una desregulación de diversas vías metabólicas y cascadas de regulación centrales que llevan al deterioro de funciones celulares culminando en muerte celular (Luo, 2016). Esto sobre todo en estados de hiperglucemia prolongados donde se ha reportado que existe un aumento del estrés reductivo originado por alteraciones en la vía del poliol lo cual lleva al desbalance redox entre las pozas de NAD⁺/NADH (Lipinski, 2002). La vía del poliol se encarga de la conversión de la glucosa a fructosa por medio de dos enzimas la aldosa reductasa y sorbitol deshidrogenasa, en donde se genera un intermediario, el sorbitol. Por otra parte, la hiperglucemia también lleva al aumento del estrés oxidativo, el cual tiene un papel importante en las comorbilidades asociadas a la diabetes (Wolf, 1993). Dicho estrés oxidativo se da por una exposición prolongada a glucosa, lo cual produce una desregulación de las vías de la hexosamina, poliol, endiol y de la proteína quinasa C causando citotoxicidad celular (Luo, 2016). La principal fuente de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) en la célula en condiciones basales es la mitocondria. En estados hiperglucémicos existe un aumento en el NADH intracelular por la desregulación de la vía del poliol, por lo que se genera una hiperactividad mitocondrial y un incremento de ERO (Luo, 2016). Este incremento es a través del complejo I de la cadena de transporte de electrones debido a que este complejo se encarga directamente de la oxidación de NADH a NAD⁺ produciendo en el proceso iones superóxidos, por lo que es considerado el principal complejo productor de ERO en hiperglucemia (Coughlan *et al.*, 2009). La metformina, uno de los medicamentos usados para tratar la diabetes tipo 2, inhibe el complejo I de la cadena de electrones mitocondrial, disminuyendo así la formación de ERO, lo cual causa una mejora en el metabolismo de los pacientes (Owen *et al.*, 2000).

La presencia de glucosa elevada por largos periodos, resulta en un aumento en la generación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) (Hayden, 2002). Los AGEs son proteínas glicosiladas que sufren posteriores glicosilaciones por medio de intermediarios dicarbonilo. En estados hiperglucémicos, el aumento en el glioxal, metilglioxal, y 3-deoxyglucosone como resultado de la oxidación de la glucosa a glyoxal, causa a su vez un incremento en AGEs (Brownlee, 2001). Se sabe que los AGEs afectan la actividad del proteosoma, y están relacionados con alteraciones en la señalización celular y con actividad proinflamatoria (Ahmed, 2005; Queisser *et al.*, 2010). A su vez, los AGE 's aumentan el estrés oxidativo por medio de la activación de la NADPH oxidasa NOX2 en microglía (Zhang, 2016).

Finalmente, en estados hiperglucémicos también se genera un aumento en el estrés de carbono debido a que hay un exceso de acetil coenzima A y de fumarato (Blatnik *et al.*, 2008; Luo, 2016; Olefsky, 1993). El aumento en la acetil coenzima A lleva a una sobre acetilación de proteínas, la cual afecta la estabilidad y actividad. Por su lado, un exceso de fumarato, causa un aumento en la succinación de proteínas por lo cual se afecta su actividad (Blatnik *et al.*, 2008). Por ejemplo, se ha demostrado que

en estados hiperglucémicos derivados de diabetes existe una sobre succinación de GADPH, lo cual inhibe su actividad y contribuye al estrés mitocondrial (Blatnik *et al.*, 2008; Frizzell *et al.*, 2012).

La exposición prolongada de las células a la glucosa causa alteraciones metabólicas que llevan a un estado de desregulación y estrés. Se considera que los tejidos que se ven más afectados por estados hiperglucémicos prolongados son la macrovasculatura y la microvasculatura, llevando así a patologías en diversos órganos (Brownlee, 2001). Se conoce poco de cómo estados hiperglucémicos prolongados afectan otros tejidos no vasculares tales como neuronas. Debido a trabajos con líneas celulares se conoce que los efectos de la exposición a glucosa afectan directamente a las células; sin embargo, el estudio en organismos completos resulta complicado ya que no es fácil diferenciar los efectos dados por el daño en la vasculatura del tejido de los daños de las células del tejido por el estado hiperglucémico.

1.3 Efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso

Tanto la diabetes como la obesidad están relacionadas con un incremento en el riesgo de neuropatías derivadas de la exposición a altos niveles de glucosa. Existen neuropatías únicas generadas a partir de estados hiperglucémicos como lo son la neuropatía hiperglucémica y la neuropatía autonómica (Tomas & Watkins, 1998). La neuropatía hiperglucémica es una patología caracterizada por el daño de los nervios periféricos como resultado de un estado hiperglucémico prolongado (Izenberg *et al.*, 2015). En el caso de la neuropatía autonómica esta patología está caracterizada por el daño de los nervios que controlan los órganos internos, resultando en problemas cardíacos, urinarios y digestivos (*idem*).

Por mucho tiempo se pensó que el daño al sistema nervioso derivado de la hiperglucemia estaba confinado únicamente al sistema nervioso periférico; sin embargo, recientemente se ha mostrado que la prolongación de estadios hiperglucémicos causa también afecciones en el sistema nervioso central. La diabetes está asociada con un decremento de aproximadamente 1.2 veces en las capacidades cognitivas, y un aumento promedio de 1.6 veces en el riesgo de demencia, esto sobre todo en personas que han vivido un largo periodo de tiempo con hiperglucemia (Cuckierman *et al.*, 2005; McCrimon *et al.*, 2012). En adultos mayores con diabetes existen daños visibles por resonancia magnética en estructuras cerebrales tales como el hipocampo y la amígdala, lo cual es considerado como parte del daño por hiperglucemia que aumenta el riesgo de demencia, tal como demencia por Alzheimer (den Heijer *et al.*, 2003). De igual manera se ha asociado que pacientes con diabetes tienen deficiencias en habilidades psicomotoras y de atención (Biessels *et al.*, 2006). Las deficiencias cognitivas de pacientes de diabetes están relacionadas con un decremento en la masa del hipocampo (Gold *et al.*, 2007). Por otra parte, existen alteraciones metabólicas en el cerebro de pacientes diabéticos con retinopatías comparados con los metabolitos de cerebros de individuos sanos (Tong *et al.*, 2014). Dichos estudios metabólicos se realizan por medio de espectroscopía de resonancia magnética de protones.

A pesar de la relación entre la hiperglucemia y el deterioro de las capacidades cognitivas en humanos, los mecanismos moleculares no están del todo caracterizados y consecuentemente no hay ningún tratamiento o estrategia para aminorar los efectos de la hiperglucemia sobre el SN. Se han desarrollado algunos modelos animales para estudiar los efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso, muchos de ellos en ratas. Por ejemplo, ratas que se alimentan con dietas altas en grasa tienen un decremento en diversos paradigmas de memoria como el laberinto radial de Olton, y el laberinto acuático de Morris (Greenwood & Winocur, 1990; Chen *et al.*, 2017). Cabe mencionar que, modelos de dietas altas en grasas tienen como resultado el aumento de peso en los animales y a su vez en el contenido de azúcar sanguíneo. De igual manera, en modelos de diabetes en ratas inducida por estreptozotocina, estas muestran un decremento en el aprendizaje espacial (Biessels *et al.*, 1996). Usando este mismo modelo se ha mostrado que las ratas presentan muerte neuronal en el hipocampo debido a ERO provenientes de la mitocondria (Ye *et al.*, 2011). De manera relevante, se ha caracterizado que el efecto de la hiperglucemia puede afectar a las generaciones futuras. Esto se demostró en la progenie de ratas expuestas a hiperglucemia, las cuales presentan mayor apoptosis en el hipocampo causando problemas posteriores en el aprendizaje (Ghafari *et al.*, 2016).

Existen diversos mecanismos propuestos para explicar los efectos de los estados hiperglucémicos sobre el sistema nervioso, en particular el sistema nervioso central. El efecto de las ERO sobre las células es uno de los principales mecanismos propuestos como causante del daño en el sistema nervioso central, ya que promueven la acumulación de proteínas mal plegadas y aumentan la muerte celular. Existen distintos datos que apoyan esta propuesta tales como la muerte neuronal en el hipocampo por la liberación de citocromo c al citoplasma (Ye *et al.*, 2011). Otro de estos mecanismos es por daños en la barrera hematoencefálica, causando así filtraciones del contenido de los vasos sanguíneos periféricos hacia el sistema nervioso; sin embargo, estudios en ratones han demostrado que una hiperglucemia prolongada no compromete la barrera hematoencefálica por lo que hay datos contradictorios al respecto de este mecanismo (Janelidze *et al.*, 2017; Maë *et al.*, 2018). Debido a que la neurogénesis en el hipocampo es necesaria para el aprendizaje y memoria, varios estudios indican que estados hiperglucémicos afectan la neurogénesis por lo que se considera otro mecanismo propuesto para explicar los efectos de la hiperglucemia sobre el sistema nervioso central (Umegaki, 2014; Lang *et al.*, 2008). Con respecto a este mecanismo propuesto existen diversas controversias, ya que no se sabe certeramente que haya neurogénesis en el cerebro adulto en condiciones basales.

Como se ha dicho anteriormente, la hiperglucemia prolongada lleva a un aumento en los AGEs, los cuales son considerados como otro mecanismo que afecta al sistema nervioso. Existen datos de pacientes con enfermedad de Alzheimer y diabetes que presentan un mayor contenido de AGEs en el sistema nervioso, al igual que un incremento en la actividad de microglia la cual aumenta debido a la presencia de los AGEs en las neuronas (Umegaki, 2014). La inflamación en el sistema nervioso como respuesta a la hiperglucemia prolongada es considerada otro de los mecanismos participantes en el daño a dicho sistema. La muerte neuronal, el aumento de AGEs y los daños en la barrera hematoencefálica llevarían como consecuencia a un aumento

en la inflamación (Lu *et al.*, 2014; Rom *et al.*, 2020). Finalmente los efectos de la micro y macrovasculatura han sido uno de los principales candidatos para explicar los efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso. El tejido vascular es uno de los tejidos que se ve más afectado en hiperglucemia persistente y se sabe que es causante de daños en el sistema nervioso periférico, por lo que también ha sido propuesto para explicar los daños en el sistema nervioso central (Umegaki, 2014). Daños en la vasculatura también son considerados como causantes de infartos, microinfartos cerebrales e isquemias (Adeshara *et al.*, 2016; Umegaki, 2014).

Aun cuando se conoce que estados hiperglucémicos prolongados tienen claros efectos en el cerebro, los cuales repercuten en el funcionamiento cognitivo, y hay distintos mecanismos propuestos, los procesos moleculares y celulares tras este fenómeno no son claros. Debido a que los organismos modelo utilizados para los estudios presentan vasculatura, ha sido difícil discriminar si los efectos observados provienen de un daño sobre las neuronas o por los daños de la microvasculatura cerebral. Generar modelos en organismos completos en los cuales se pueda estudiar el efecto de la glucosa directamente sobre las neuronas podría ser relevante para intentar dilucidar los mecanismos moleculares que ocurren en la presencia de ésta, y posteriormente para desarrollar terapias o tratamientos encaminados en aminorar los efectos sobre el sistema nervioso en estados hiperglucémicos.

1.4 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

Existen diversos organismos modelo para el estudio de los efectos de la hiperglucemia, desde vertebrados hasta modelos invertebrados como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. *Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre no patógeno perteneciente a la familia *Rhabditidae*. Se introdujo como modelo de estudio en los 60's por Sydney Brenner con un énfasis en el conocimiento de mecanismos básicos aplicados a la biomedicina. *C. elegans* ha sido utilizado para estudios de distintas índoles dadas las siguientes características: tiene un tamaño pequeño (1 mm) y fácil manutención; es un organismo transparente, por lo cual es fácil observar su desarrollo por microscopía; se ha caracterizado de manera detallada su genoma y así como el linaje y diferenciación de las células que lo componen. Además presenta un ciclo de vida corto con una alta tasa de descendientes de aproximadamente 300 por hermafrodita. *C. elegans* cuenta con dos sexos de los cuales los organismos hermafroditas (XX) constituyen alrededor del 99.9% de la población y los machos (XO) entre el 0.1 y 0.2%. Una característica que lo ha hecho un excelente modelo de estudio en la Biología del desarrollo es que presenta una celularidad fija, es decir el mismo número de células en todos los organismos: los gusanos hermafroditas están constituidos exactamente por 959 células somáticas de las cuales 302 son neuronas mientras que los machos poseen 383 neuronas (Sulston *et al.*, 1983). *C. elegans* es capaz de modificar su conducta en respuesta a estímulos ambientales y presenta comportamientos complejos, al igual que aprendizaje y memoria a corto y largo plazo (Rankin *et al.*, 1990).

1.4.1 Ciclo de vida

C. elegans tiene un ciclo de vida compuesto por un estadio embrionario, cuatro estadios larvarios, y el estadio adulto (Fig 1). A 20 °C, el estadio embrionario dura 24 horas. El desarrollo *in útero* consiste de una etapa de proliferación, la cual comprende la división celular a partir de una célula hasta 550 células y se forman las tres capas germinales, y la etapa de organogénesis y morfogénesis donde comienza la diferenciación celular terminal (Sulston *et al.*, 1983). Una vez culminada esta etapa los embriones son ovopositados en el medio. El embrión de *C. elegans* presenta una cutícula que permite que el embrión sea depositado y posteriormente eclosiona la larva L1 (Corsi *et al.*, 2015). A las 14 horas después de que los embriones son depositados, eclosionan dando comienzo al estadio L1 con 558 núcleos; éste estadio larvario dura aproximadamente 16 horas. Las siguientes etapas larvarias posteriores (L2, L3 y L4) duran aproximadamente 12 horas cada una: durante los primeros estadios de la etapa larvaria L3 comienza la diferenciación de las células que formarán la vulva, espermateca y gónada; en la etapa L3 tardía se desarrolla la espermateca y el útero (Kimble & Hirsh, 1978). Posteriormente durante la etapa L4 se concluye la gonadogénesis. Una vez concluida la etapa larvaria L4, el nematodo llega al estadio adulto, en el que comienza la oviposición de embriones (Fig 1). Cada hermafrodita adulto produce alrededor de 300 embriones por autofertilización en un periodo fértil que abarca de 2 a 3 días (Corsi *et al.*, 2015).

En presencia de estresores medioambientales tales como aumento de temperatura, falta de comida y un alza en la densidad poblacional, *C. elegans* puede entrar a tres estadios alternativos de desarrollo, los cuales se asocian a distintos factores del ambiente. Estos consisten en la diapausa L1, la cual se origina a partir de la eclosión en estados de ayuno; y la etapa dauer, que surge a partir de ayuno y densidad poblacional en el paso del estadio larvario L1 a L2. En el caso de la etapa dauer las larvas desarrollan un sello de cutícula en la cavidad bucal y anal. Las larvas dauer pueden permanecer en este estadio de quiescencia durante meses, pero cuando las condiciones ambientales son favorables, los dauer son capaces de regresar al ciclo de vida en la etapa L4. Finalmente existe la diapausa al final de la etapa L4, la cual se genera a partir de ayuno y es denominada como diapausa reproductiva del adulto o ARD por sus siglas en inglés (Angelo & Van Glist, 2009). Estos estadios alternativos no afectan la longevidad ni la capacidad reproductiva de los nematodos (Cassada & Russel, 1975) pero le confieren una enorme capacidad de sobrevivir a condiciones ambientales adversas.

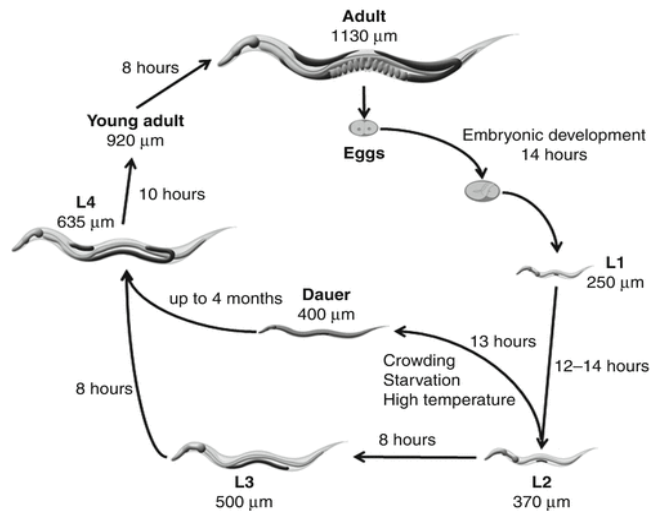


Figura 1. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*. En la figura se muestra el ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C el cual atraviesa por cuatro estadios larvarios (L1-L4) antes de llegar a adulto en 72 hrs. En el centro se puede observar uno de los estadios alternativos de desarrollo: la etapa dauer, que es inducido por diversos estresores ambientales. Tomado de: Vergara-Irigaray N., Riesen M. (2012)

1.4.2 El Sistema nervioso de *C. elegans*

C. elegans es un excelente modelo para el estudio del sistema nervioso ya que todas sus neuronas se encuentran mapeadas (Hall *et al.*, 1991) y presenta comportamientos complejos como aprendizaje asociativo, no asociativo, y memoria a corto y largo plazo (Katz & Shaham, 2019; Rankin *et al.*, 1990) pero a la vez posee un sistema nervioso muy simple en comparación con cualquier organismo vertebrado. Este sistema nervioso está compuesto por ganglios que se encuentran en la faringe y la cola. Entre los ganglios localizados en la faringe se destaca el anillo nervioso, al cual se proyectan 180 axones y procesos de las 302 neuronas del sistema nervioso (Chitwood & Chitwood, 1950). Además se conocen los circuitos neuronales que participan en varios procesos del organismo tales como la atracción a odorantes, aversión a bacterias, e incluso mecanismos de cópula (Bragmann, Hartwelg & Horvitz, 1993; Bargmann & Mori, 1997; Pirce-Shimomura, *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, cada hermafrodita adulto posee 302 neuronas las cuales se encuentran organizadas en ganglios en la cabeza, la cola y el cordón nervioso ventral. Tanto las dendritas como los axones son capaces de formar sinapsis. Recientemente se ha descrito el “conectoma” completo del nematodo, es decir, se mapearon todas las conexiones existentes de cada neurona (Bragmann & Horvitz, 1991; Cook *et al.*, 2019; White *et al.*, 1998). Hasta donde sabemos, *C. elegans* es el único animal al que se le ha mapeado en su totalidad el sistema nervioso, y se describe que el hermafrodita adulto tiene alrededor de 5,000 sinapsis químicas de las cuales 2,000 son de uniones tipo gap (Cook *et al.*, 2019). El sistema nervioso de *C. elegans* utiliza la mayoría de los neurotransmisores presentes en mamíferos tales como GABA, acetilcolina, serotonina, dopamina y glutamato (Hobert, 2013).

