



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL A RNA SOBRE LA CONDUCTA DE C.  
ELEGANS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**Azael Hernández Rodríguez**

**ASESOR: Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez**



**CDMX**

**AÑO 2024**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **PROFESOR: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ**

**VOCAL:**               **PROFESOR: ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO**

**SECRETARIO:**       **PROFESOR: VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ**

**1ER. SUPLENTE:**     **PROFESOR: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

**2° SUPLENTE:**       **PROFESOR: ALBERTO ORTEGA VÁZQUEZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 302 ORIENTE, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ASESOR DEL TEMA: DR. VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. NALLELY CANO DOMÍNGUEZ**

**SUSTENTANTE: AZAEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

## **Agradecimientos**

Esta tesis se desarrolló bajo la tutoría del Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez, en el laboratorio 302 Oriente del departamento de Biología Celular y del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El presente trabajo contó con financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto CB-2016-01 No. 0284867, así como por la Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No. IN203820 y IN217824. Este trabajo contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado: la profesora Raquel Ortega Muñoz y el Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo. Se reconoce y agradece a la Dra. Nallely Cano Domínguez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo. También se agradece a la Unidad de Biología Molecular, la Unidad de Bioinformática y Manejo de la Información, a Cómputo, a la Biblioteca y el taller de Mantenimiento del IFC.

Agradezco también a Francisco, Marianita y Jackyeris Velarion “Primera de su nombre”, así como a todos los integrantes del ValdesLab quienes siempre me brindaron su apoyo durante todo este tiempo en el laboratorio.

## Índice

1. Resumen
2. Abstract
3. Introducción
  - 3.1 *C. elegans* como modelo de estudio
  - 3.2 El sistema nervioso y la conducta de *C. elegans*
  - 3.3 Circuitos quimiosensores y quimiotaxis
  - 3.4 Importancia del procesamiento de RNA en *C. elegans*
    - 3.4.1 RNAi ambiental y sistémico
    - 3.4.2 Otras vías implicadas en el procesamiento de dsRNA
    - 3.4.3 Efecto del RNA en la conducta de *C. elegans*
4. Justificación
5. Pregunta de investigación
6. Hipótesis
7. Objetivo general
8. Objetivos particulares
9. Metodología
  - 9.1 Mantenimiento y cepas de *C. elegans*
  - 9.2 Extracción de RNA
  - 9.3 Exposición a RNA exógeno y Poly I:C
  - 9.4 Ensayos de quimiotaxis
  - 9.5 Electroforesis en gel de agarosa
  - 9.6 Análisis estadísticos