A pesar de ser un organismo con menos de 1,000 neuronas, *C. elegans* tiene un sistema nervioso que lleva a cabo procesos complejos y que presenta varias similitudes con el sistema nervioso de mamíferos. Por ello, *C. elegans* es un modelo útil para establecer distintos paradigmas por lo que se utiliza comúnmente para estudiar procesos conductuales y analizar detalladamente la función neuronal.

1.5 Conducta en *C. elegans*

En su ambiente natural, *C. elegans* es capaz de detectar diversas moléculas volátiles y solubles que llevan a respuestas específicas como atracción o repulsión que le permiten al nematodo encontrar comida o alejarse de depredadores (Bargmann & Mori, 1997). Se ha caracterizado que en el nematodo es capaz de reconocer los estímulos químicos mediante 11 pares de neuronas quimiosensoras que se encuentran en órganos anfidos cerca de la faringe del animal (Ward et al 1975) (Fig 2). Las conductas de atracción o repulsión que surgen ante los estímulos químicos se denominan conductas de quimiotaxis. Dichos estímulos son reconocidos por receptores acoplados a proteínas G, que dependiendo de la neurona en la que se expresen generan conductas específicas (Tromel, 1997). Debido a la importancia conductual que depende de estas neuronas quimiosensoras, diversos grupos de investigación se han dedicado a su estudio y mapeo. Por ejemplo, se conoce que el receptor ODR-3 es necesario para el funcionamiento correcto de las neuronas sensoriales, y que el receptor ODR-10 es necesario para la detección de los odorantes isoamyl alcohol, butanona y benzaldehído (Bragmann et al., 1993). Los odorantes volátiles, los cuales son una señal de presencia de alimento o de algún patógeno, son reconocidos por las neuronas quimiosensoras AWB, AWC y AWA (Wes & Bargmann, 2001). Estas neuronas tienen cilios los cuales no salen del cuerpo del nematodo, por lo que se piensa que los odorantes volátiles permean la cutícula de *C. elegans* llegando a sus respectivos receptores (Troemell et al., 1997). Las neuronas AWC detectan benzaldehído, butanona, isoamyl alcohol, y 2,3- pentanodione. Estos cuatro odorantes son atractivos para el nemátodo por lo que generan una quimiotaxis positiva hacia ellos (Bragmann et al., 1993; Tromell et al., 1997). Cada nematodo tiene dos neuronas AWC: una derecha, AWC *right* abreviada como AWCR, y una izquierda (*left*) denominada AWCL. En el caso de la butanona, la cual es una cetona, ésta sólo se detecta en una de las dos neuronas AWC (R o L), mientras que la otra neurona detecta el 2,3- pentanedione. La determinación respecto a qué neurona AWC -R o -L detectará que compuesto, entre la pentanedione y la butanona, ocurre de manera aleatoria durante el desarrollo del *C.elegans* (Troemell et al., 1997). Los odorantes aquí mencionados se encuentran naturalmente en el ambiente de los nematodos, y en su mayor parte se producen por descomposición de alimentos en el suelo por lo que señalizan una posibilidad de alimento. Ante ellos existe un comportamiento de atracción de parte de los nemátodos cuando estos se encuentran en bajas concentraciones. Como se ha dicho anteriormente, el estudio de las neuronas quimiosensoras y sus respectivos receptores ha contribuido a entender mejor la conducta en *C. elegans*.

Por otro lado, *C. elegans* también puede detectar compuestos asociados a patógenos o depredadores lo que resulta en su huida de la zona de peligro, es decir, en

una conducta aversiva. Al contrario de las conductas atractivas, las conductas aversivas resultan en quimiotaxis negativa, tal y como sucede con el alcohol. Estas conductas aversivas se encuentran mediadas por las neuronas ASH, ADL, AWB y ASK (Fig 2). La exposición a altas concentraciones de sales, SDS y quinina provoca conductas de aversión en el nematodo (Bragmann *et al.*, 1990; Hilliard *et al.*, 2004). Algunos odorantes como el octanol le producen aversión Nuttley *et al.*, 2001; Kimmura *et al.*, 2010). En el caso particular del benzaldehído, solo se ve este comportamiento en altas concentraciones de este odorante; sin embargo, en baja concentración le resulta atractivo (Remy 2003). Se conoce que las conductas aversivas dependen de la generación de cGMP (Krzyzanowski *et al.*, 2019).

C. elegans presenta conductas específicas ante dichos odorantes, los cuales pueden representar un estímulo positivo, como la presencia de comida, o incluso un estímulo negativo. Ya que los nematodos tienen comportamientos definidos, el estudio de las neuronas quimiosensoras y de los receptores que detectan distintos odorantes ha sido una parte integral para comprender la conducta en *C. elegans*, y ha permitido que se desarrollen paradigmas de memoria en este modelo.

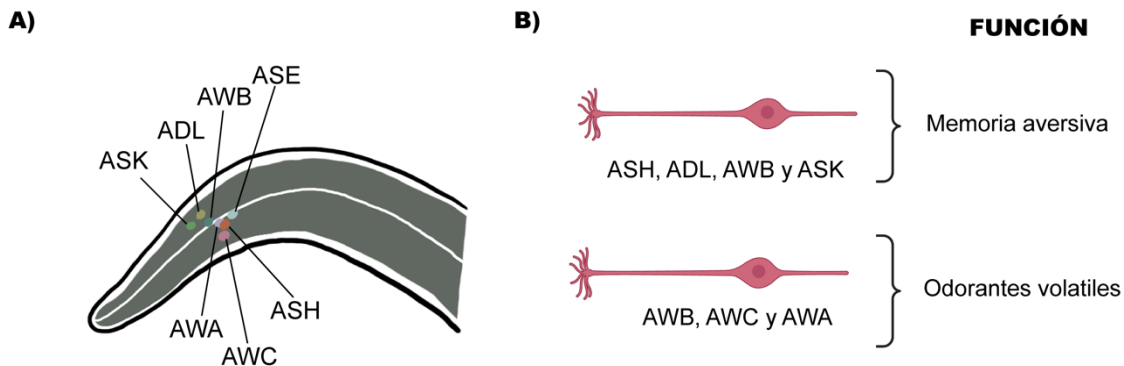


Figura 2. Neuronas quimiosensoras de *C. elegans*. A) Se muestran siete de las once neuronas quimiosensoras localizadas en el órgano anfido de *C. elegans* B) Función general de las neuronas quimiosensoras previamente mencionadas y representadas.

1.5.1 Paradigmas de memoria y aprendizaje en *C. elegans*

Con base en las conductas específicas de *C. elegans* ante diversos estímulos se han establecido distintos paradigmas de memoria y aprendizaje en este nematodo. Dichos ensayos se pueden clasificar dependiendo del tipo de memoria generada, dividiéndose en paradigmas de memoria no asociativa y paradigmas de memoria asociativa que a continuación se describen:

- Memoria no asociativa: La memoria no asociativa consiste en el decremento de una respuesta específica a un estímulo si se prolonga la presencia de este, y se puede establecer en una memoria a largo y a corto plazo (Wen *et al.*, 1997). Ejemplo de esta última se encuentra en los ensayos de habituación mecanosensorial que se basan en una respuesta intrínseca de *C. elegans* denominada “*Tap Withdrawal Response*”, en la cual los nematodos retroceden una distancia determinada en respuesta a un estímulo mecánico localizado (Rankin *et al.*, 1990). Al estimular repetitivamente a los nematodos, éstos decrementan su distancia de retroceso progresivamente. Este efecto se incrementa al dar un estímulo eléctrico, sugiriendo que la disminución de la respuesta se debe a mecano-habituación, y no a adaptación o fatiga (Rankin *et al.* 1990). Usando este modelo de estímulo y respuesta se puede generar memoria a largo plazo si se hace un régimen de entrenamiento de los estímulos mecánicos (Beck & Rankin, 1996). De igual manera, se puede generar memoria no asociativa a largo plazo a partir de la exposición constante a un odorante atrayente para el nemátodo (Colbert & Bragman, 1997). Esta exposición causa una pérdida de quimioatracción específica hacia dicho odorante, pero no así a otros odorantes, aun cuando éstos sean detectados por la misma neurona (Colbert & Bragman, 1997).

- Memoria asociativa: Los paradigmas de este tipo de memoria consisten en la asociación de dos estímulos no relacionados. Por ejemplo, cuando *C. elegans* es capaz de reconocer y asociar estímulos térmicos, olfativos y gustativos, tanto de manera aversiva como atractiva. Un ejemplo de memoria aversiva es la respuesta a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*: en una primera exposición a dicha bacteria, *C. elegans* tiene una atracción basal a *P. aeruginosa*; sin embargo, después de una segunda breve exposición a esta bacteria patogénica causa posteriormente una respuesta aversiva (Zhang, Lu & Bragmann, 2005). Por otra parte, *C. elegans* presenta una atracción a distintas sales. En el caso del NaCl ambos iones son detectados y causan atracción, pero esto se da a través de dos neuronas diferentes: el Na⁺ se detecta por la neurona ASEL, mientras que el Cl⁻ se detecta por la neurona ASER (Pirce-Shimomura, *et al.*, 2001). Con base en esto se han creado paradigmas de aversión y atracción a NaCl por medio de aparear el estímulo en presencia o ausencia de comida: cuando los nematodos se encuentran en presencia de NaCl y comida durante 4 horas, la atracción a la sal durante el ensayo de quimiotaxis es mayor que la de los nematodos que nunca antes han sido expuestos al estímulo de NaCl; sin embargo, si se expone al nemátodo a NaCl en ausencia de comida, los nematodos evitan la sal durante el ensayo (Saeki, *et al.*, 2001). Esto demuestra que *C. elegans* es capaz de relacionar un estímulo, ya sea un odorante o la presencia de un ion, con un beneficio, como la presencia de comida, o un estado perjudicial como el ayuno o la inflamación. Como consecuencia de dicha correlación, los nematodos generan memorias las cuales dictan conductas específicas de quimiotaxis.

Otro tipo de paradigma de memoria asociativa es el *imprinting* el cual es una memoria a largo plazo que solo ocurre al exponer a los animales a un estímulo durante un periodo determinado durante el desarrollo. Uno de los paradigmas más utilizados de *imprinting* en *C. elegans* es hacia el odorante benzaldehído. El benzaldehído es un aldehído aromático que se produce en frutos y semillas y que ecológicamente está en fuentes de comida para el nemátodo. Este odorante causa una atracción basal en los nemátodos cuando se encuentra en concentraciones bajas (menores de 1% de concentración), y es percibido por la neurona AWC (Wes & Bargmann, 2001). Se ha caracterizado que la atracción al benzaldehído está mediada por el neurotransmisor serotonina, lo cual involucra receptores de serotonina ya siendo los tres metabotrópicos, SER-1, SER-4 y SER-7, o el canal de cloro mediado por serotonina MOD-1 (Colbert & Bargmann, 1997; Olde & McCombie, 1997; Ragnathan *et al.*, 2000). Por otra parte, cuando el benzaldehído se encuentra en concentraciones absolutas, este odorante actúa como un estímulo aversivo y se detecta por las neuronas AWB, ADL y ASH (Bargmann *et al.*, 1993). El paradigma de memoria asociativa al benzaldehído consiste en exponer a los nematodos durante 24 horas al inicio del desarrollo (estadio 24 células a L1) a concentraciones bajas de benzaldehído en presencia de comida. Cuando son adultos, se realiza un ensayo de quimiotaxis entre el benzaldehído y comida que consiste en poner a los nemátodos. Los nemátodos que previamente fueron expuestos al odorante muestran una mayor quimioatracción a éste que los nemátodos que nunca han sido expuestos a él (Remy & Hobert, 2005). Este proceso de *imprinting* se encuentra mediado por la interacción del par de neuronas AWC y la interneurona AIY (Adriel & Rankin, 2010).

Como mencionado anteriormente, los nematodos pueden generar distintas memorias específicas que resultan en un cambio conductual, generalmente medido por aversión o atracción, dependiendo de una experiencia previa. Debido al extenso conocimiento del sistema nervioso y en particular de las neuronas quimiosensoras, los paradigmas de memoria y aprendizaje desarrollados en *C. elegans* permiten estudiar directamente los procesos que ocurren en el sistema nervioso. Con esto en mente este nematodo representa un excelente modelo para estudiar procesos de memoria.

1.6 Vías de respuesta a estímulos ambientales conservadas en *C. elegans*

Las vías de señalización son mecanismos secuenciales capaces de percibir un estímulo, traducir una señal y modular la expresión genética, y pueden llevar a un proceso de respuesta en la célula. A continuación se describen algunas vías y procesos celulares conservados en *C. elegans*.

1.6.1 Vía de señalización de tipo insulina

En humanos, la vía de respuesta a la hormona insulina está involucrada principalmente con la internalización celular de glucosa. La vía de la insulina se encuentra altamente conservada en animales incluyendo nematodos tales como *C. elegans* donde esta vía participa en diversos procesos que van de la regulación del metabolismo hasta el control del desarrollo larvario y la regulación de la esperanza de vida (Uno & Nishida, 2016).

En *C. elegans* el gen *daf-2* es el único ortólogo que codifica para un receptor de insulina (Kimmura *et al.*, 1997) el cual es capaz de reconocer a una gran cantidad de péptidos tipo insulina (ILPs) que produce el nematodo (Kawano *et al.*, 2000; Pirce *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). En el genoma de *C. elegans* existen 40 genes que posiblemente codifican para ILPs, siendo el péptido INS-1 el más parecido en secuencia al péptido de insulina humana (*idem*). Hasta ahora se conoce que de estos 40 genes, 9 funcionan como antagonistas de la vía mientras que 16 funcionan como agonistas e interesantemente la insulina humana es capaz de activar la vía de insulina en *C. elegans* (Pirce *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2018). A diferencia de mamíferos, la vía tipo insulina de *C. elegans* está únicamente parcialmente involucrada en el transporte intracelular de glucosa por medio del transportador FGTR-1, ya que mutantes de *daf-2* reducen la internalización de glucosa a las células (Feng *et al.*, 2014; Zarse *et al.*, 2012).

En la vía de la insulina de *C. elegans* (Fig 3), los ILPs son reconocidos por el receptor DAF-2 el cual recluta al substrato IST-1, esto conduce a la activación del ortólogo de PI3K, la proteína AGE1 (Wolkow *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 1996). La activación de AGE1 lleva al aumento de fosfatidilinositol (4,5)-trifosfato (PIP3) causando así que se active la cascada de quinasas de PDK-1 y AKT-1/-2, lo que culmina con la fosforilación de diversos factores de transcripción impidiendo su translocación al núcleo (Paradis *et al.*, 1998). Por otro lado, la vía de insulina en *C. elegans* se ve regulada negativamente por DAF-18, ortólogo de PTEN, el cual inhibe la formación de PIP3 y por PPTR1 (Oggs & Ruvkun, 1998).

Entre los factores de transcripción que se ven regulados por la vía de la insulina en *C. elegans* se encuentra el ortólogo de FOXO, DAF-16, el cual se ve regulado negativamente. DAF-16 es uno de los principales genes involucrados en la regulación de la esperanza de vida en *C. elegans*. Trabajos pioneros en el campo del envejecimiento demostraron que mutantes knock-out de DAF-2 tienen una mayor esperanza de vida debido al aumento de la función de DAF-16, es decir que este no se fosforila por esta vía y se puede internalizar al núcleo donde actúa como factor de transcripción (Kenyon *et al.*, 1993; Kimmura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997). Adicionalmente DAF-16 se puede regular por otras vías tales como AMPK, TOR, JNK y por señalización de la línea germinal (Sun *et al.*, 2017). Es importante mencionar que

se ha demostrado que DAF-16 está involucrado en procesos de memoria a largo plazo al igual que en quimiotaxis y conducta en *C. elegans*. Se conoce que DAF-16 regula la expresión del gen de la glutaminasa *glna-3* afectando la neurotransmisión glutamatérgica que a su vez regula la atracción o repulsión a feromonas (Park *et al.*, 2017). Mutantes de *daf-2* tienen un incremento en el tiempo de retención de memoria, mientras que mutantes de *daf-16* presentan un decremento en la memoria a largo plazo, demostrando que DAF-16 está involucrado con la retención de la memoria a largo plazo en paradigmas utilizando butanona (Kauffman *et al.*, 2020). Se ha identificado que ILP's en neuronas inhiben a DAF-2 y llevan a la reducción del aprendizaje olfativo (Chen *et al.*, 2013). Por otra parte, mutantes de *daf-16* presentan deficiencias en la quimiotaxis hacia NaCl y en distintas concentraciones de sal (Tomioka *et al.*, 2006; Nagasima *et al.*, 2019). Es claro que la vía de la insulina a través de DAF-16 está relacionada con la conducta y el aprendizaje en *C. elegans*; sin embargo, aún no se conoce si factores externos afectan su efecto en la conducta y memoria, ni si están involucrados en todos los tipos de paradigmas.

Otro de los factores de transcripción regulados por la vía de la insulina en *C. elegans* es el factor de transcripción sensible a estrés oxidativo NRF, denominado SKN-1 en *C. elegans* (Tullet *et al.*, 2008). SKN-1 está involucrado en la homeostasis de proteínas, respuesta a estrés y detoxificación celular (An *et al.*, 2005; Olviera *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). Debido a estas funciones también se ha demostrado que participa en el aumento de la esperanza de vida en ausencia de DAF-2. De igual manera, HSF-1 es otro factor de transcripción que se regula por la vía de la insulina y que está involucrado en la reducción de la proteotoxicidad, al igual que en la regulación de genes codificadores para chaperonas (Garigan *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2002; Walker & Lithgow, 2003).

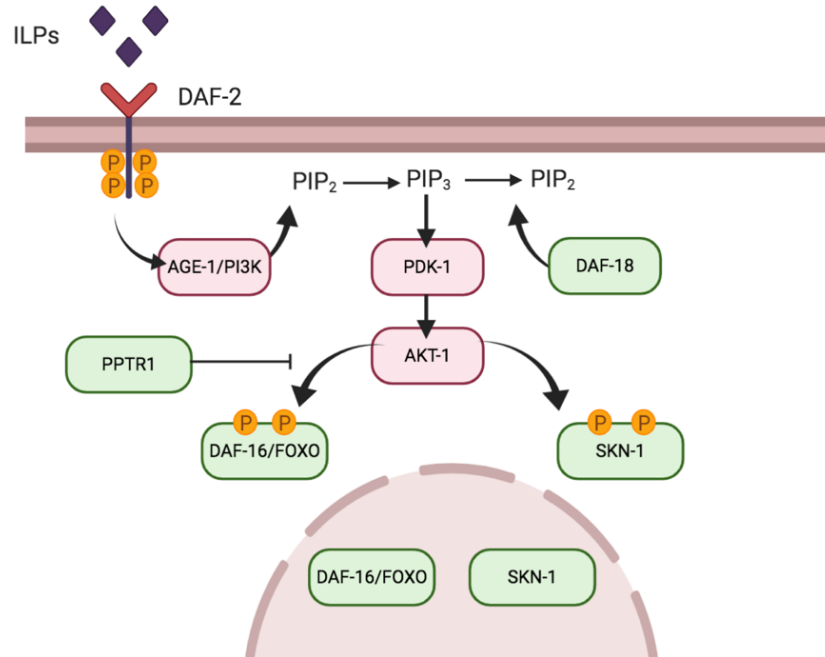


Figura 3. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*. En la figura se muestra la vía de señalización de la insulina en *C. elegans*. En morado se representan los péptidos tipo insulina que son reconocidos por el receptor DAF-2 lo que provoca su autofosforilación. Posteriormente, DAF-2 fosforila y activa a AGE-1. AGE1 activa fosforilando a PIP₂ el cual se convierte en PIP₃, y que a su vez activa a PDK-1. PDK-1 fosforila a las quinasas AKT-1. AKT-1 fosforila a los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1, evitando su relocalización al núcleo. En rojo se muestran a los reguladores negativos de los factores de transcripción, y en verde se muestran a reguladores positivos de la vía como DAF-18 y PPTR1.

1.6.2 CREB/crh-1

La proteína CREB (cAMP response element binding protein) es un factor de transcripción que está implicado en distintos procesos celulares que van desde el desarrollo celular hasta la respuesta inmune y en mamíferos ha demostrado ser esencial para el establecimiento de memoria a largo plazo. Este factor de transcripción se activa a través de la fosforilación de la serina 133 causando su translocación al núcleo y su unión al DNA específicamente a las secuencias CRE (cAMP response element) en los promotores de sus genes blanco a través de su dominio BZIP (Alberini, 2009). CREB puede ser activado por la vía de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de cAMP (Gonzalez & Montminy, 1989). Otra de las maneras por las que CREB puede ser activado es por la entrada de Ca²⁺ la cual lleva a la activación de cinasas calcio-calmodulina dependientes (CaMK). Este tipo de activación se da principalmente en neuronas.

Una de las principales funciones con las que se relaciona CREB es con el proceso de plasticidad sináptica y memoria a largo plazo en animales (Bartsch, 1998). Se sabe que CREB regula un gran número de genes neuronales, incluyendo genes involucrados en la producción de neurotransmisores, y en genes que codifican para factores de transducción de señales (Sakamoto *et al.*, 2011). La sobreexpresión de la isoforma activa de CREB acelera el proceso de aprendizaje en *Drosophila melanogaster* en un modelo de aprendizaje olfativo, mientras que la sobreexpresión de la isoforma dominante negativa de CREB causa el bloqueo de la consolidación de dicha memoria olfativa (Yin, 1994; Yin, 1995). De igual manera, se ha demostrado que las isoformas α - y δ - de CREB en ratón están involucradas con la potenciación neuronal a largo plazo y que estas isoformas están involucradas en la memoria a largo plazo (Kim *et al.*, 2013).

En *C. elegans* *crh-1* es el gen ortólogo de CREB (Kimura *et al.*, 2002). *crh-1* se expresa principalmente en neuronas y en el intestino de manera constitutiva. Se sabe que, como en otros animales, *crh-1* regula la formación de la memoria a largo plazo debido a que mutantes en este gen tienen impedimentos en paradigmas de memoria (Kauffman *et al.*, 2010; Nishida *et al.*, 2011) y se ha observado que su actividad es esencial durante el entrenamiento de los gusanos en el proceso de memoria asociativa (Dahiya *et al.* 2019). CRH-1 controla la expresión del gen *tph-1* el cual es necesario para la síntesis de serotonina (Zubenko *et al.*, 2009). Otra de las funciones que ejerce *crh-1* en *C. elegans* es la regulación de la esperanza de vida ya que mutantes nulas de *crh-1* presentan un decremento en su esperanza de vida en comparación con la cepa silvestre (Mair *et al.*, 2011).

1.6.3 Apoptosis

La muerte celular programada, denominada apoptosis, es un proceso esencial para el desarrollo de la mayoría de los organismos pluricelulares y de hecho fue inicialmente caracterizada en *C. elegans* por Jhon Sulston (Check, 2002). En *C. elegans* muchos de los mecanismos que regulan y participan en el mecanismo de muerte celular son conocidos y sus funciones están altamente conservadas en humanos (Horvitz 2003). La muerte celular programada en *C. elegans* ocurre en el tejido somático en la etapa embrionaria y en la etapa post-embrionaria (Sulston & Horvitz, 1977; Sulston, 1983). Durante el desarrollo del nemátodo hay 1090 células somáticas de las cuales 131 sufren apoptosis. Es importante mencionar que en la gónada de las hermafroditas existe un proceso postembrionario de apoptosis denominado como “muerte celular de la línea germinal”, el cual es necesario para el correcto desarrollo de la línea germinal (Gumienny *et al.*, 1999).

El proceso apoptótico clásico en *C. elegans* se divide en tres fases: especificación, muerte y ejecución (Fig 4). La fase de especificación consiste en la selección de qué células sufrirán apoptosis y qué células se mantendrán durante el desarrollo. Posteriormente comienza la fase de muerte, dentro de la cual se activa el sistema apoptótico. El primer paso durante la fase de muerte es la expresión de EGL-1, la cual lleva a apoptosis (Horvitz, 2003). EGL-1 inhibe la actividad de CED-9, lo cual permite la translocación de CED-4 a la membrana perinuclear para iniciar la muerte celular (Chen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004). En *C. elegans*, existe una sola caspasa ejecutora en la apoptosis, CED-3, la cual se activa tras escisiones auto proteolíticas y lleva a la muerte celular (Chen *et al.*, 2000). Finalmente, en la fase de ejecución se inicia el proceso de desensamblaje celular, dentro del cual hay una constricción del citoplasma, se fragmenta el DNA y se señala para que la célula sea fagocitada (Steller, 1995).

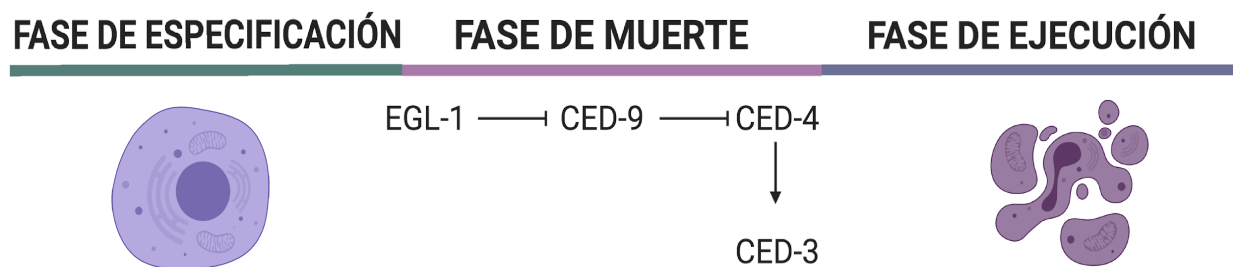


Figura 4. Vía clásica de apoptosis en *C. elegans*. En la figura se muestran las tres fases de la muerte celular: la fase de especificación, la fase de muerte y la fase de ejecución. Durante la fase de especificación se determina que una célula llevará a cabo el proceso apoptótico. Posteriormente en la fase de muerte las células que sufrirán apoptosis expresan EGL-1, permitiendo la activación de CED-4 y posteriormente de la caspasa CED-3. Finalmente, en la fase de ejecución se comienza a desensamblar la célula y se señala para fagocitosis.

1.7 *C. elegans* como modelo para estudiar glucotoxicidad

Debido a la conservación en vías de señalización y vías metabólicas entre *Caenorhabditis elegans* y humanos, este organismo ha sido usado como modelo para estudiar los efectos de la exposición a alta glucosa. Al agregar glucosa en el medio donde crece *C. elegans* se ha observado que los nematodos aumentan su área y su longitud (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019). Sin embargo, dado que *C. elegans* tiene una celularidad fija (953 células), este aumento de talla probablemente se deba a un

aumento en el tamaño de las células. Aunado al aumento de tamaño, los nematodos que han sido expuestos a concentraciones altas de glucosa tienen un alto contenido de glucosa interno el cual es dependiente de la concentración de glucosa a la que se les expuso (Lee *et al.*, 2009, Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019, Schlotterer *et al.*, 2009). De igual manera se ha descrito un aumento en el contenido de triglicéridos tras la exposición a glucosa (Alcantár-Fernández, *et al.*, 2019). Estos resultados demuestran que *C. elegans* es un modelo que responde a exposiciones de alta glucosa de manera similar a fenotipos de hiperglucemia en mamíferos, ya que tiene un aumento en el contenido de glucosa, ácidos grasos e incluso un aumento en la talla.

Otro de los fenotipos característicos de *C. elegans* en respuesta a altas concentraciones de glucosa es el decremento en la esperanza de vida (Shlotterer *et al.*, 2009; Ray, *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009; Alcántar-Fernández *et al.*, 2019). Se sugiere que la reducción en la vida media inducida por la exposición a alta glucosa, depende parcialmente de la vía de señalización tipo insulina. Esto debido a que el factor de transcripción DAF-16 y su blanco *aqp-1* están involucrados en la reducción de la esperanza de vida de los nematodos cuando estos son expuestos a 2% de glucosa (Lee *et al.*, 2009). Es decir que, en presencia de alta glucosa, DAF-16 y sus blancos se encuentran regulados negativamente lo cual lleva a que no se activen genes de longevidad. Otra vía que está relacionada con el decremento en la esperanza de vida bajo estas condiciones es la vía de AMPK, ya que se ha observado que existe una disminución en la activación de AMPK evitando que esta vía pueda proteger de la disfunción mitocondrial y aumento de ERO (Riedinger *et al.*, 2018). Esta evidencia sugiere que la exposición a glucosa repercute en la esperanza de vida de *C. elegans* por distintos mecanismos similares a los que se encuentran asociados con la glucotoxicidad en mamíferos: disfunción mitocondrial, aumento de ERO, y apoptosis.

Otro fenotipo observado ante la exposición a alta glucosa en *C. elegans* es un decremento en la puesta de huevos y un aumento en defectos durante la ovoposición resultando en el fenotipo de “embolsado” referido como *bagging* en inglés (Tashiba *et al.*, 2016; Alcantár-Fernández, *et al.*, 2019). Aunque las vías subyacentes a este fenotipo no están del todo caracterizadas, se sugiere que existen efectos en la reproducción derivados de una exposición a glucosa. En mamíferos se ha observado que estadios hiperglucémicos afectan la fertilidad de los machos, por lo que el fenotipo observado en *C. elegans* tiene similitudes a lo ocurrido a causa de la hiperglucemia (Maresch *et al.*, 2018; Maresch *et al.*, 2019).

Ante los efectos diversos y complejos que tiene la glucosa en *C. elegans*, se ha sugerido la participación de las ERO inducidas por la exposición a alta glucosa como parte del efecto de la glucotoxicidad. En particular, se ha observado que la exposición a alta glucosa causa un aumento en (ERO), al igual que en la producción de AGEs en *C.*

C. elegans (Sholtter, *et al.*, 2011). Aunado a esto, hay un aumento en la expresión y en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), indicando que hay un aumento en el estrés oxidativo que el nematodo intenta compensar (Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019). De igual manera se ha reportado que existen alteraciones en la morfología, masa y función mitocondrial dependiente de la concentración de glucosa a la que han sido expuestos los nematodos (Alcántar-Fernández, *et al.*, 2020). Esta evidencia sugiere que los efectos de la exposición a glucosa en el nematodo está mediado por el aumento en ERO, tal y como se ha observado en mamíferos. Nematodos con sobreexpresión de la glioxalasa-1 presentan un aumento en la supervivencia cuando son expuestos a glucosa en comparación con nematodos con genotipo salvaje en las mismas condiciones (Riedinger *et al.*, 2018). En este mismo estudio se trata a nematodos expuestos a glucosa con mixotiazol, un inhibidor del citocromo bc1 en el complejo mitocondrial, lo cual resulta en una recuperación de la supervivencia (Riedinger *et al.*, 2018). Esos datos evidencian que la reducción de ERO en nematodos expuestos en alta glucosa reduce los efectos de la glucotoxicidad en *C. elegans*.

Para poder entender los mecanismos moleculares detrás de la glucotoxicidad y de los fenotipos resultados de la exposición a alta glucosa en *C. elegans* se ha estudiado el impacto de esta sobre diversos factores de transcripción. Se conoce que el factor de transcripción DAF-16 se ve regulado negativamente bajo la exposición a alta glucosa (Lee *et al.*, 2009; Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019). Como dicho anteriormente, se considera que la desregulación de DAF-16 está involucrada en el decremento de la esperanza de vida en presencia de glucosa. Por otra parte, el factor de transcripción CREB/*crh-1* se sobreexpresa bajo la exposición a alta glucosa de manera dependiente a la concentración de esta (Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019). Por lo tanto, la adición de glucosa al medio es capaz de afectar la actividad de factores de regulación, y a su vez de sus genes blanco aunque no se conoce a profundidad los efectos que dichas alteraciones tiene sobre el organismo.

C. elegans ha sido usado como modelo de estudio de la glucotoxicidad ya que recapitula diversos efectos observados en mamíferos tales como el aumento de ERO, el daño mitocondrial, alteraciones de vías de señalización y de la expresión génica. Así mismo los nematodos presentan fenotipos deletéreos debido a la glucotoxicidad como la reducción en la media de vida, cambios en el número de embriones ovopositados y aumento de tamaño. Como consecuencia, *C. elegans* es un excelente modelo para estudiar los efectos de la exposición a alta glucosa, no obstante aún no se conocen todos los efectos y fenotipos causados bajo dicha exposición.

1.8 Transgeneracionalidad en *C. elegans*

Los organismos son capaces de adaptarse a las condiciones ambientales mediante la regulación de su genoma tanto a nivel transcripcional como traduccional, pero recientemente también se ha demostrado que hay una adaptación a nivel epigenético (Jenuwein & Allis, 2001; Goldberg *et al.*, 2007). Durante las divisiones mitóticas y meióticas la herencia ocurre no solo a nivel genético, si no también en el nivel epigenético (Heard & Martienssen, 2014). En el caso de que la herencia epigenética sólo perdure por tres generaciones, se considera herencia intergeneracional, mientras que si se mantiene más allá de tres generaciones se considera herencia epigenética transgeneracional. Ha sido difícil separar la verdadera herencia intergeneracional del simple hecho que los individuos, en forma de ovocitos, están expuestos al ambiente materno original. Uno de los principales ejemplos de herencia epigenética transgeneracional es el silenciamiento de elementos repetidos en el genoma, tales como transposiciones en *Drosophila* (Ghildiyal & Zamore, 2009). En mamíferos ha sido controvertido el demostrar la herencia transgeneracional, pero ahora parece haber evidencia suficiente que apoya este fenómeno (Lackal & Ventura, 2018; van Otterdijk, 2016).

Existen distintos fenómenos de herencia transgeneracional e intergeneracional en el nematodo *C. elegans* donde se conocen parte de los mecanismos moleculares relacionados en ambos procesos. Se ha reportado que, ciertas conductas – al igual que los efectos de algunos estresores – pueden ser heredados transgeneracionalmente. Por ejemplo, los estímulos de ayuno durante el estadio L1 resultan en un aumento de la longevidad que se puede observar de manera transgeneracional en la progenie de los nematodos (Rechavi *et al.*, 2014). Otro ejemplo de transgeneracionalidad se ha observado al exponer a *C. elegans* durante un periodo corto a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*; como se mencionó anteriormente, los nematodos aprenden a evadir a esta bacteria en posteriores encuentros, pero recientemente se ha descrito que este aprendizaje es heredable por cuatro generaciones (Moore *et al.*, 2019). Otra conducta que presenta herencia transgeneracional es el aprendizaje asociativo a benzaldehído: exponer durante cinco generaciones seguidas a los nematodos al benzaldehído en presencia de comida resulta en que el aprendizaje asociativo se mantiene transgeneracionalmente al menos 40 generaciones (Remy, 2010). El que *C. elegans* presente herencia transgeneracional de conductas probablemente permite que la descendencia tenga una mayor supervivencia si el estímulo se encuentra en el medio ambiente. Este tipo de herencia transgeneracional proveería una mayor adecuación a los descendientes de nematodos previamente expuestos al estímulo; sin embargo, el hecho de que en la mayoría de los casos las conductas se pierdan después de un cierto número de generaciones confiere una plasticidad de adecuación al medioambiente, lo cual se traduce en una ventaja adaptativa, comparado con aquellas conductas que son permanentes.

Parte de los mecanismos moleculares de herencia transgeneracional de *C. elegans* han sido hasta cierto punto elucidados y se basan en la producción y el procesamiento de RNAs pequeños. Poco después del descubrimiento del uso de RNAs de interferencia (RNAi) en *C. elegans* por el grupo de Creig Mello, (Fire *et al.* 1998) se observó que el silenciamiento de los genes blanco del dsRNAs se mantiene durante más de 20 generaciones (Vastenhow, *et al.*, 2006). Se conoce que en el procesamiento de RNAs pequeños endógenos y exógenos, éstos son replicados por medio de RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRPs) y posteriormente son trasladados al núcleo por proteínas argonautas (Sijen *et al.*, 2001; Guang *et al.*, 2008). En el caso de la transgeneracionalidad, el proceso ocurre en la gónada donde la proteína argonauta HRDE-1 tiene un papel muy importante. Se ha descrito que HRDE-1 está involucrada en el procesamiento tanto de endo-siRNAs como de piRNAs. Los piRNAs son un tipo de RNAs pequeños no codificantes que se procesan por una familia de proteínas llamada Piwi. HRDE-1 en conjunto con los factores NRDE 1, 2 y 4 está relacionada con la tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3), modificación de histona que se traduce como una marca de represión transcripcional y heterocromatina (Buckley *et al.*, 2012; Buckhart *et al.*, 2011). Se ha descrito que los endo-siRNAs dirigen el sitio de modificación de la cromatina por H3K9me3 y que este proceso está mediado por la vía de NRDE, y la unión de estos factores a la cromatina (Buckhart *et al.*, 2011). Mutantes de NRDE-2 y NRDE-4 presentan una disminución de esta marca represiva en sitios de unión de genes blanco de NRDE en la gónada, y esta misma disminución de H3K9me3 en genes blanco de NRDE se observó en la gónada de mutantes de HRDE-1 (Buckley *et al.*, 2012). Asimismo, la marca de H3K9me3 inducida por siRNAs se hereda a las siguientes generaciones, e incluso la marca se observa con una mayor penetrancia que en el caso de las generaciones parentales (Burton *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que la vía de procesamiento de RNA pequeños está involucrada en cambios epigenéticos en la gónada, los cuales pueden ser heredados transgeneracionalmente; sin embargo, aún no se conocen bien todos los elementos que participan en este proceso y cómo se lleva a cabo el mantenimiento y el término de silenciamientos y conductas heredables.