## 10. Resultados

### 10.1 Integridad del RNA exógeno

10.2 La exposición ambiental a RNA exógeno induce un cambio sobre la preferencia al odorante 2-Butanona en *C. elegans*

10.3 El aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona depende de la cantidad de RNA exógeno

10.4 La exposición a RNA exógeno requiere de SID-1, SID-2 y NRDE-3 para el aumento en la preferencia a 2-Butanona

10.5 La exposición a Poly I:C induce un aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona en *C. elegans*

## 11. Discusión

11.1 Consideraciones de nuestro protocolo de exposición a RNA exógeno ambiental

11.2 Consideraciones de la quimiotaxis y efecto conductual por exposición a RNA exógeno ambiental

11.3 El RNA exógeno ambiental induce un aumento en la preferencia de forma dosis dependiente al odorante 2-Butanona

11.4 Múltiples vías de RNAi están involucradas en el aumento de la preferencia por el odorante 2-Butanona

11.5 Efecto de la estructura del dsRNA en la preferencia por 2-Butanona

## 12. Conclusiones

## 13. Resumen gráfico

## 14. Perspectivas

## 15. Referencias

## 1. Resumen

*Caenorhabditis elegans* es uno de los organismos modelo ampliamente usados debido a su versatilidad y ventajas experimentales. Además, este organismo es extremadamente sensible a diversos factores ambientales. En nuestro laboratorio se ha demostrado que diversos estímulos ambientales pueden modificar el comportamiento de *C. elegans* en cuanto a su preferencia o quimiotaxis a odorantes. Por ejemplo, la exposición ambiental a concentraciones altas de glucosa afecta la memoria asociativa al benzaldehído, mientras que el ayuno induce un aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona. Por otro lado, en la literatura se ha reportado que la exposición a algunas moléculas de RNA, o la interrupción de las vías de procesamiento de este, modifican la conducta del gusano, no obstante, la mayoría de los resultados se han descrito con un enfoque sobre el RNA endógeno y RNA bacteriano patógeno. Sin embargo, no se ha demostrado si el RNA exógeno ambiental de origen no patógeno, puede inducir cambios sobre la conducta de este nematodo. En este trabajo evaluamos el efecto que tiene la exposición a RNA exógeno sobre la conducta de *C. elegans* utilizando la preferencia a odorantes. Nuestros resultados mostraron que la exposición de *C. elegans* a RNA exógeno induce un aumento en la preferencia por el odorante 2-Butanona de forma dosis-dependiente. Además, se requiere de los genes *sid-1*, *sid-2* y *nrde-3*, las cuales son proteínas involucradas en el transporte y procesamiento del RNA, para el establecimiento de esta conducta. También demostramos que el Poly I:C, una molécula sintética que asemeja al dsRNA, promueve un aumento en la preferencia por 2-Butanona. En conjunto, nuestros resultados sugieren que el RNA exógeno ambiental puede inducir modificaciones sobre la conducta de *C. elegans* y que las moléculas responsables de estas modificaciones posean una estructura de dsRNA.

## 2. Abstract

*Caenorhabditis elegans* is a model organism widely used due to its versatility. Moreover, this organism is highly sensitive to multiple environmental factors. In our lab, it has been demonstrated that several stimuli modify *C. elegans* behavior and its preference or chemotaxis for odorants. For example, exposure to high glucose concentrations affects the benzaldehyde associative memory, while long-periods of starvation induce an increase in the preference for the odorant 2-Butanone. On the other hand, literature has reported that exposure to RNA molecules or the interruption of any RNA processing pathway modifies the worm's behavior, however, most of these results have been described focusing on endogenous RNA and bacterial RNA. Nevertheless, it has not been demonstrated if exposure to non-pathogenic environmental exogenous RNA can induce behavioral changes on this nematode. On this work we assessed the behavioral effect which would have the exposure to exogenous RNA over *C. elegans* behavior using the preference for odorants. Our results showed that exposure to exogenous RNA induces an increase in preference for the odorant 2-Butanone in dose-dependent way. Furthermore, the genes *sid-1*, *sid-2* and *nrde-3* are required, these are proteins involved in RNA transportation and processing, for the establishment of this behavior. Also, we demonstrated that synthetic dsRNA molecule as it is the Poly I:C promotes an increase in preference for 2-Butanone. Overall, our results suggest that environmental exogenous RNA can induce modifications over *C. elegans* behavior and the responsible molecules of these modifications have a dsRNA structure.



### 3. Introducción

#### 3.1 *C. elegans* como modelo de estudio

El nemátodo *Caenorhabditis elegans* se ha vuelto uno de los organismos modelo ampliamente usados debido a su versatilidad en distintos enfoques de la biología, este organismo es un nematodo no parasítico de vida libre que puede medir 0.25 mm como larva recién eclosionada llegando a medir hasta 1 mm en su etapa adulta. Debido a su tamaño y a que es transparente, es un modelo biológico adecuado para observarse mediante microscopía (Corsi et al., 2015; Meneely et al., 2019).