Recientemente se ha reportado que RNAs pequeños de neuronas pueden ir a la línea germinal y causar efectos transgeneracionales (Devanapally *et al.*, 2015; Posner *et al.*, 2019). La proteína RDE-4 neuronal, la cual está involucrada en el procesamiento del RNA, genera endo-siRNA's los cuales son posteriormente detectados en gónada, donde se procesan por HRDE-1 (Posner *et al.*, 2019). Es importante mencionar que la actividad de RDE-4 se ha visto que es necesaria para las conductas de migración poblacional y de memoria (Tonkin & Bass, 2003). En este mismo estudio se analizaron los efectos de RDE-4 sobre conductas migratorias de manera transgeneracional, encontrando que la heredabilidad de endo-siRNAs procesados por RDE-4 es capaz de rescatar conductas migratorias en mutantes de RDE-4 (Posner *et al.*, 2019). Por otra

parte, se ha descrito que siRNAs provenientes de la bacteria patógena *P. aeruginosa* son internalizados por *C. elegans* vía SID-1, y participan en el aprendizaje aversivo ante éstas, y este comportamiento aprendido se transmite de manera transgeneracional mediante la vía de procesamiento de RNAs (Kaletsky *et al.*, 2019). Aun cuando se conoce que los RNAs pequeños participan en el proceso de transgeneracionalidad de algunos fenotipos, no se sabe si estos están involucrados en todo tipo de transgeneracionalidad. Así mismo, no se conoce cómo los RNAs de un tejido pueden llegar a otro, ni existe claridad en cómo estos RNAs se comunican con la maquinaria epigenética para dar fenotipos heredables. Recientemente se ha propuesto que alteraciones epigenéticas en el intestino induce cambios en los estados epigenéticos en la línea germinal y que probablemente, esta comunicación es a través de un péptido que se secreta en el intestino (Nono, M, et al 2020).

2. Justificación

El sistema nervioso es uno de los sistemas que se ven mayormente afectados por glucotoxicidad, y esto lleva a defectos cognitivos en personas que viven con diabetes e incluso obesidad. Sin embargo, no se comprenden los mecanismos que llevan a las deficiencias en el sistema nervioso. En este trabajo se propone utilizar al nemátodo *C. elegans* para estudiar los efectos de la exposición a alta glucosa sobre el sistema nervioso por medio del análisis de la memoria asociativa al odorante benzaldehído. *C. elegans* ha sido descrito como un modelo exitoso para el estudio de la exposición a alta glucosa y, debido a la simplicidad de su sistema nervioso, se conoce extensivamente el funcionamiento de este. Ambas características permiten que *C. elegans* sea un modelo ideal para estudiar los mecanismos moleculares que afectan al sistema nervioso durante la exposición a alta glucosa en un animal completo.

3. Pregunta de Investigación

¿Cuáles son los efectos de la exposición a alta glucosa sobre la memoria asociativa del nemátodo *Caenorhabditis elegans*?

4. Hipótesis

La exposición a alta glucosa regula negativamente la memoria en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar los efectos de una exposición a alta glucosa sobre la memoria asociativa en *C. elegans*.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el fenotipo de *C. elegans* en respuesta a la exposición a alta glucosa.
2. Determinar la memoria asociativa en respuesta a la exposición a alta en glucosa en *C. elegans*.
3. Determinar si la exposición a alta glucosa tiene efectos transgeneracionales en la memoria asociativa.
4. Determinar el mecanismo a través del cual la glucosa modula la memoria asociativa en *C. elegans*.

6. Materiales y Métodos

6.1 Cepas de *Caenorhabditis elegans*

Todas las cepas se mantuvieron a 20 °C en medio NGM-Lite. En este trabajo se emplearon las cepas: silvestre Bristol (N2), MT1522 *ced-3(n717)*, DR1309 *daf-16(m26);daf-2(e1370)*, GR1307 *daf-16(mgDf50)*. Todas las cepas se obtuvieron del Centro de Genética del *Caenorhabditis* (CGC).

El medio NGM-Lite contiene 2 g de NaCl, 4 g de bactotripton, 3 g de KH_2PO_4 , 0.008 g de colesterol y 20 g de agar en 1L de agua. Se esterilizó el medio por autoclave durante 25 minutos a 120 °C y 15 lb. Para las cajas con alta concentración de glucosa se añadieron 40 mM de glucosa estéril al medio NGM Lite estéril. La glucosa se esterilizó por autoclave por 25 minutos a 115 °C. El medio se vierte en cajas Petri desechables estériles de 10,5 cm para el mantenimiento y para los ensayos de quimiotaxis. Al medio sólido NGM-lite en cajas Petri, se les adiciona un cultivo de *E. Coli cepa* OP50-1 crecida en medio Luria-Bertani (LB) Lennox (Sigma-Aldrich) con una densidad óptica de 0.34 a 0.40 ODs medida a 600 nm de longitud de onda en NanoDrop (Termo-Fisher) de la Unidad de Biología Molecular del IFC.

Para manipular a los nemátodos se utiliza la solución amortiguadora M9 la cual contiene 6 g de NaHPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 5 g de NaCl y 0.25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disueltos

en 1L de agua. La solución se esteriliza en autoclave con las condiciones previamente descritas.

Para sincronizar los cultivos de *C. elegans*, los hermafroditas en estadio de adulto joven se recuperaron en 1 mL de buffer M9 y posteriormente se añadió 1300µL de cloro comercial y 650µL de NaOH mM. La suspensión se puso en agitación por vórtex por 3 min, y se centrifugó a 1000 rpm durante un minuto. Se hicieron cinco lavados con buffer M9, y los embriones obtenidos se dejaron eclosionar en M9 durante la noche. Posteriormente se obtuvieron aproximadamente 500 larvas L1 sincronizadas y se transfirieron a placas de medio NGM-Lite .

6.2 Cuantificación de tamaño

Se obtuvieron embriones de *C. elegans* por medio de una sincronización de gusanos adultos con cloro y NaOH. Se dejó que los embriones eclosionaran en medio M9 y se transfirieron a placas nuevas con la condición control (medio sólido NGM-Lite con *E. coli*) y una condición con el mismo medio que el control pero adicionado con 40 mM de glucosa. Se recuperaron los nemátodos con buffer M9 en estadio de adulto joven y se prepararon para su análisis a través de microscopía. Dicha preparación consiste en un *pad* de agarosa al 2%, al cual se le adiciona una gota de 10 mM de 2 µL de NaN₃. Se tomaron fotos de las muestras bajo un aumento de 100x usando un microscopio AxioZoom v16 de la Unidad de Microscopía del IFC. Posteriormente se analizaron las muestras con el software ImageJ. Para medir la longitud de los gusanos se hizo una medición longitudinal desde la punta de la cabeza hasta el final de la cola. Para determinar el área se delineó el cuerpo de los nematodos y se realizó la medición con el software ImageJ.

6.3 Cuantificación de vida media

Se obtuvieron embriones de *C. elegans* sincronizados y se dejaron eclosionar en M9 durante 12 horas. Las larvas L1 se transfirieron a cajas NGM-lite de la condición control o la condición adicionada con 40 mM de glucosa en el medio. Posteriormente se tomaron 50 nematodos en el estadio L4 con un asa y se transfirieron uno por uno a una placa de cultivo nueva de 30 mm de la misma condición en la que eclosionaron. Los nematodos se contaron y transfirieron todos los días a cajas con medio y bacterias nuevas, tomando nota de gusanos inmóviles y muertos. Los gusanos muertos se retiraron de la caja. Los gusanos que presentaron alteraciones en la puesta de huevos (fenotipo “embolsado”) no fueron contados. El ensayo se realizó por duplicado.

5.1 Objetivo general

Se obtuvieron larvas sincronizadas en L1 y se crecieron en condiciones control o suplementadas con 40 mM de glucosa hasta el estadio L4, las cuales se transfieren a una placa de cultivo nueva con la misma condición de la de origen. Durante tres días se transfirieron diariamente cada nematodo adulto a una placa nueva con la misma condición y se contó el número de larvas L1 ovopocitadas el día anterior. El ensayo se realizó con una n=30.

6.5 Ensayos de memoria asociativa al benzaldehído

Se colocaron aproximadamente 40 nematodos adultos en una caja Petri de 60 mm de condiciones control y la condición experimental de 40 mM de glucosa. Se dejó que los nematodos ovopocitaran durante 4 horas y se removieron los nematodos adultos por medio de lavados con la solución M9 pero dejando los embriones en las cajas, ya que estos se quedan en el tapete de bacteria. Una vez removidos los adultos se colocaron en la tapa 2 μ L de benzaldehído (BA) al 1% disuelto en agua estéril para las condiciones de entrenamiento (Aguilar-Solis, datos no publicados). Para la condición control se colocó agua estéril. 24 horas después se removió el estímulo cambiando la tapa de la caja. Se esperó 48 horas hasta que los nematodos se encontrarán en el primer día de adultez para poder realizar el ensayo de quimioatracción.

Para el ensayo de quimioatracción se colectan los nematodos del mismo estadio con M9 y se colocan en una placa de quimiotaxis. Las placas de quimiotaxis consisten de una caja Petri cuadrada de 180 mm x 180 mm que contiene medio NGM-lite sólido. Esta caja se dividió en 10 filas (Fig 5). En un extremo de la placa se colocó 2 μ de NaN_3 y 2 μ l de BA 1%. En el otro extremo se colocó 2 μ l de NaN_3 y 2 μ l de OP50-1. Posteriormente se colocaron en el centro de la caja aproximadamente X número de gusanos adultos. Una vez que los nematodos han migrado, se cuantificó el número de gusanos en cada fila. Se contaron utilizando un microscopio estereoscópico. Se calculó el índice de quimioatracción usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ nematodos en BA} - \# \text{ nematodos en } E. coli}{\text{Total de nematodos}}$$

En el caso de los ensayos de transgeneracionalidad se colocaron aproximadamente 40 nematodos en una caja Petri con la condición experimental de 40 mM de glucosa. Se dejó que los nematodos ovopocitaran durante 4 horas y se removieron por medio de lavados con la solución M9, dejando a los embriones en la

caja. Los embriones se dejaron eclosionar y desarrollar hasta el primer día de adultez. Estos nemátodos constituyen la P0. Los nemátodos P0 se transfirieron a una caja Petri con la condición control permitiendo que ovipositan durante 4 horas y se removieron dejando en la caja los embriones. Los nematodos que partieron de estos embriones son la F1. Para la F1 se colocaron en la tapa 2 μL de benzaldehído al 1% disuelto en agua estéril para las condiciones de entrenamiento, y 2 μL de H_2O estéril para la condición control. Se permitió que la F1 llegará al primer día de adultez y se realizó el ensayo de quimiotaxis descrito previamente (Fig 5). Parte de los nematodos pertenecientes al grupo control de la F1, se utilizó para obtener la F2, de la misma manera en la que se obtuvo la F1. Este proceso se realizó hasta la F3.

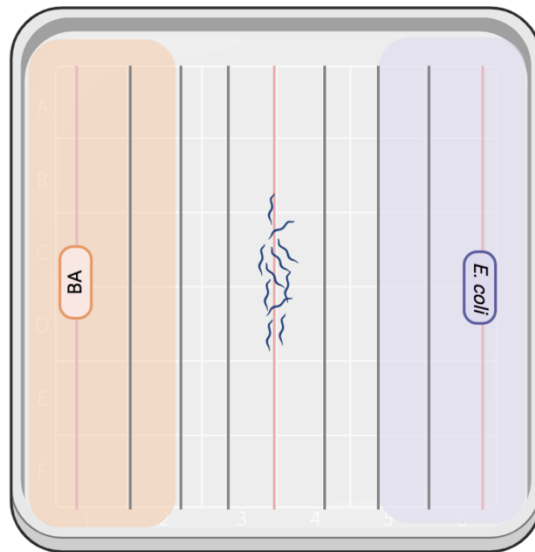


Figura 5. Ensayo de quimiotaxis a benzaldehído (BA). En la figura se muestra la placa de quimiotaxis la cual está dividida en 10 filas marcadas por 9 líneas. La línea central de la placa, marcada con color rojo, consiste en el punto de origen en el que se colocan los nematodos adultos. En las líneas exteriores marcadas igualmente en rojo se colocan 2 μL de NaN_3 de cada lado. En la línea roja del lado izquierdo se coloca el odorante, representado en naranja, el cual en este caso consiste en 2 μL de benzaldehído a la concentración señalada en el ensayo. En la línea roja del lado derecho se coloca la comida, representada en morado, la cual en este caso consiste en 2 μL de *E. coli* cepa OP50-1. En naranja y morado respectivamente se señala el área (que corresponde a tres filas) en donde se contaron los gusanos que migraron a cada condición. El número de gusanos contabilizados se utilizó para obtener el índice de quimiotaxis por medio de la fórmula anterior.

6.6 Cruzas

Se realizaron dos cruzas, para las cuales se indujeron machos de la cepa CL2166 (dvIs19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]) y de la cepa OH10690 (otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP]). La inducción de machos se realizó incubando a los nemátodos en L4 a 28°C toda la noche. Los individuos L4 maduran a adultos jóvenes hermafroditas, a los cuales se deja ovopositen y de esta manera se obtiene la F1. Una vez que la F1 llega a la adultez se observan al microscopio y se aíslan machos. En el caso de los machos para la CL2166 se colocaron 7 machos con 1 hermafrodita de la cepa OH10690, mientras que para los machos de la cepa OH10690 se colocaron con 1 hermafrodita de la cepa pCre. Posteriormente se seleccionan hermafroditas L4 y se colocan en una caja Petri. Se deja que ovopositen y se observa a la hermafrodita bajo el microscopio para cerciorarnos de que mantenga ambos marcadores fluorescentes. Se realizó este procedimiento durante cuatro generaciones. Finalmente se corroboró mediante PCR que las cruzas mantenían los genes de GFP y RFP. Los oligos se diseñaron por medio del programa de Primer-BLAST del NCBI. Para su diseño se utilizó las secuencias de RFP y GFP descritas en los siguientes artículos: Stefanski et al., 2015 y el de *Steinbaugh et al.*, 2015 . El programa de PCR que se utilizó fue de:

7. Resultados

7.1 La exposición a glucosa tiene efectos fenotípicos en *C. elegans*

El primer paso de este proyecto fue replicar el modelo de exposición a alta glucosa en *C. elegans* del trabajo de Alcantar-Fernandez *et al.* (2019). Para esto se analizó la morfología de *C. elegans* en condiciones de alta glucosa en la que huevos de nemátodos eclosionan en cajas con o sin glucosa adicionada al medio. A estos nemátodos se les permitió llegar a la etapa adulta y se tomaron fotografías para cuantificar su tamaño por medio del programa ImageJ. Nuestros resultados mostraron que la adición de 40 mM de glucosa en el medio incrementó 8% la longitud de los nemátodos comparado con el control, y 12% el área superficial comparada con el control (Fig 6). Esto demuestra que exponer a los nemátodos a alta glucosa durante el desarrollo resulta en animales más grandes lo cual reproduce observaciones previas.

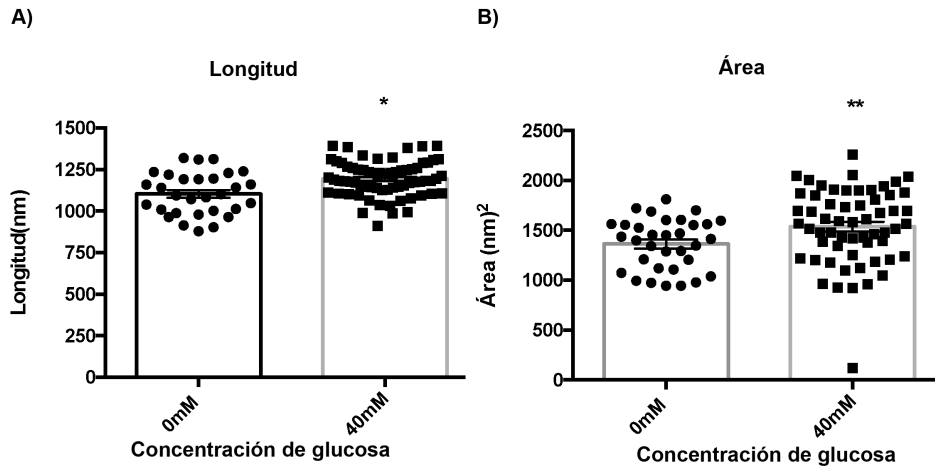


Figura 6. Incremento en Longitud y Área de nematodos expuestos a alta glucosa. Se midió el área y longitud de hermafroditas en estadio anteriormente expuestos a 40 mM de glucosa desde huevos, y de gusanos en el grupo control (0 mM de glucosa), por medio de fotos tomadas en el microscopio AxioZoom Zeiss V16 y analizadas en el programa ImageJ. En **A)** se muestra la longitud y en **B)** el área de nemátodos crecidos en NGM adicionado con 0 y 40 mM de glucosa. Se observa un aumento tanto en la longitud como en el área de los nematodos expuestos a alta glucosa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de T de student; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, N = 3

Otro fenotipo analizado fue la ovoposición de los nemátodos en presencia de alta glucosa. Para dicho análisis se cuantificó el número de larvas L1 eclosionadas puestas por cada nematodo hermafrodita durante tres días. Nuestra cuantificación del número de huevos mostró efectos en la ovoposición en los nemátodos expuestos a alta glucosa. Se encontró un aumento de 37% en la puesta de huevos cuando los nematodos crecen en NGM adicionado con 40 mM de glucosa comparado con el control (Fig 7). Este resultado demuestra que la alta glucosa tiene un efecto en la ovoposición de *C. elegans* y es congruente con lo publicado anteriormente por otros grupos (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019).

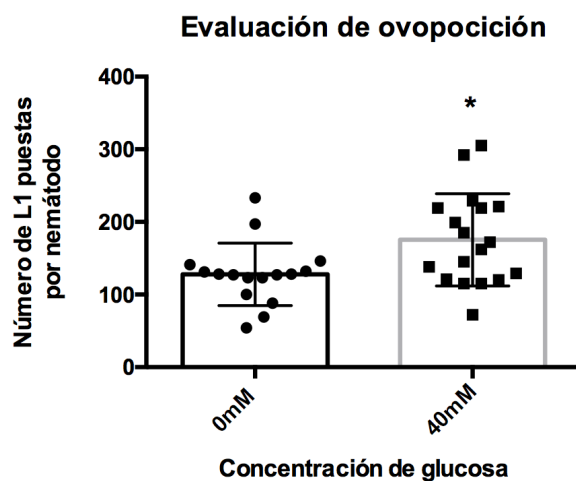


Figura 7. Evaluación de la ovoposición de nematodos expuestos a alta glucosa. Se cuantificó el número total de larvas L1 provenientes a partir de embriones ovipositados durante tres días por hermafroditas expuestas o no a alta glucosa. Los nematodos crecidos en NGM adicionado con 40 mM de glucosa ponen un mayor número de huevos comparado con el control. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de T de student; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ n= 18.