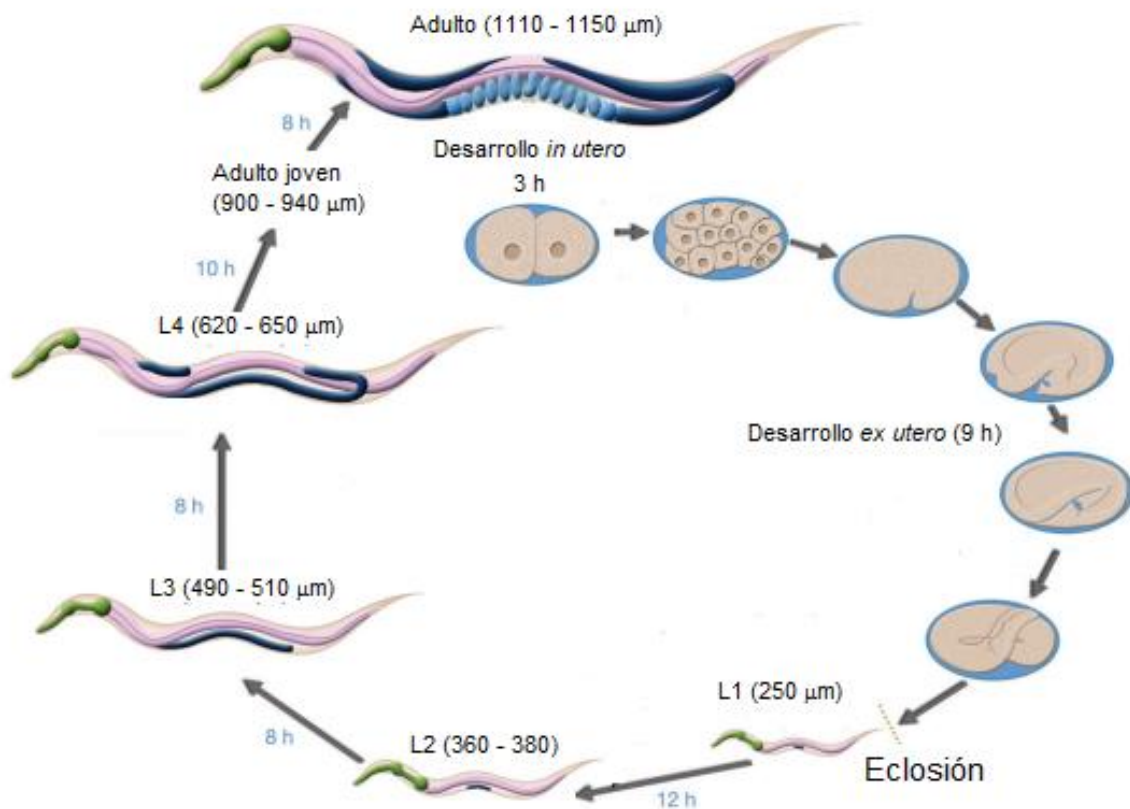
*C. elegans* se alimenta de bacterias y tiene un ciclo de vida de 21 días y un corto ciclo reproductivo de solo 3 días, es decir, transcurren 72 horas desde el huevo hasta un adulto capaz de generar descendencia, esto cuando se cultivan a 20 °C. En su etapa adulta puede ovopositar hasta 300 huevos dentro de su ciclo reproductivo. *C. elegans* es un organismo principalmente hermafrodita capaz de producir tanto ovocitos como espermatozoides y de autofecundarse. Sin embargo, los machos surgen con una frecuencia  $< 0.2\%$  en la población, siendo las diferencias entre machos y hermafroditas evidentes: los machos son de menor tamaño, no son capaces de producir huevos y tal vez la diferencia más característica es que presentan una cola en forma de abanico (Fig. 1). Desde el punto de vista metodológico, *C. elegans* tiene la ventaja de la autofertilización de las hermafroditas lo que permite el mantenimiento de cepas homocigotas dentro del laboratorio. (Corsi et al., 2015; Loxterkamp et al., s. f.; Meneely et al., 2019)



**Figura 1. *C. elegans* hermafrodita (A) y macho (B).** Se observan diferencias en el tamaño y el macho presenta una cola en forma de abanico. Modificado de: Meneely et al. (2019)

Posterior a la fecundación *in utero*, la embriogénesis de *C. elegans* tiene una duración aproximada de entre 12 a 16 h a 20 °C. Una vez que el nematodo eclosiona del huevo ovopositado, este empieza su primer estadio larvario (L1) para posteriormente atravesar un total de 4 etapas larvarias (L1 – L4) antes de llegar a ser adulto en aproximadamente 40 horas (Fig. 2) (Corsi et al., 2015; Loxterkamp et al., s. f.; Meneely et al., 2019).

En el laboratorio, *C. elegans* crece en placas de agar con un césped de bacteria como alimento. Normalmente se utiliza *Escherichia coli* de la cepa OP50. Sin embargo, en ausencia de alimento, el desarrollo de las etapas larvarias es detenido o arrestado induciendo la entrada a estados hipometabólicos capaces de resistir prolongados periodos de inanición (Corsi et al., 2015; Marsh & May, 2012).



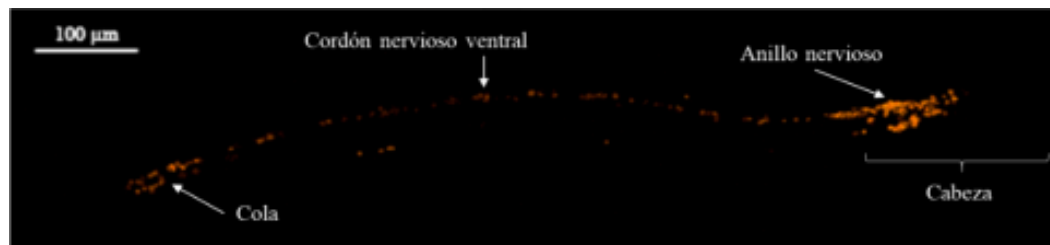
**Figura 2. Ciclo de vida y desarrollo de *C. elegans* a 20 °C.** Se muestran los 4 estadios larvarios hasta llegar a la etapa adulta. Modificado de: Meneely et al. (2019)