Se ha reportado que la glucosa tiene efectos negativos en la esperanza de vida en distintos animales incluido *C. elegans*, por lo que decidimos analizar la esperanza de vida en presencia de glucosa. Para esto se cuantificó por 25 días la supervivencia de animales eclosionados en alta glucosa y del control a 25 °C. Nuestros resultados demuestran que la Tm50 de gusanos crecidos en 40 mM de glucosa es de 14 días, mientras que los gusanos del grupo control es de 17 días. Así mismo el punto máximo de supervivencia fue de 20 días vs 24 días en alta glucosa, vs control, respectivamente (Fig. 8). Estos resultados muestran que hay una disminución del 16% en la esperanza de vida de *C. elegans* cuando son expuestos a 40 mM de glucosa durante toda su vida.

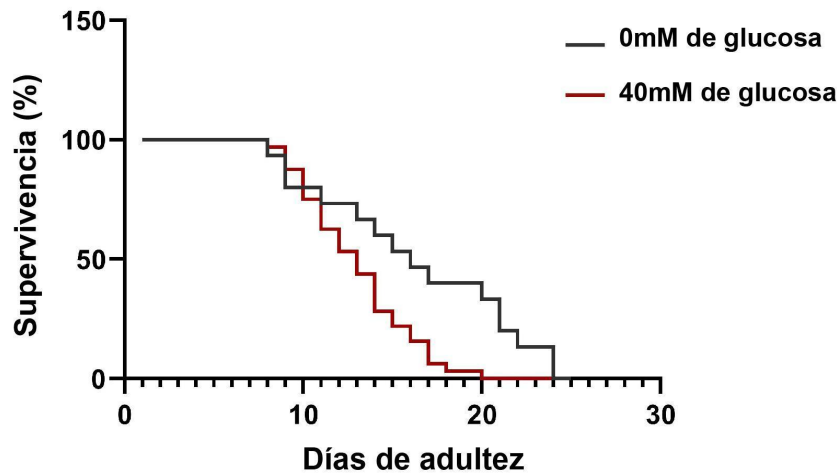


Figura 8. Supervivencia de nematodos crecidos en alta glucosa. Curvas de Kaplan-Meier de longevidad de nematodos control crecidos en 0 mM de glucosa adicionada y nematodos crecidos en 40 mM de glucosa en el medio. La Tm50 fue de 14 días en alta glucosa y de 17 días en el control lo que representa un decremento del 17% en la supervivencia de los nematodos crecidos en 40 mM de glucosa comparado con el control. Los experimentos fueron realizados a 20°C, n=100. Los datos mostrados pertenecen a un experimento representativo de 2 réplicas biológicas.

Nuestros datos demostraron que la exposición a 40 mM de glucosa causa un aumento en el tamaño de los nematodos, un aumento en la puesta de huevos y un decremento en la supervivencia. Estas observaciones son acordes con datos previamente reportados en la literatura, por lo cual consideramos que se estableció correctamente el modelo de exposición a alta glucosa en *C. elegans* en el laboratorio.

7.2 La exposición a alta glucosa afecta la quimioatracción y memoria asociativa al benzaldehído

Para determinar el efecto de la exposición a alta glucosa sobre la memoria de *C. elegans*, decidimos evaluar el modelo de memoria asociativa entre comida y el odorante benzaldehído. Para esto se realizaron ensayos de entrenamiento en la que huevos recién ovipositados son expuestos al odorante benzaldehído y comida durante 24 hrs. Posteriormente (48 hrs después) se realizan ensayos de quimiotaxis en los que

se evalúa la preferencia al benzaldehído de los nemátodos adultos que fueron entrenados vs control (naïve).

Al analizar la quimioatracción al 1% de benzaldehído (BA) de los nematodos expuestos a 40mM de glucosa y no expuestos a glucosa observamos que los nematodos naïve expuestos a glucosa tienen un mayor índice de quimioatracción al benzaldehído comparados con el control (Fig 9A). Un mayor índice de quimioatracción significa que hay una mayor atracción hacia el odorante en comparación con la comida, es decir que los nematodos naïve expuestos a glucosa tienen mayor preferencia al BA que aquellos que no fueron expuestos a glucosa. En el caso de los nematodos entrenados observamos que en los no expuestos a glucosa tienen un aumento en el índice de quimiotaxis al BA al 1% comparados con los nematodos naïve, lo cual significa que los nematodos entrenados tuvieron un proceso de aprendizaje y memoria a largo plazo. Por otra parte, los nematodos entrenados expuestos a glucosa no tuvieron un aumento en el índice de quimiotaxis comparados con los nematodos naïve expuestos a glucosa (Fig 9 A). Esto indica que la exposición a 40 mM impide la memoria asociativa a largo plazo entre el benzaldehído y la comida lo cual concuerda con la hipótesis propuesta.

Debido a que el índice de quimiotaxis de los gusanos naïve expuestos a glucosa era de 0.43, mientras que el índice de quimiotaxis de los gusanos entrenados nunca expuestos a glucosa era de 0.485, nos preguntamos si no podíamos ver memoria asociativa en los gusanos expuestos a glucosa debido a una saturación en la quimiotaxis al BA. Para poder corroborar que no se estuviera enmascarando la memoria decidimos utilizar una concentración menor de benzaldehído. Se utilizó 0.33% de benzaldehído para el entrenamiento y los ensayos de quimiotaxis, el cual se encontraba previamente reportado (Remy & Hobert, 2005). Usando 0.33% de BA observamos que los nematodos no expuestos a glucosa tienen un índice de quimiotaxis naïve (quimiotaxis basal) promedio de 0.09, el cual tiene un aumento significativo cuando son entrenados ya el índice de quimiotaxis promedio es de 0.11 (Fig 9B). Esto nos indica que los nemátodos no expuestos a glucosa no están presentando memoria asociativa al benzaldehído al 0.33%. Sin embargo, bajo esta concentración los nematodos naïve expuestos a 40 mM de glucosa también presentan un índice de quimiotaxis mayor, de 0.28%, que aquellos nematodos naïve no expuestos a glucosa. Aun cuando este cambio no es significativo sigue la misma tendencia que los experimentos realizados con 1% de BA. Por otra parte, los nematodos entrenados expuestos a 40 mM de glucosa no presentan un aumento en la quimiotaxis comparado con los nematodos naïve de la misma condición, ya que tienen un índice de quimiotaxis promedio de 0.20 (Fig 9B). Nuestros datos usando 0.33% de benzaldehído en el entrenamiento y los ensayos conductuales, nos indican que el efecto previamente

observado con 1% de benzaldehído no se debe a una saturación de la sensibilidad al odorante.

Con base a estos datos podemos concluir que la exposición a 40mM de glucosa desde la ovoposición hasta el estadio de adulto causa un aumento en la quimiotaxis naïve de los nematodos a 0.33% y 1% de benzaldehído, y tiene una tendencia a disminuir la memoria asociativa a este.

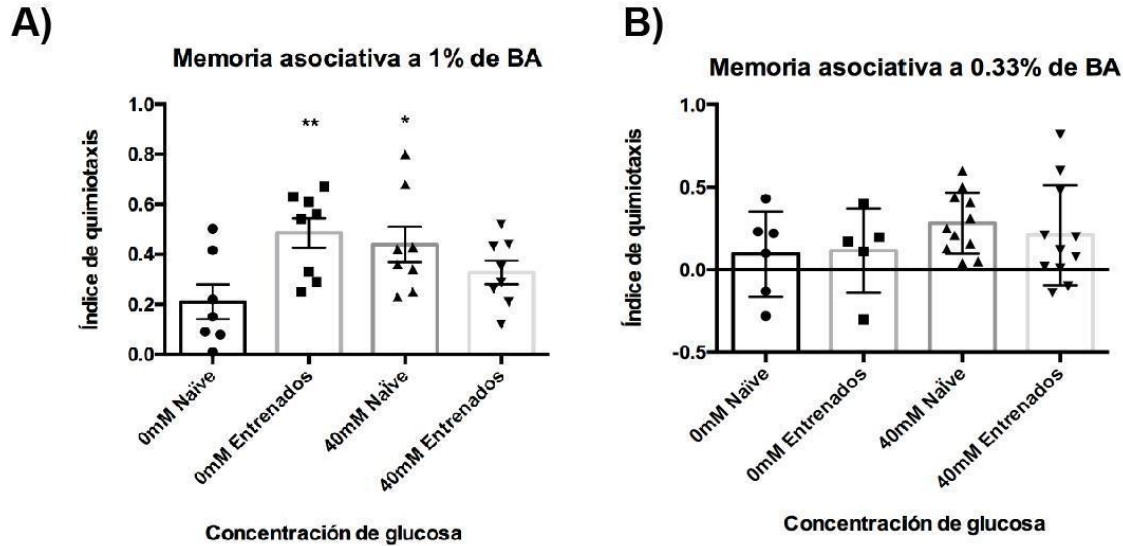


Figura 9. Efecto de la glucosa sobre la memoria asociativa de *C. elegans*. Se evaluó la memoria asociativa entre comida y el odorante benzaldehído en nematodos silvestres N2 crecidos en condiciones control o con 40 mM de glucosa añadida al medio NGM. En **A)** se ensayó una concertación de 1% de benzaldehído donde se observa que 40 mM de glucosa induce un aumento en la quimiotaxis basal al mismo tiempo que inhibe el establecimiento de una memoria asociativa. En **B)** se ensayó una concentración de 0.3 % de benzaldehído la cual no es suficiente para inducir memoria asociativa, pero aún se observa un aumento marginal en la quimiotaxis basal en presencia glucosa. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (nematodos naïve crecidos en 0mM de glucosa) se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados.

Se sabe que la glucosa ejerce un efecto osmolar importante, por lo que para descartar que el aumento en la memoria asociativa al benzaldehído en presencia de glucosa no se debía al aumento en la osmolaridad del medio por la adición de glucosa, se realizó un control con NGM añadido con 40 mM de manitol. En este experimento

observamos que en los nematodos *naïve* expuestos a 40 mM de manitol tienen un índice de quimiotaxis promedio de 0.17 a benzaldehído al 1% (Fig 10). En el caso de los nematodos entrenados con benzaldehído al 1% en presencia de 40 mM de manitol se observó un incremento en el índice de quimiotaxis, comparado con los nematodos *naïve* sin manitol. Este resultado descarta que el efecto de la glucosa sobre la memoria asociativa se debiera a un efecto de la osmolaridad.

Memoria asociativa de N2 expuestos a manitol

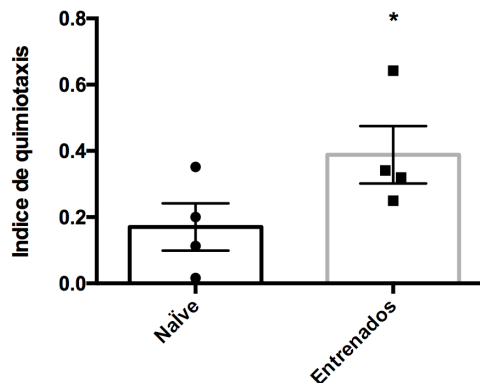


Figura 10. Memoria asociativa de nematodos expuestos a 40mM de manitol. Se analizó la memoria asociativa entre comida y el odorante benzaldehído al 1% en nematodos silvestres N2 crecidos en 40 mM de manitol. Se observó un índice de quimioatracción de 0.17 en los nematodos *naïve* y un aumento a 0.38 en los nematodos entrenados con 1% de BA. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey y los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$. Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados.

7.3 El efecto de la glucosa sobre la memoria asociativa no es transgeneracional

Se ha reportado que algunas conductas en *C. elegans* pueden ser observadas en la progenie de animales entrenados, es decir, son transgeneracionales. Por esta razón se decidió evaluar si el efecto de la exposición a 40 mM glucosa sobre la

memoria y la quimiotaxis era transgeneracional. Para esto se analizaron las tres primeras generaciones (F1, F2 y F3) tras crecer a la generación parental (P0) expuesta a 40 mM de glucosa. La P0 tiene una quimiotaxis naïve de 0.43, y observamos que en la F1 la quimiotaxis basal se mantiene en 0.46, lo cual indica que en la F1 se sigue manteniendo a la alza en la quimiotaxis naïve. Posteriormente la quimiotaxis naïve en la F2 se reduce a 0.38 y en la F3 a 0.33, lo cual nos indica que el efecto de la exposición a glucosa en la P0 se comienza a perder en la segunda y tercera generación (Fig 11).

Por otra parte, los nematodos F1 que provienen de gusanos expuestos a alta glucosa y entrenados tienen un índice de quimiotaxis de 0.38, lo cual significa que no hay un proceso de memoria asociativa ya que el índice de quimiotaxis naïve de la F1 es de 0.46. En el caso de los nematodos entrenados de la F2 se observó un índice de quimiotaxis de 0.51, por lo que comienza a haber un aumento debido al entrenamiento comparado con el índice de quimiotaxis naïve de la F2 de 0.38. Finalmente, los nematodos entrenados pertenecientes a la F3 presentaron un índice de quimiotaxis de 0.58, lo cual representa un aumento estadísticamente significativo comparado con la quimiotaxis naïve de la F3 de 0.33. Es decir que a la par de que hay una reducción en el efecto de la glucosa sobre la quimiotaxis basal, hay una recuperación en la memoria asociativa (Fig. 12).

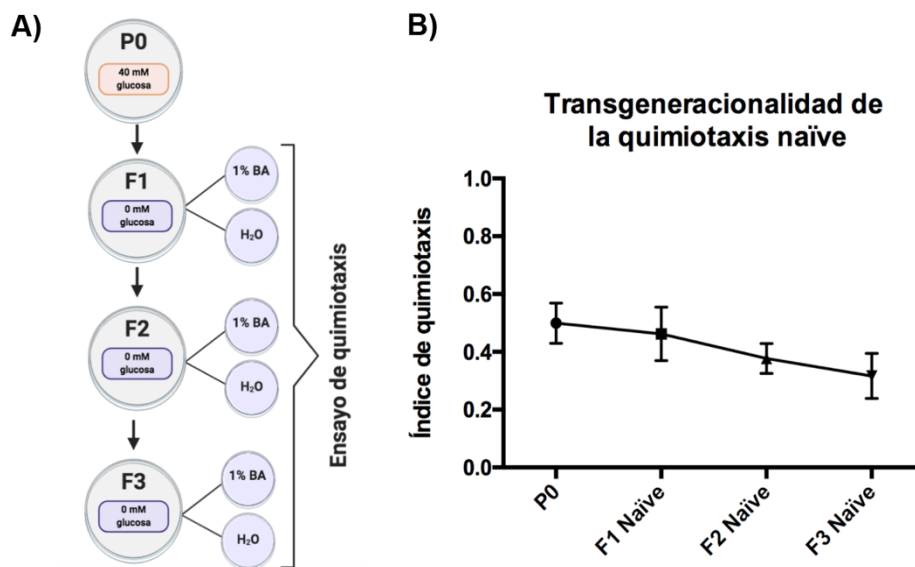


Figura 11. Efectos transgeneracionales sobre la quimiotaxis naïve de *C. elegans*. A) Se muestra el diseño experimental usado para los ensayos de transgeneracionalidad. Los nematodos parentales (P0) crecieron en 40 mM de glucosa, mientras que las posteriores

generaciones (F1-F3) se crecieron en medio NGM sin glucosa añadida. En las generaciones filiales se realizó el protocolo de entrenamiento y el ensayo de quimiotaxis como previamente descrito. B) Quimiotaxis naïve del ensayo de transgeneracionalidad. El índice de quimiotaxis basal hacia el odorante benzaldehído al 1% fue calculado cuando los nemátodos llegaron al estadio de adulto joven. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con \pm SEM. N= 9, con por lo menos 300 individuos analizados en cada experimento.

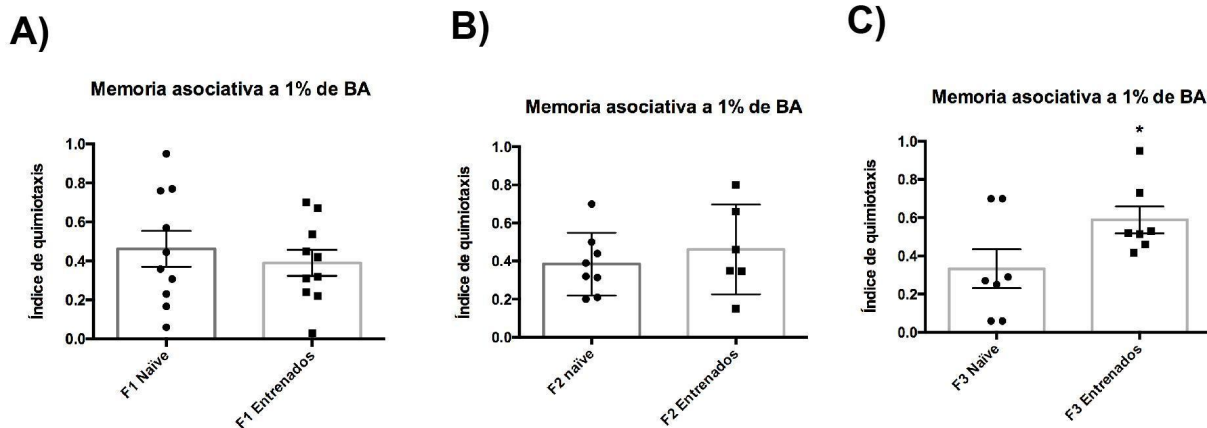


Figura 12. Ensayo de quimiotaxis de nemátodos naïve y entrenados de las generaciones F1-F3. A) Quimiotaxis de la generación F1a BA 1%. B) Quimiotaxis de la generación F2 a BA 1%. C) Quimiotaxis de la generación F3 a BA 1%. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$. Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados.

Nuestros resultados sugieren que el efecto de exponer nemátodos a alta glucosa afecta únicamente a la primera generación (F1), pero comienza a perderse en las subsecuentes generaciones (F2 y F3). Debido a esto, consideramos que el efecto de la glucosa sobre la quimiotaxis naïve y la memoria asociativa al benzaldehído no es transgeneracional; sin embargo, si se observa un efecto intrageneracional.

7.4 El efecto sobre la quimiotaxis naïve depende de DAF-2 y DAF-16

La vía de respuesta a insulina está conservada en *C. elegans* donde juega importantes funciones en la supervivencia, desarrollo y respuesta a estrés en los

nematodos. Para determinar si los efectos de la exposición a glucosa sobre la memoria asociativa dependen de la vía de la insulina se analizó a la mutante del receptor DAF-2, (cepa: *daf-16(mu28);daf-2(e1370)*). Esta cepa es una mutante nula de DAF-2, del ortólogo al receptor de insulina, y contiene una mutación funcional en el gen *daf-16* para rescatar el fenotipo dauer de las mutantes de DAF-2. En condiciones control (sin glucosa), se observó que posterior al entrenamiento, los mutantes de DAF-2 presentaron un mayor índice de quimiotaxis al benzaldehído 1% comparado con el control (Fig 13). Esto demuestra que los mutantes de DAF-2 son capaces de llevar a cabo una memoria asociativa. En el caso de los nematodos DAF-2 mutantes crecidos en 40mM de glucosa se observa que no hay un aumento en la quimiotaxis naïve comparado con los nematodos naïve DAF-2 no expuestos a glucosa, como ocurre con la cepa salvaje N2 naïve. En el caso de los nematodos entrenados crecidos en 40 mM de glucosa no hay un aumento en el índice de quimiotaxis al benzaldehído comparado con los nematodos naïve. Esto sugiere que DAF-2 está involucrado en el aumento de la quimiotaxis naïve al benzaldehído derivada de una exposición a alta glucosa; sin embargo, no está involucrado los efectos sobre la memoria asociativa.

Para completar el análisis de la vía de insulina, decidimos analizar si el factor de transcripción DAF-16 tiene un papel en el fenotipo observado sobre la memoria asociativa durante la exposición a glucosa. DAF-16 es el ortólogo del factor de transcripción FOXO que se encuentra río abajo de la cascada de señalización de insulina. Para esto, utilizamos a la cepa mutante nula *daf-16(mgDf50)* donde se observó que en el caso de los nematodos que no están expuestos a glucosa, la condición de entrenamiento tiene un mayor índice de quimiotaxis que los nematodos naïve (Fig 14). Esto significa que los nematodos *daf-16(mgDf50)* son capaces de formar una memoria asociativa al benzaldehído. En el caso de los nematodos *daf-16(mgDf50)* naïve expuestos a alta glucosa tienen un índice de quimiotaxis de 0.42, por lo que no tienen un aumento significativo comparados con los nematodos *daf-16(mgDf50)* naïve no expuestos a glucosa. Estos resultados se comportan igual a los resultados observados de la cepa mutante de DAF-2. Por otra parte, los nematodos entrenados expuestos a alta glucosa presentan una quimiotaxis promedio de 0.47, es decir que no hay un aumento significativo entre nematodos entrenados y naïve crecidos en 40 mM de glucosa. Nuestros resultados sugieren que DAF-16 no está involucrado en el efecto de la glucosa sobre la memoria asociativa ya que las mutantes de este gen no presentan aprendizaje. Por lo contrario, DAF-16, al igual que DAF-2, sí está involucrado en los efectos de la exposición a alta glucosa sobre la quimiotaxis naïve al benzaldehído.

Memoria asociativa de *daf-16(mu28);daf-2(e1370)*

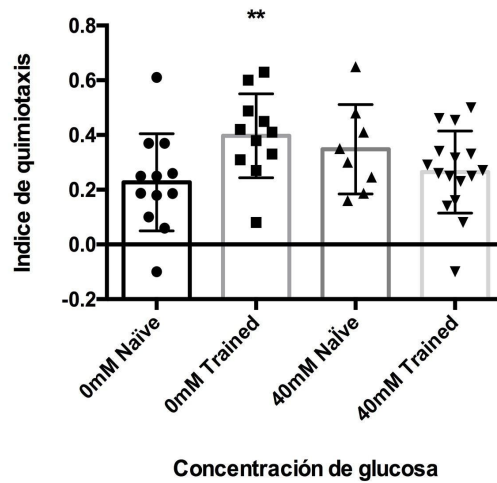


Figura 13. Memoria asociativa en ausencia de DAF-2. Se realizó el ensayo de quimiotaxis en la cepa mutante *daf-16(mu28);daf-2(e1370)* para medir memoria asociativa entre comida y benzaldehído al 1% de nematodos crecidos en NGM y en NGM adicionado con 40 mM de glucosa. En ambos casos se presenta la condición *naïve* y la condición de entrenamiento. Se observó un aumento entre los nematodos entrenados y *naïve* no expuestos a glucosa, por lo que hay un proceso de memoria asociativa. En el caso de los nematodos *naïve* expuestos a alta glucosa el índice de quimiotaxis no es significativamente diferente a los nematodos *naïve* no expuestos a glucosa. Los nematodos entrenados expuestos a alta glucosa no presentan un aumento en el índice de quimioatracción, por lo que no hay memoria asociativa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados.

Memoria asociativa de daf-16(mgDf50)

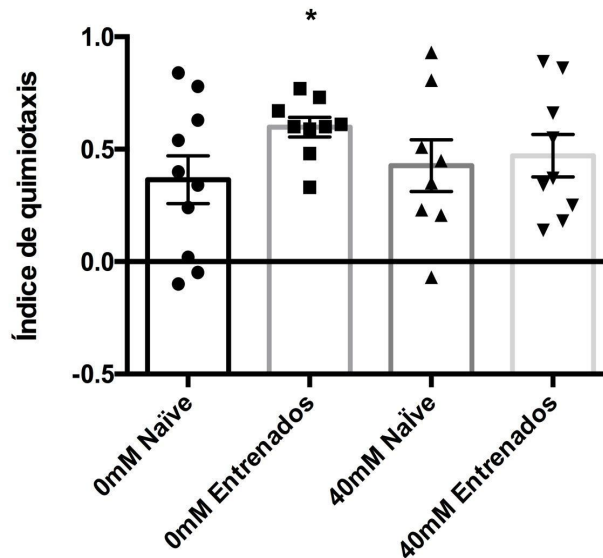


Figura 14. Memoria asociativa en ausencia de DAF-16 a benzaldehído 1% de la cepa *daf16(mgDf50)*. Se realizó el ensayo de quimiotaxis en la cepa mutante *daf-16(mgDf50)* para medir memoria asociativa entre comida y benzaldehído al 1% de nematodos expuestos a 40 mM de glucosa y control. En el caso de los nematodos no expuestos a glucosa se observó un aumento entre el índice de quimiotaxis de los nematodos entrenados y naïve, por lo que hay un proceso de memoria asociativa. Los nematodos naïve expuestos a alta glucosa el índice de quimiotaxis no es significativamente diferente a los nematodos naïve no expuestos a glucosa. Los nematodos entrenados expuestos a alta glucosa no presentan un aumento significativo en el índice de quimioatracción, es decir que no hay memoria asociativa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$. Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados

Los datos obtenidos usando las mutantes de DAF-2 y DAF-16 sugieren que la vía de la insulina está involucrada en los efectos de la glucosa sobre la quimiotaxis naïve. Sin embargo, la vía de insulina no está involucrada en la inhibición de la memoria asociativa entre benzaldehído y comida derivada de la exposición a glucosa.

7.5 CREB/crh-1 está involucrado en el aumento de la quimiotaxis naïve

En distintos modelos animales se ha caracterizado que el factor de transcripción CREB (cAMP response element-binding protein) juega un papel central en el establecimiento de la memoria a largo plazo en animales. Para determinar si el factor de transcripción CRH-1, ortólogo de CREB en *C. elegans*, tiene un papel en los efectos observados durante la exposición de los nematodos a alta glucosa sobre la quimiotaxis naïve, se utilizó una cepa que contiene una mutante nula: YT17 *crh-1(tz2)*. Anteriormente en el laboratorio se ha reportado que nemátodos *crh-1(tz2)* no son capaces de formar una memoria asociativa entre benzaldehído y comida, reproduciendo datos ya publicados. Con esto en mente se analizó únicamente la quimiotaxis naïve en condiciones control y en presencia de 40 mM de glucosa. Se observó que no existe una diferencia significativa entre el índice de quimioatracción al benzaldehído 1% de ambas condiciones (Fig 15). Nuestros datos sugieren que CREB/crh-1 está involucrado en el cambio de la quimiotaxis naïve inducida por una exposición a alta glucosa.

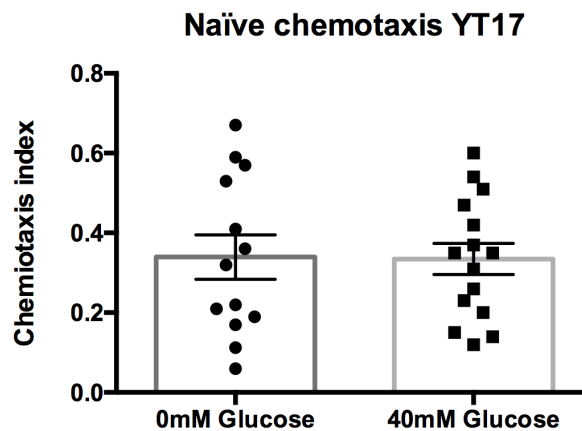


Fig 15. Quimiotaxis naïve de en ausencia de CREB. Se utilizó la cepa YT17 *crh-1(tz2)* para evaluar la quimiotaxis basal en ensayos de quimioatracción naïve de nematodos crecidos en NGM o NGM adicionado con 40 mM de glucosa. No se observaron diferencias significativas entre el índice de quimioatracción de los nematodos crecidos en condiciones control y los nematodos expuestos a glucosa. Los datos fueron analizados por medio de la prueba de T de student; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. N=15 donde cada punto representa una réplica biológica cada una con por lo menos 300 nematodos.

7.6 *ced-3* es necesario para la memoria asociativa

Debido a que los nematodos expuestos a glucosa se encuentran durante todo el desarrollo *ex-utero* en esta condición, quisimos descartar que la exposición a glucosa indujera apoptosis en el soma resultando en el fenotipo observado. Para analizar esto se utilizó una mutante de la caspasa efectora CED-3, MT1522 *ced-3(n717)*. CED-3 es la única caspasa en *C. elegans* y por lo tanto su ausencia bloquea la apoptosis en los nemátodos. Al evaluar el índice de quimiotaxis *naïve* se observó que los nematodos mutantes crecidos en condiciones control, es decir no expuestos a glucosa, presentan una quimioatracción basal al benzaldehído demostrando que la mutante es capaz de reconocer y migrar hacia el benzaldehído. Sin embargo, al realizar los ensayos de entrenamiento en condiciones control, no se observó un aumento significativo en el índice de quimiotaxis al benzaldehído al 1% comparado con los nematodos *naïve* (Fig 16). Estos resultados sugieren que la apoptosis en los nematodos es necesaria para el aprendizaje asociativo, mas no para la respuesta basal al benzaldehído. Debido a que la mutante de CED-3 no presenta aprendizaje asociativo al benzaldehído no se puede descartar la participación del proceso apoptótico bajo la exposición a glucosa utilizando esta estrategia.

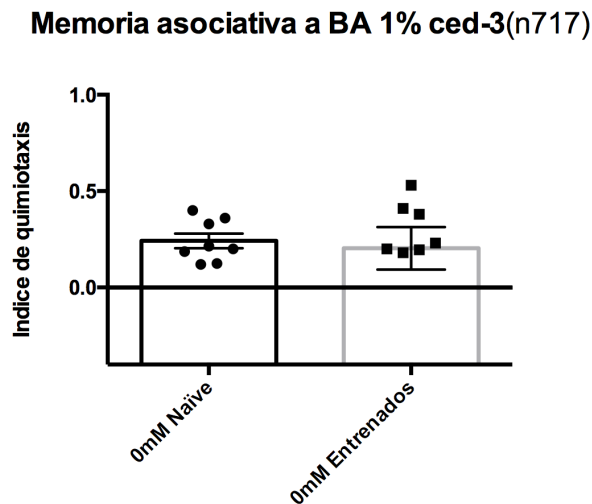


Fig 16. Memoria asociativa en ausencia de apoptosis. Ensayo de quimiotaxis para medir memoria asociativa en la mutante de CED-3 (cepa MT1522). Los nematodos crecieron en NGM sin adición de glucosa. Se presenta la condición sin entrenamiento, *naïve*, y la condición de entrenamiento. No existen diferencias significativas en el índice de quimiotaxis entre nematodos *naïve* y entrenados. Los datos se analizaron por medio de la prueba de T de

student; los resultados se representan con \pm SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ N= 9, donde cada punto representa una réplica biológica cada una con por lo menos 300 nematodos.

7.7 Generación por cruza de las cepas **CL2166::OH10690** y **pCREB::OH10690**

Se ha reportado que la exposición a alta glucosa puede inducir un aumento en el estrés oxidativo y en las especies reactivas del oxígeno (ERO) celulares en diversos organismos. Con el objetivo de analizar las ERO en las neuronas de *C. elegans* se realizó una cruce entre la cepa CL2166 (dvIs19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]) y la cepa OH10690 (otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP]). Debido a que la cepa CL2166 tiene una expresión de *gfp* dependiente de estrés oxidativo, ya que se encuentra bajo el promotor de *gst-4*, dicha cruce permitirá el análisis de las EROs en el sistema nervioso. Para dicho fin, primero se indujeron nematodos machos de la cepa CL2166 tras la exposición durante toda la noche a 28 °C de hermafroditas en la etapa L4. Tras seguir la cruce durante cuatro generaciones, se seleccionaron los nemátodos con los dos marcadores fluorescentes mediante observaciones en el microscopio de fluorescencia. De esta manera se obtuvo cruce CL2166::OH10690 la cual denominamos MZ1 (Fig 17a). Adicionalmente se comprobó por PCR la presencia de GFP y RFP en un hermafrodita (Fig 17c).

Por otra parte, debido al papel que observamos de *crh1*/CREB en la memoria asociativa inducida por glucosa (Fig. 13) consideramos importante analizar la expresión de *crh-1*/CREB en las neuronas de *C. elegans*, por lo que se realizó una cruce entre la cepa pCREB y la cepa OH10690 (otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP]). Para la cruce se indujeron nematodos machos de la cepa OH10690 a partir de parentales hermafroditas expuestos a 28 °C durante toda la noche en la etapa L4. La cruce se siguió por microscopía de fluorescencia durante cuatro generaciones. Finalmente se obtuvo la cepa MZ2 (pCREB::OH10690) (Fig 17b). La presencia de GFP y RFP en la cruce también se comprobó por PCR (Fig 17c).

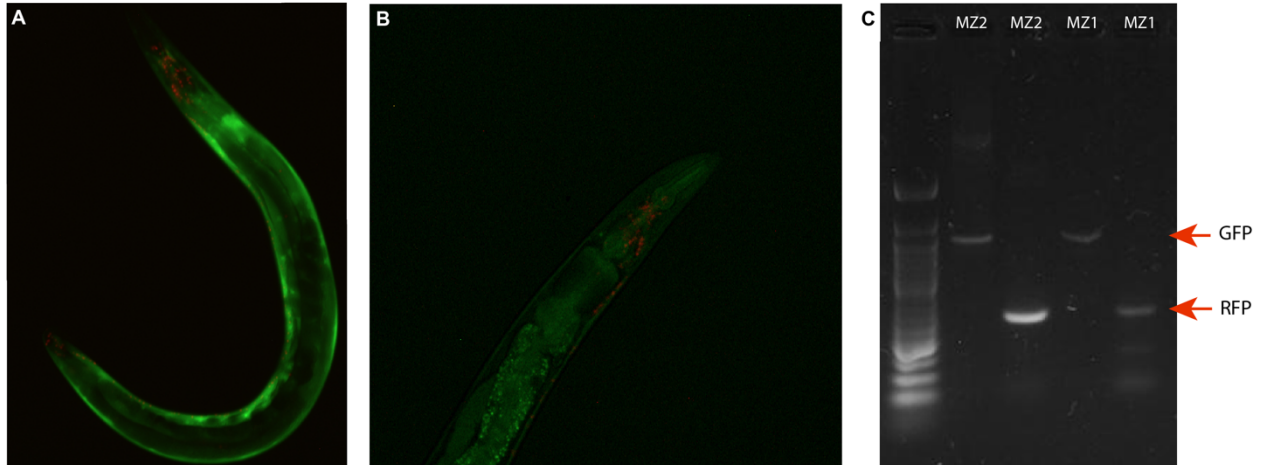


Figura 17. Cepas MZ1 y MZ2. A) Microscopía de fluorescencia de la cepa MZ1, generada a partir de la cruce de nematodos de la cepa CL2166 (dvIs19 [(pAF15)gst-4p::GFP::NLS]) y la cepa OH10690 (otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP]). B) Microscopía de fluorescencia de la cepa MZ2, generada a partir de la cruce de nematodos entre la cepa pCREB y la cepa OH10690 (otIs356 [rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP]). C) Gel de agarosa donde se muestra la presencia de GFP (657pb) y RFP (362pb) con una escalera de 50pb.

7. Discusión

La obesidad y la diabetes son dos de las mayores problemáticas de salud pública actual, las cuales conllevan a estados de hiperglucemia. Como se ha mencionado anteriormente, los estados prolongados de hiperglucemia derivan en comorbilidades ya que diversos órganos se ven afectados en esta condición (Aronson, 2008). Se sabe que el sistema nervioso es uno de los principales sistemas que se afectan por la hiperglucemia. Existen diversas neuropatologías que están relacionadas con un aumento en el azúcar sanguíneo (Tomas & Watkins, 1998). De igual manera, la memoria y el aprendizaje se ven disminuidos en dicha condición, lo cual se ha observado en humanos y en modelos murinos enfermedad (Cuckierman *et al.*, 2005; McCrimon *et al.*, 2012; Biessels *et al.*, 2006; Greenwood & Winocur, 1990; Chen *et al.*, 2017). Aunque existen diversas hipótesis de cómo la presencia elevada de azúcares afecta a los tejidos, no se conoce con detalle cómo afecta al sistema nervioso (Ye *et al.*, 2011; Janelidze *et al.*, 2017; Maë *et al.*, 2018; Umegaki, 2014; ; Rom *et al.*, 2020). Con base en ésto resulta de interés estudiar este proceso en organismos simples, como el nemátodo *C. elegans*, ya que permite analizar con mayor facilidad el impacto de la exposición a glucosa en el sistema nervioso.

8.1 Construcción del modelo

Primeramente se construyó el modelo de alta glucosa en el laboratorio usando una concentración de 40 μ M de glucosa en el medio NGM. Se observó un aumento en la longitud y en el área superficial de los nematodos expuestos a glucosa (Fig 4a y b). Estas observaciones coinciden con los reportes previos, lo cual es un buen indicativo para determinar que los nematodos están tomando la glucosa del medio (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019). Otro efecto observado fue el aumento en el número de huevos puestos por nematodo (Fig 5), lo cual también coincide con el reporte de Alcantar-Fernandez *et al.* (2019), en el cual se observa un aumento en la ovoposición debido a la exposición de 40 mM de glucosa en el medio, lo cual indica que la exposición a glucosa afecta el sistema reproductor en las hermafroditas. Se conoce que a concentraciones más altas de glucosa hay un decremento en la ovoposición, por lo que la concentración de glucosa impacta de manera diferencial a la gónada (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019). Para entender con mayor detenimiento cuáles son los procesos que se están viendo afectados en el sistema reproductor es necesario realizar más análisis. De igual manera se observó un decremento en la esperanza de vida de los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa (Fig 6). El decremento de la esperanza de vida debido a la exposición a glucosa es uno de los fenotipos que se han descrito con mayor frecuencia en el modelo de glucotoxicidad en *C. elegans* (Shlotterer *et al.*, 2009; Ray, *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009; Alcántar-Fernández *et al.*, 2019) y se atribuye a la desregulación de DAF-16/FOXO, factor de transcripción involucrado en la longevidad.