Algo extremadamente notable de *C. elegans* es que el número de células de un nematodo hermafrodita adulto es de exactamente de 959 células. Estas están distribuidas en la epidermis, músculos, sistema digestivo, sistema nervioso y sistema reproductivo, las cuales siempre están localizadas de la misma forma conservando así su funcionalidad (Corsi et al., 2015; Meneely et al., 2019).

*C. elegans* es el primer organismo eucarionte multicelular cuyo genoma fue secuenciado en 1997. El genoma completo de este nematodo es de 100 Mb, distribuidos en 5 pares de autosomas (I–V) y un par de cromosomas X (los machos sólo poseen un cromosoma X), con 19,981 genes codificantes (Corsi et al., 2015; Loxterkamp et al., s. f.). Las características descritas anteriormente y la simpleza de su mantenimiento confieren a *C. elegans* la capacidad de ser un poderoso modelo biológico para el estudio y comprensión de mecanismos moleculares en distintos fenómenos y procesos de la biología. Además, conocer con profundidad los diversos mecanismos biológicos de este animal puede sentar las bases para el estudio de fenómenos complejos en otros modelos biológicos incluidos los mamíferos.

### **3.2 El sistema nervioso y la conducta de *C. elegans***

El sistema nervioso de un nematodo adulto hermafrodita está compuesto por 302 neuronas distribuidas en la cabeza, el cordón ventral y la cola (Fig. 3). Las 302 neuronas de *C. elegans* pertenecen a dos sistemas nerviosos independientes, 282 en un gran sistema nervioso somático y 20 en un pequeño sistema nervioso faríngeo. En el caso del sistema nervioso somático, las neuronas se localizan entre la hipodermis y el músculo de la pared corporal, mientras que las neuronas faríngeas se ubican únicamente entre los músculos faríngeos. Por otro lado, los nematodos macho poseen un sistema nervioso más grande con 381 neuronas, la mayoría de estas se localizan en la parte posterior del cuerpo del gusano y sus funciones se relacionan con el apareamiento. Este sistema nervioso ya ha sido mapeado con exactitud, haciéndolo un modelo robusto para estudios de desarrollo y función neuronal, así como análisis de conectoma (Gutiérrez Chávez et al., 2021; *Hermaphrodite - Nervous System - General Overview*, s. f.; Meneely et al., 2019).



**Figura 3. Sistema nervioso de *C. elegans*.** Se observa una fotografía de microscopía confocal obtenida en nuestro laboratorio de una cepa que expresa RFP (Red Fluorescent Protein) (OH10690) en todas las neuronas de un individuo hermafrodita adulto. Gutiérrez (2021)

Se han clasificado 118 tipos de neuronas en *C. elegans* de acuerdo con su topología y patrones de conexión sináptica. Estas se comunican a través de 6400 sinapsis químicas, 900 sinapsis eléctricas y 1500 uniones neuromusculares. Cada neurona de este nematodo es nombrada a partir de 2 o 3 letras mayúsculas que indican la clase y en algunos casos un número, el cual indica el número de neurona dentro de una clase. Si las neuronas son simétricas, estas poseen un nombre de 3 letras mayúsculas seguido de: L (izquierda), R (derecha), D (dorsal) y V (ventral) para cada caso particular (*Hermaphrodite - Nervous System - General Overview*, s. f.).

Así como en otros organismos, la sinapsis química de *C. elegans* se lleva a cabo mediante neurotransmisores clásicos, como monoaminas, acetilcolina, ácido gamma aminobutírico (GABA) y glutamato, estos neurotransmisores son liberados por vesículas de neuronas presinápticas al espacio sináptico para unirse a receptores específicos y excitar o inhibir neuronas postsinápticas para generar una respuesta. Por otra parte, las uniones neuromusculares son un tipo de sinapsis química especializada donde la entrada neuronal ocurre en músculos, la principal diferencia es la lámina basal que separa la neurona motora presináptica del músculo postsináptico. Finalmente, las sinapsis eléctricas constan de un tipo de contacto célula-célula formado por innexinas que forman canales de membrana intercelulares y se encuentran en todos los tipos celulares del nematodo, participan en el desarrollo y las funciones musculares. (Hall,

2017; *Hermaphrodite - Nervous System - General Overview*, s. f.; Richmond, 2006; Yan et al., 2022).