Así pues, debido a estos tres fenotipos observados, y los cuales coinciden con reportes previos de modelos de *C. elegans* en alta glucosa consideramos que, al exponer a los nematodos a 40 mM de glucosa en el medio durante toda su vida, conseguimos efectivamente un modelo de exposición a alta glucosa.

8.2 La glucosa tiene efectos en la memoria y quimiotaxis a benzaldehído

Una vez obtenido el modelo de alta glucosa en *C. elegans*, se exploró el efecto de la exposición a ésta sobre los ensayos de memoria asociativa a benzaldehído. Sorprendentemente, observamos que los nematodos crecidos en condiciones de alta glucosa tenían una mayor atracción *naïve* en comparación a los nematodos crecidos en condiciones control (Fig 7a y b). Cabe recalcar que dicho aumento no se observó en los gusanos expuestos a manitol, por lo que el incremento en la quimiotaxis *naïve* es resultado del metabolismo de la glucosa y no por el aumento en la osmolaridad (Fig 8). Un aumento en la quimiotaxis basal inducido por glucosa nunca había sido reportado, y aunque una caracterización más a fondo a nivel transcripcional de los efectos de la

glucosa en el SN del nematodo sería necesaria para caracterizar este fenómeno a fondo, creemos que quizás algunos genes de la vía de detección de benzaldehído podrían estar alterados. Por ejemplo, debido a que la detección del benzaldehído se da por el receptor ODR-10, consideramos que puede haber una sobreexpresión en este receptor, o inclusive en otros receptores relacionados con la quimioatracción a odorantes volátiles como ODR-3 y ODR-7; sin embargo, en un RNAseq de nematodo completo no se observa una sobreexpresión de estos genes (Gusarov, et al., 2017). Sin embargo, el receptor ODR-10 se expresa únicamente en las neuronas AWA, por lo que consideramos que al ser una secuenciación de nematodo completo se puede enmascarar la sobreexpresión en las neuronas, por lo que sería interesante hacer un qPCR o un RNA-seq de neuronas aisladas y no en el nematodo completo (Sengupta, 1996). Esto mismo sucede con otros genes como *odr-3* y *odr-7*, los cuales se expresan de manera exclusiva en el sistema nervioso. De igual manera, consideramos analizar otros genes como *sra-11* y *txx-3*, los cuales están implicados en la quimiotaxis al benzaldehído (Hobert & Remy, 2005).

Por otra parte, en el caso de los gusanos entrenados crecidos en 40 mM de glucosa, no se observó un aumento en el índice de quimiotaxis al benzaldehído comparado con los nematodos crecidos en alta glucosa *naïve* lo cual sería indicativo de que hay un impedimento en la memoria asociativa al odorante (Fig 7a). Consideramos que esto es un resultado relevante que nos habla de los efectos dañinos que tiene la exposición a alta glucosa en el SN. Para descartar que fuera una saturación del sistema la razón de que no pudiéramos observar memoria asociativa en los nematodos crecidos en alta glucosa, decidimos ensayar una menor concentración de benzaldehído durante el entrenamiento y el ensayo de quimiotaxis. En estas condiciones, aun cuando no pudimos observar memoria asociativa en las condiciones controles al utilizar 0.33% de benzaldehído, el índice de quimiotaxis *naïve* de los nematodos crecidos en 40 mM se redujo un 65% (Fig 7b). Con estas condiciones no pudimos observar un aumento en el índice de quimiotaxis al benzaldehído de los nematodos entrenados, por lo cual consideramos que la exposición a 40 mM de glucosa impide la formación de memoria asociativa al benzaldehído en los nematodos. Sería de gran interés analizar el efecto de la glucosa en diferentes paradigmas de memoria y con diferentes odorantes para determinar si es exclusivo de la memoria asociativa o del benzaldehído o un fenómeno más general. Por otra parte, el paradigma de memoria usado en este trabajo no puede diferenciar entre aprendizaje y memoria, por lo que no podemos descartar que el problema se dé durante el aprendizaje. Existen paradigmas de memoria tales como el análisis de quimiotaxis a butanona el cual permite distinguir entre ambos procesos por lo cual sería una buena aproximación (Kauffman *et al*, 2011). De igual manera, en este trabajo, la exposición a glucosa ocurrió desde que los nemátodos eclosionan en la caja y hasta que llegaron a adultos, por lo tanto, sería interesante hacer la exposición a glucosa limitada a las distintas fases del entrenamiento dentro del mismo paradigma de

memoria asociativa al benzaldehído. Esto sería un primer acercamiento para saber si hay un impedimento durante el *imprinting* e inclusive, si se está afectando el desarrollo del nematodo.

8.3 El efecto de la glucosa es intrageneracional más no transgeneracional

En *C. elegans* se ha reportado que algunas conductas pueden ser transgeneracionales y de hecho, el paradigma asociativo del benzaldehído se encuentra dentro de estas conductas transgeneracionales (Remy et al). Ante este hecho, decidimos analizar si los efectos de la glucosa sobre la quimiotaxis al benzaldehído y la memoria asociativa a este eran transgeneracionales. Observamos que la quimiotaxis *naïve* de la F1 tiene un aumento similar al observado en la P0, indicando que el efecto perdura en la primera generación. Posteriormente la quimiotaxis de la F2 y la F3 tiene una tendencia a decrementar (Fig 9). Aun cuando el decremento del índice de quimiotaxis de la F3 no fue significativo comparado con la P0, consideramos que el efecto sobre la quimiotaxis *naïve* no es transgeneracional pero si tiene efectos intrageneracionales, ya que se pierde en la tercera generación. Estos datos indican que el aumento en la quimiotaxis se puede estar dando en estas subsecuentes generaciones por la exposición a glucosa como embriones (F1) y en las células que darán paso a la F2 y F3 en la línea germinal. Por otra parte, se observó que el índice de quimiotaxis al benzaldehído de los nematodos entrenados pertenecientes a las primeras tres generaciones tuvo una tendencia a recuperarse (Fig 10a, b, y c). En la tercera generación (F3 no expuesta a glucosa) se observó memoria asociativa al benzaldehído en los gusanos entrenados comparados con los nematodos *naïve* (Fig 10c). Debido a esto consideramos que, al igual que con los efectos sobre la quimiotaxis *naïve*, los efectos de la exposición a 40 mM de glucosa no tienen efectos transgeneracionales. Se han descrito otros fenotipos dados por la exposición a alta glucosa en *C. elegans* que, como nuestros datos, son intrageneracionales y no transgeneracionales. Un ejemplo es la resistencia a estrés y neuroprotección tras la exposición a 2% de glucosa en la P0, la cual se pierde a partir de la F3 (Tauffenberger et al., 2014). Como mencionado anteriormente, existen diversos reportes de efectos transgeneracionales en *C. elegans* derivados de ayuno, lo cual indicaría que el estado metabólico podría tener un impacto transgeneracional (Rechavi et al., 2014; Jobson et al., 2015). De igual manera, en *Drosophila melanogaster* se conoce que la exposición de machos a dietas altas en azúcar causa una disminución en el peso en las subsiguientes generaciones (Dew-Budd et al., 2016). En mamíferos también existen diversos reportes sobre el estado nutricional aunado a efectos transgeneracionales. Entre ellos resalta el trabajo de Kaati et al. (2002) en el cual se encontró una relación entre padres y abuelos que pasaron hambrunas o períodos con grandes cantidades de alimento, y la predisposición a enfermedades cardiovasculares y Diabetes Mellitus en las subsiguientes generaciones. Debido a esto no descartamos que la exposición a

glucosa en *C. elegans* pueda tener efectos transgeneracionales sobre otro fenotipo no evaluado en este trabajo

8.4 La vía de la insulina

La vía de la insulina en *C. elegans*, como en otros organismos, se regula parcialmente por el metabolismo de la glucosa. Se ha caracterizado que la vía de insulina está involucrada en la reducción de la longevidad durante la exposición de los nematodos a alta glucosa (Lee *et al.*, 2019). Debido a esto analizamos los efectos de la vía de la insulina por medio de una mutante del gen *daf-2* y otra del gen *daf-16*. Se observó que en la mutante de *daf-2* DR1309 *daf-16(m26);daf-2(e1370)*, los nemátodos control presentan memoria asociativa (Fig 11). En el caso de los nematodos crecidos en 40 mM de glucosa, los nematodos en condición *naïve* no presentan un incremento en la quimiotaxis como observado en la cepa silvestre N2. Por otra parte, los nematodos entrenados no presentan memoria asociativa (Fig 11). Esto indica que el incremento de la quimiotaxis *naïve* inducida por la exposición a 40 mM de glucosa depende de la vía de la insulina. Se conoce que algunas conductas de quimiotaxis están reguladas por la vía de la insulina, tales como la quimiotaxis a NaCl₂ (Tomioka *et al.*, 2006; Nagashima *et al.*, 2019). Tomando esto en cuenta consideramos lógico que esta vía esté involucrada en la desregulación de la quimiotaxis *naïve* al benzaldehído en presencia de alta glucosa.

Para determinar si los efectos de la vía de la insulina sobre la quimiotaxis *naïve* al benzaldehído en presencia de glucosa dependen del factor de transcripción DAF-16 (ortólogo de FOXO) se utilizó la mutante GR1307 *daf-16(mgDf50)*. Se observó que, al igual que en la mutante de *daf-2*, la mutante de *daf-16* no mostró un incremento en la quimiotaxis *naïve* de los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa comparados con los nematodos crecidos en condiciones control (Fig 12). De igual manera, los nemátodos entrenados crecidos en glucosa no presentaron aprendizaje asociativo entre benzaldehído al 1% y comida. Es decir que, el aumento en la quimiotaxis *naïve* durante la exposición a glucosa está regulado por la vía de insulina de DAF-16. Se sabe que la exposición a glucosa disminuye significativamente la expresión de *daf-16* y que, mutantes de DAF-16 en presencia de glucosa reducen la esperanza de vida (Alcantar- Fernandez *et al.*, 2019). La vía de la insulina tiene un papel importante durante la exposición a glucosa en *C. elegans*, por lo que sería de interés analizar si los efectos observados sobre la quimiotaxis *naïve* dependen de la función de esta vía en el sistema nervioso o en el intestino. De igual manera es necesario hacer estos ensayos mediante RNA de interferencia para corroborar que se observa el mismo fenotipo. Sin embargo, aun cuando observamos que el efecto sobre la quimiotaxis *naïve* es dependiente de DAF-16, no descartamos que otros efectores de la vía de la insulina

como SKN-1, ortólogo de Nrf, TOR, y HSF-1 puedan estar involucrados en los efectos dados por la exposición a alta glucosa.

8.5 CREB

Uno de los primeros factores de transcripción caracterizados en memoria a largo plazo es CREB, que es esencial para su establecimiento (Bartsch, 1998). Por lo que posteriormente decidimos analizar el papel del factor de transcripción CRH-1, ortólogo de CREB, sobre el incremento en la quimiotaxis *naïve* inducida por la exposición a 40 mM de glucosa. Nuestros resultados demostraron que la mutante nula de *crh-1* Y17 crh(tz2) no muestra un aumento en la quimiotaxis *naïve* al exponerla a 40 mM de glucosa durante su crecimiento (Fig 13). Esto indica que *crh-1* está involucrado en el aumento de la quimiotaxis *naïve* inducida por glucosa. Se sabe que la exposición a glucosa causa un aumento en la expresión de *crh-1* en nematodo completo (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019). Por otra parte, al usar RNA de interferencia de *crh-1* se observa un aumento de la esperanza de vida independientemente de si los nematodos son crecidos en glucosa o no (*idem*). Debido a que el dsRNA no puede ser internalizado por las neuronas de *C. elegans*, estos datos nos llevan a pensar que el efecto de CRH-1 en presencia de glucosa puede deberse a la expresión intestinal de este; sin embargo, es de interés analizar si el efecto observado sobre la quimiotaxis *naïve* es dependiente del sistema nervioso o de la expresión intestinal. De igual manera sería de importancia analizar si en neuronas también existe una sobreexpresión de *crh-1* en presencia de glucosa, o si el efecto observado en el reporte de Alcantar-Fernandez *et al.* (2019) representa únicamente la expresión de otros tejidos, principalmente el intestino. Recientemente se describió que la expresión de la isoforma de *crh-1* CRH-1e en las neuronas RIM y AVE es suficiente para la formación de la memoria a largo plazo (Dahiya *et al.*, 2019). Por lo tanto, sería interesante analizar la expresión de la isoforma 1e de CRH-1 en las neuronas en presencia de glucosa, ya que permitiría analizar si existe un cambio en esta isoforma la cual explique la falta memoria asociativa en los nematodos entrenados expuestos a alta glucosa (Fig. 7a, y b). La crua realizada en este trabajo pcreb::OH10690 (MZ1) puede servir para observar la expresión neuronal de *crh-1* en presencia de glucosa en neuronas específicas por localización, o por porcentaje con citometría (Fig 16a y b).

8.6 Efectos de la apoptosis para la quimiotaxis

En *C. elegans* la apoptosis ocurre exclusivamente durante el desarrollo y es mediada por una única caspasa. Debido a que los nematodos expuestos a glucosa están en esta condición desde la oviposición y durante todo el desarrollo quisimos analizar si estaba ocurriendo algún proceso apoptótico en presencia de glucosa que afectara la memoria asociativa al benzaldehído. Para esto, se utilizó la cepa mutante de

la caspasa CED-3 MT1522 *ced-3(n717)* donde se analizó la memoria asociativa. Se encontró que los nemátodos mutantes crecidos en las condiciones control no tienen memoria asociativa al benzaldehído; sin embargo, tienen una respuesta *naïve* normal hacia el benzaldehído (Fig 14) sugiriendo que la falta de apoptosis durante el desarrollo afecta de manera desigual al sistema nervioso. Durante el desarrollo del sistema nervioso de *C. elegans* la neurona NSM se divide asimétricamente para dar lugar a una célula pequeña llamada la “célula hermana NSM (que posteriormente muere por apoptosis), y una células de mayor tamaño: la neurona NSM (Sulston et al., 1987). La neurona NSM se encuentra localizada en la faringe del nematodo y se ha descrito que señala la presencia de comida al resto del cuerpo (Albertson & Thompson, 1976; Avery & Thomas, 1997). Debido a que la cepa mutante de *ced-3* no tiene apoptosis, es de esperarse que no existe la apoptosis de la célula hermana NSM. Consideramos que la consecuencia de la presencia de la neurona hermana podría resultar en que la neurona NSM no es funcional en la cepa MT1522. Esto podría resultar que los nemátodos mutantes de CED-3 no puedan percibir el estímulo de comida impidiendo que se pueda formar una memoria asociativa entre el benzaldehído y la comida dado que se ha observado que la neurona NSM es necesaria para la atracción de comida (Zhang *et al.*, 2005). Por otro lado, recientemente se observó que la síntesis de serotonina producida por la neurona NSM es necesaria para la recuperación de una memoria aversiva (Eliezer *et al.*, 2019). Para demostrar que la falta de memoria asociativa al benzaldehído es derivado de que la neurona NSM no es funcional en la cepa MT1522, proponemos realizar los ensayos en presencia de serotonina para recuperar el fenotipo silvestre. Otro acercamiento podría ser realizar los ensayos de memoria asociativa en la cepa silvestre haciendo una ablación láser en la neurona NSM. Debido a que no pudimos observar memoria asociativa al benzaldehído en las condiciones control, no pudimos analizar si la exposición a glucosa causa apoptosis. Consideramos que una aproximación alternativa sería analizar por inmunotinción a marcadores de muerte celular en la cepa OH10690 para observar si hay muerte en neuronas. Sería también de interés observar marcadores de necrosis. Sin embargo, consideramos que debido a que la concentración de glucosa en el medio no es tan alta no es probable que esté habiendo muerte celular.

9. Conclusiones

1. Se estableció exitosamente el modelo de exposición a alta glucosa en *C. elegans* observándose cambios fenotípicos como aumento de tamaño, incremento en ovoposición y decremento en longevidad.
2. Se observó que la exposición a glucosa incrementa la quimiotaxis al benzaldehído de los nemátodos *naïve*, pero que al mismo tiempo inhibe la memoria asociativa a este odorante.

3. Se determinó que el incremento en la quimiotaxis naïve al benzaldehído es dependiente de DAF-2 y DAF-16, y también del factor de transcripción CRH-1.
4. Se determinó que la apoptosis en el sistema nervioso es necesaria para la memoria asociativa al benzaldehído.
5. Se generaron dos cruzas: MZ1 una para detectar la actividad de CREB en las neuronas, y MZ2 otra para detectar ROS en el sistema nervioso de *C. elegans*. Estas se utilizarán posteriormente para caracterizar los efectos de la glucosa en el SN de nemátodos.

10. Perspectivas

Para poder entender por completo el proceso detrás de los efectos de la glucosa sobre la memoria asociativa y la quimiotaxis al benzaldehído consideramos que sería de importancia estudiar el papel que juega distintos factores de transcripción cuyas mutantes tienen una mayor esperanza de vida al exponerlas a glucosa. En particular HIF-1 y SKN-1 son dos factores de transcripción de interés para el proyecto.

Por otro lado, sería de importancia analizar los efectos transcripcionales que se dan por la exposición a glucosa en un contexto tejido-específico, por ejemplo, en las neuronas AWB y AWC, al igual que las interneuronas del circuito. Esto se podría hacer aislando estas neuronas mediante citometría de flujo y realizando un perfil transcripcional por RNA-seq. Esto permitirá identificar los genes que están actuando en el proceso de quimiotaxis y analizar si existe alguna desregulación causada por la exposición a glucosa. De igual manera analizar de manera más global el sistema nervioso permitirá analizar otros genes que se estén viendo afectados en este tejido.

A si mismo consideramos de interés analizar los efectos de la exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa durante varias generaciones, ya que podría tener efectos transgeneracionales. Se ha observado que la exposición a un estímulo por diversas generaciones puede conllevar a la transgeneracionalidad del fenotipo.

Finalmente, también consideramos que es importante estudiar el papel de las especies reactivas de oxígeno en el fenotipo observado, ya que se conoce que son de los principales actores en modelos de alta glucosa y glucotoxicidad. Debido a esto en este trabajo se inició con la craza CL2166::OH10690.

REFERENCIAS

- A Adeshara, K., G Diwan, A., & S Tupe, R. (2016). Diabetes and complications: cellular signaling pathways, current understanding and targeted therapies. *Current drug targets*, 17(11), 1309-1328.
- Ahmed N. (2005). Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, 67(1), 3–21.
- Alberini, C. M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol. Rev.* 89, 121–145. doi: 10.1152/physrev.00017.2008
- An JH, Vranas K, Lucke M et al (2005) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16275-16280
- Angelo, G., & Van Gilst, M. R. (2009). Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science*, 326(5955), 954-958.
- Aronson, D. (2008). Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. In *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets* (Vol. 45, pp. 1-16). Karger Publishers.
- Avery, L., Thomas, J. H. In: Albertson, D. G., & Thompson, J. N. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 275(938), 299-325
- Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Kahn CR Diabetes*. 1994 Aug; 43(8):1066-84.; *Antagonist: diabetes and insulin resistance--philosophy, science, and the multiplier hypothesis*.
- Bargmann CI, Thomas JH, Horvitz HR (1990) Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 529–538
- Bartsch, D., Casadio, A., Karl, K., Serodio, P. & Kandel, E. CREB1 encodes a nuclear activator, a repressor, and a cytoplasmic modulator that form a regulatory unit critical for long-term facilitation. *Cell* 95, 211–223 (1998). Demonstrates the role of CREB in synaptic plasticity.
- Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., & Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 5(1), 64-74.
- Blatnik, M., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (2008). Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 272–275. <https://doi.org/10.1196/annals.1433.047>
- Bourtchuladze, R. et al. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79, 59–68 (1994).
- Burkhart, K.B., Guang, S., Buckley, B.A., Wong, L., Bochner, A.F., and Kennedy, S. (2011). A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs to chromatin regulation. *PLoS Genet.* 7, e1002249.

- Burton, N. O., Burkhart, K. B., & Kennedy, S. (2011). Nuclear RNAi maintains heritable gene silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19683–19688. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113310108>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004 Nov 19;53(45):1066-8. PMID: 15549021.
- Check, E. (2002). Worm cast in starring role for Nobel prize.
- Chen, Z., Hendricks, M., Cornils, A., Maier, W., Alcedo, J., & Zhang, Y. (2013). Two insulin-like peptides antagonistically regulate aversive olfactory learning in *C. elegans*. *Neuron*, 77(3), 572-585.
- Chitwood, B.G. and Chitwood, M.B. 1950. The nervous system. In *An introduction to nematology*, pp. 160–174. University Park Press, Baltimore.
- Choi SS. High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutr Res Pract*. 2011;5(3):214–218. doi:10.4162/nrp.2011.5.3.214
- Colbert H.A., Bargmann C.I. Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learn Mem*. 1997;4:179–91.
- Cook, S.J., Jarrell, T.A., Brittin, C.A. *et al*. Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature* 571, 63–71 (2019).
- Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A., Harcourt, B. E., Sourris, K. C., Tan, A. L., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P. P., Brownlee, M., Bierhaus, A., Cooper, M. E., & Forbes, J. M. (2009). RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(4), 742–752. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050514>
- 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*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(40), 7934–7946
- den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ et al (2003) Type 2 diabetes and atrophy of the medial temporal lobe structures. *Diabetologia* 46:1604–1610
- Devanapally, S., Ravikumar, S., & Jose, A. M. (2015). Double-stranded RNA made in *C. elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(7), 2133-2138.
- Dew-Budd, K., Jarnigan, J., & Reed, L. K. (2016). Genetic and Sex-Specific Transgenerational Effects of a High Fat Diet in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, 11(8), e0160857.
- Eliezer, Y., Deshe, N., Hoch, L., Iwanir, S., Pritz, C. O., & Zaslaver, A. (2019). A memory circuit for coping with impending adversity. *Current Biology*, 29(10), 1573-1583.
- Feng, Y., Williams, B. G., Koumanov, F., Wolstenholme, A. J., & Holman, G. D. (2013). FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. *The Biochemical journal*, 456(2), 219–229. <https://doi.org/10.1042/BJ20131101>

- Feng, Y., Williams, B. G., Koumanov, F., Wolstenholme, A. J., & Holman, G. D. (2013). FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. *The Biochemical journal*, 456(2), 219–229. <https://doi.org/10.1042/BJ20131101>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Garigan D, Hsu AL, Fraser AG, Kamath RS, Ahringer J and Kenyon C (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* 161, 1101-1112
- Ghafari, S., Asadi, E., Shabani, R., & Golalipour, M. J. (2016). Hippocampal neuronal apoptosis in rat offspring due to gestational diabetes Apoptosis neuronal del hipocampo en crÃas de ratas debido a la diabetes gestacional. *International Journal of Morphology*, 34(1), 205-211.
- Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108.
- Gold, S. M., Dziobek, I., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruehl, H., ... & Convit, A. (2007). Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(4), 711-719.
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-638.
- Gonzalez, G. A. & Montminy, M. R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675–680 (1989).
- Guang, S., Bochner, A.F., Pavelec, D.M., Burkhart, K.B., Harding, S., Lacho-wiec, J., and Kennedy, S. (2008). An Argonaute transports siRNAs from the cytoplasm to the nucleus. *Science* 321, 537–541.
- Gusarov, I., Pani, B., Gautier, L., Smolentseva, O., Eremina, S., Shamovsky, I., ... & Nudler, E. (2017). Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nature communications*, 8(1), 1-12.
- Hall, D. H., & Russell, R. L. (1991). The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(1), 1–22. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-01-00001.1991
- Hayden, M. R., & Tyagi, S. C. (2002). Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Jop*, 3(4), 86-108.
- Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>

- Hilliard, M. A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R. H., & Bazzicalupo, P. (2004). Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, *23*(5), 1101-1111.
- Hobert, O., 2013 The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans* (August 13, 2013), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.161.1, <http://www.wormbook.org>. Abstract Article
- Izenberg, A., Perkins, B. A., & Bril, V. (2015, August). Diabetic neuropathies. In *Seminars in neurology* (Vol. 35, No. 04, pp. 424-430). Thieme Medical Publishers.
- Janelidze, S., Hertze, J., Nägga, K., Nilsson, K., Nilsson, C., Swedish BioFINDER Study Group, Wennström, M., van Westen, D., Blennow, K., Zetterberg, H., & Hansson, O. (2017). Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiology of aging*, *51*, 104–112.
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, *293*(5532), 1074-1080.
- Kaati, G., Bygren, L. O., & Edvinsson, S. (2002). Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European journal of human genetics*, *10*(11), 682-688.
- Kaletsy, R., Moore, R. S., Parsons, L. R., & Murphy, C. T. (2019). Cross-kingdom recognition of bacterial small RNAs induces transgenerational pathogenic avoidance. *bioRxiv*, 697888.
- Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(5):387-99.
- Katz, M., & Shaham, S. (2019). Learning and Memory: Mind over Matter in *C. elegans*. *Current Biology*, *29*(10), R365-R367.
- Kauffman, A., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsy, R., & Murphy, C. (2011). *C. elegans* positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2490.
- Kauffman, A., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsy, R., & Murphy, C. (2011). *C. elegans* positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2490.
- Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., & Kimura, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*, *273*(2), 431-436.
- Kim, J., Kwon, J. T., Kim, H. S., & Han, J. H. (2013). CREB and neuronal selection for memory trace. *Frontiers in neural circuits*, *7*, 44. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00044>
- Kimura, K. D., Fujita, K., & Katsura, I. (2010). Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *30*(48), 16365–16375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6023-09.2010>

- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun, 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277 942–946.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun, 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277 942–946.
- Krzyzanowski, M. C., Woldemariam, S., Wood, J. F., Chaubey, A. H., Brueggemann, C., Bowitch, A., ... & Ferkey, D. M. (2016). Aversive behavior in the nematode *C. elegans* is modulated by cGMP and a neuronal gap junction network. *PLoS genetics*, 12(7), e1006153.
- Lacal, I., & Ventura, R. (2018). Epigenetic inheritance: Concepts, mechanisms and perspectives. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 292.
- Lang, B. T., Yan, Y., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2009). Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain research*, 1258, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.026>
- Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*, 10(5), 379-391.
- Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*, 10(5), 379-391.
- Li, W., Kennedy, S. G., & Ruvkun, G. (2003). *daf-28* encodes a *C. elegans* insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway. *Genes & development*, 17(7), 844-858.
- Li, W., Prakash, R., Kelly-Cobbs, A. I., Ogbi, S., Kozak, A., El-Remessy, A. B., ... & Ergul, A. (2010). Adaptive cerebral neovascularization in a model of type 2 diabetes: relevance to focal cerebral ischemia. *Diabetes*, 59(1), 228-235.
- Lipinski B (2002). Evidence in support of a concept of reductive stress. *The British journal of nutrition*, 87: 93-94; discussion 94
- Lu, Q. Y., Chen, W., Lu, L., Zheng, Z., & Xu, X. (2014). Involvement of RhoA/ROCK1 signaling pathway in hyperglycemia-induced microvascular endothelial dysfunction in diabetic retinopathy. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(10), 7268–7277.
- Luo, X., Wu, J., Jing, S., & Yan, L. J. (2016). Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging and disease*, 7(1), 90.
- Mäe, M. A., Li, T., Bertuzzi, G., Raschperger, E., Vanlandewijck, M., He, L., ... & Keller, A. (2018). Prolonged systemic hyperglycemia does not cause pericyte loss and permeability at the mouse blood-brain barrier. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- Maresch, C. C., Stute, D. C., Alves, M. G., Oliveira, P. F., de Kretser, D. M., & Linn, T. (2018). Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review. *Human Reproduction Update*, 24(1), 86-105.

- Maresch, C. C., Stute, D. C., Fleming, T., Lin, J., Hammes, H. P., & Linn, T. (2019). Hyperglycemia induces spermatogenic disruption via major pathways of diabetes pathogenesis. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- McCrimmon, R. J., Ryan, C. M., & Frier, B. M. (2012). Diabetes and cognitive dysfunction. *The Lancet*, 379(9833), 2291-2299.
- Morris JZ, Tissenbaum HA and Ruvkun G (1996) A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 536-539
- Mouri MI, Badireddy M. Hyperglycemia. [Updated 2020 Feb 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/>
- Nagashima, T., Iino, Y., & Tomioka, M. (2019). DAF-16/FOXO promotes taste avoidance learning independently of axonal insulin-like signaling. *PLoS genetics*, 15(7), e1008297. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008297>
- Nishida, Y., Sugi, T., Nonomura, M., & Mori, I. (2011). Identification of the AFD neuron as the site of action of the CREB protein in *Caenorhabditis elegans* thermotaxis. *EMBO reports*, 12(8), 855-862.
- Norma Frizzell, Sonia A. Thomas, James A. Carson, John W. Baynes. (2012) Mitochondrial stress causes increased succination of proteins in adipocytes in response to glucotoxicity. *Biochem J* 445 (2): 247–254.
- Ogg S and Ruvkun G (1998) The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* 2, 887-893
- Olde, B., and McCombie, W.R. (1997). Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Neurosci.* 8, 53–62.
- Oliveira RP, Porter Abate J, Dilks K et al (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 8, 524- 541
- Owen, M. R., Doran, E., & Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*, 348 Pt 3(Pt 3), 607–614.
- Paradis S and Ruvkun G (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12, 2488-2498
- Park, D., Hahm, J. H., Park, S., Ha, G., Chang, G. E., Jeong, H., ... & Paik, Y. K. (2017). A conserved neuronal DAF-16/FoxO plays an important role in conveying pheromone signals to elicit repulsion behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Pierce-Shimomura JT, Faumont S, Gaston MR, Pearson BJ, Lockery SR. 2001. The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature* 410: 694–698.
- Pierce, S. B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devadhar, S., Homburger, S. A., Buchman, A. R., Ferguson, K. C., Heller, J., Platt, D. M., Pasquinelli, A. A., Liu, L. X., Doberstein, S. K., & 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. *Genes & development*, 15(6), 672–686.
<https://doi.org/10.1101/gad.867301>

- Posner, R., Toker, I. A., Antonova, O., Star, E., Anava, S., Azmon, E., ... & Rechavi, O. (2019). Neuronal small RNAs control behavior transgenerationally. *Cell*, 177(7), 1814-1826.
- Qi, L., Cornelis, M. C., Zhang, C., Van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2009). Genetic predisposition, Western dietary pattern, and the risk of type 2 diabetes in men. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1453-1458.
- Queisser, M. A., Yao, D., Geisler, S., Hammes, H. P., Lochnit, G., Schleicher, E. D., Brownlee, M., & Preissner, K. T. (2010). Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes*, 59(3), 670–678. <https://doi.org/10.2337/db08-1565>
- Ranganathan, R., Cannon, S.C., Horvitz, H.R. (2000). *MOD-1* is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408, 470–475.
- Rankin, C. H., Beck, C. D., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. *Behavioural brain research*, 37(1), 89-92.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012; 24(5):981–990.
- Rechavi, O., Hourì-Ze'evi, L., Anava, S., Goh, W. S. S., Kerk, S. Y., Hannon, G. J., & Hobert, O. (2014). Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*, 158(2), 277-287.
- Remy, J. J. (2010). Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(20), R877-R878.
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). *Developmental Genetics of the Germ Line--C. elegans II*. Cold spring harbor laboratory press.
- Riedinger, C., Mendler, M., Schlotterer, A., Fleming, T., Okun, J., Hammes, H. P., ... & Nawroth, P. P. (2018). High-glucose toxicity is mediated by AICAR-transformylase/IMP cyclohydrolase and mitigated by AMP-activated protein kinase in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4845-4859.
- Robertson RP. *J Lab Clin Med*. 1995 May; 125(5):560-4; discussion 565.; Pathophysiology of type 2 diabetes and the role of incretin hormones and beta-cell dysfunction. *Fujioka K JAAPA*. 2007 Dec; *Suppl*():3-8.
- Rom, S., Zuluaga-Ramirez, V., Gajghate, S., Seliga, A., Winfield, M., Heldt, N. A., Kolpakov, M. A., Bashkirova, Y. V., Sabri, A. K., & Persidsky, Y. (2019). Hyperglycemia-Driven Neuroinflammation Compromises BBB Leading to Memory Loss in Both Diabetes Mellitus (DM) Type 1 and Type 2 Mouse Models. *Molecular neurobiology*, 56(3), 1883–1896.
- Saeki S, Yamamoto M, Iino Y. 2001. Plasticity of chemotaxis revealed by paired presentation of a chemoattractant and starvation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol* 204: 1757–1764.

- Schlotterer A, Pfisterer F, Kukudov G, et al. Neuronal damage and shortening of lifespan in *C. elegans* by peritoneal dialysis fluid: Protection by glyoxalase-1. *Biomed Rep.* 2018;8(6):540–546. doi:10.3892/br.2018.1085
- Schlotterer, A., Kukudov, G., Bozorgmehr, F., Hutter, H., Du, X., Oikonomou, D., ... & Sayed, A. (2009). *C. elegans* as model for the study of high glucose–mediated life span reduction. *Diabetes*, 58(11), 2450-2456.
- Seely L, Olefsky JM (1993) Potential cellular and genetic mechanisms for insulin resistance in the common disorders of diabetes and obesity. In *Insulin resistance* (Moller DE, ed) pp. 187-252, Wiley, New York
- Sengupta, P., Chou, J. H., & Bargmann, C. I. (1996). odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell*, 84(6), 899-909.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H.A., and Fire, A. (2001). On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465–476.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson, 1983 The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100: 64-119.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2017). DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Frontiers in pharmacology*, 8, 548.
- Tauffmanberger, A., & Parker, J. A. (2014). Heritable transmission of stress resistance by high dietary glucose in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 10(5).
- Teshiba, E., Miyahara, K., & Takeya, H. (2016). Glucose-induced abnormal egg-laying rate in *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(7), 1436-1439.
- Tomioka, M., Adachi, T., Suzuki, H., Kunitomo, H., Schafer, W. R., & Iino, Y. (2006). The insulin/PI 3-kinase pathway regulates salt chemotaxis learning in *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 51(5), 613-625.
- Tong, J., Geng, H., Zhang, Z., Zhu, X., Meng, Q., Sun, X., ... & Liang, Q. (2014). Brain metabolite alterations demonstrated by proton magnetic resonance spectroscopy in diabetic patients with retinopathy. *Magnetic resonance imaging*, 32(8), 1037-1042
- Tonkin, L. A., & Bass, B. L. (2003). Mutations in RNAi rescue aberrant chemotaxis of ADAR mutants. *Science*, 302(5651), 1725-1725.
- Troemel, E. R., J. H. Chou, N.D. Dwyer, H.A. Colbert, and C. I. Bargmann, 1995 Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83: 207-218. Abstract Article
- Troemel, E.R., Kimmel, B.E., and Bargmann, C.I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* 91, 161–169.
- Tullet JM, Hertweck M, An JH et al (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* 132, 1025-1038

- Umegaki H. (2014). Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights. *Clinical interventions in aging*, 9, 1011–1019. <https://doi.org/10.2147/CIA.S48926>
- Uno, M., & Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 2(1), 1-8.
- van Otterdijk, S. D., & Michels, K. B. (2016). Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence?. *The FASEB Journal*, 30(7), 2457-2465.
- Vastenhouw, N.L., Brunschwig, K., Okihara, K.L., Müller, F., Tijsterman, M., and Plasterk, R.H.A. (2006). Long-term gene silencing by RNAi: Gene expression. *Nature* 442, 882.
- Veras-Estévez, B. A., & Chapman, H. J. (2018). Strengthening national health priorities for Diabetes prevention and management. *MEDICC review*, 20, 5-5.
- Walker GA and Lithgow GJ (2003) Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* 2, 131-139
- Wang J, Robida-Stubbs S, Tullet JM, Rual JF, Vidal M and Blackwell TK (2010) RNAi screening implicates a SKN-1- dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. *PLoS Genet* 6, e1001048
- Ward, S., Thomson, N., White, J. G., & Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 160(3), 313-337.
- Wen, J. Y., Kumar, N., Morrison, G., Rambaldini, G., Runciman, S., Rousseau, J., & van der Kooy, D. (1997). Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. *Behavioral neuroscience*, 111(2), 354.
- Wes P.D., Bargmann C.I. *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons *Nature*. 2001;410:698–701.
- Wes, P. D. and C.I. Bargmann, 2001 *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature* 410: 698-701
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314(1165), 1-340.
- Wolff, S. P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British medical bulletin*, 49(3), 642-652.
- Wolkow CA, Munoz MJ, Riddle DL and Ruvkun G (2002) Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 49591-49597
- Ye, L., Wang, F., & Yang, R. H. (2011). Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain research*, 1411, 57-64.

- Yin, J. C. et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 49–58 (1994).
- Yin, J. C., Del Vecchio, M., Zhou, H. & Tully, T. CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81, 107–115 (1995).
- Yokoyama K, Fukumoto K, Murakami T et al (2002) Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knock- ing in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS Lett* 516, 53-57
- Zarse, K., Schmeisser, S., Groth, M., Priebe, S., Beuster, G., Kuhlow, D., Guthke, R., Platzer, M., Kahn, C. R., & Ristow, M. (2012). Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell metabolism*, 15(4), 451–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.013>
- Zhang M, Kho AL, Anilkumar N, Chibber R, Pagano PJ, Shah AM, et al. (2006). Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)- containing NADPH oxidase. *Circulation*, 113: 1235- 1243
- Zhang, Y., Lu, H., & Bargmann, C. I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438(7065), 179-184.
- Zheng, S., Chiu, H., Boudreau, J., Papanicolaou, T., Bendena, W., & Chin-Sang, I. (2018). A functional study of all 40 *Caenorhabditis elegans* insulin-like peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 293(43), 16912-16922.