En relación con lo anterior, podemos decir que la conducta es un reflejo de la actividad del sistema nervioso de *C. elegans* y que depende de los estímulos externos que este experimenta. Podríamos definir la conducta como la respuesta o conjunto de respuestas frente a un estímulo y en particular *C. elegans* con un sistema nervioso relativamente sencillo, puede integrar señales ambientales y modificar su comportamiento. Inicialmente el estudio de la conducta de *C. elegans* estaba limitado a procesos como la alimentación, movimiento y ovoposición, sin embargo, también experimenta un estado de letargo que consiste en periodos de inactividad los cuales algunos autores los consideran similares a un estado de sueño (Raizen et al., 2008). Además, *C. elegans* es capaz de responder y procesar diversos estímulos ambientales como odorantes, el contacto, la osmolaridad y la temperatura. Debido a la sensibilidad de estos nemátodos hacia los estímulos, también se han estudiado conductas más complejas mediante ensayos de quimiotaxis, termotaxis, respuesta al contacto, aprendizaje asociativo y no asociativo, etc. (Corsi et al., 2015; Hart, 2006; Hobert, 2003; Meneely et al., 2019.).

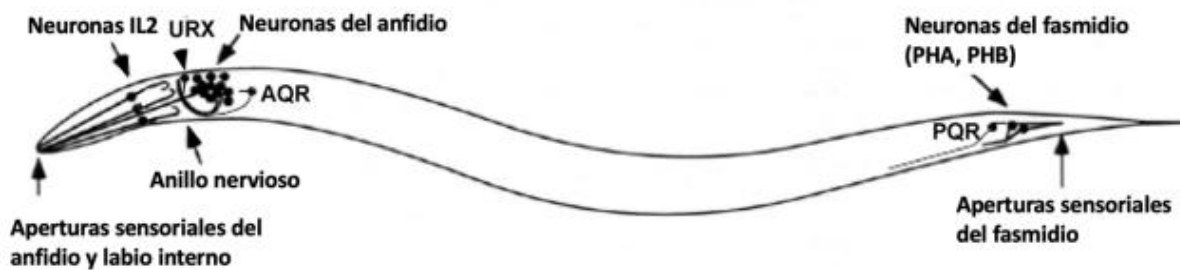
### **3.3 Circuitos quimiosensores y quimiotaxis**

El comportamiento de todo organismo radica en el procesamiento de las señales ambientales. La quimiopercepción proporciona a los organismos información relevante sobre su entorno, debido a que son capaces de reconocer moléculas tanto atractivas como repulsivas para favorecer su supervivencia. Los sistemas quimioperceptores interactúan directamente con las señales químicas ambientales y regulan diferentes conductas, por ejemplo, los humanos son capaces de reconocer por lo menos 10 000 olores distintos, mientras que la mayoría de los mamíferos posee mayor sensibilidad para el reconocimiento de olores (Prasad & Reed, 1999; Yohe & Brand, 2018).

Como ya se mencionó, *C. elegans* posee un sistema nervioso con un total de 302 neuronas, de las cuales 32 están caracterizadas como neuronas quimiosensoras. Estas

pueden estar directa o indirectamente expuestas al ambiente a través de aperturas generadas por células gliales (C. Bargmann, 2006).

A su vez, estas neuronas sensitivas están repartidas en las estructuras llamadas anfidio, fasmidio y órgano labial interno. Cada uno de los dos anfidios presenta 12 neuronas asociadas a quimiopercepción, por otra parte, cada fasmidio de los dos presentes en el nematodo cuenta con 2 neuronas quimioperceptoras. En el caso particular del órgano labial interno existen 2 neuronas IL1 e IL2, de las cuales sólo la última es quimioperceptora (Fig. 4). Cada neurona quimioperceptora expresa un conjunto determinado de receptores acoplados a una proteína G, capaces de reconocer moléculas atractantes, repelentes o feromonas. Estas proteínas receptoras se expresan en los pares izquierdo y derecho de las neuronas quimioperceptoras. (C. Bargmann, 2006; *Hermaphrodite - Nervous System - General Overview*, s. f.; Prasad & Reed, 1999).



**Figura 4. Localización de neuronas quimioperceptoras en *C. elegans*.** Las neuronas quimiosensoriales del anfidio y fasmidio generalmente pertenecen a pares bilateralmente simétricos en los que los miembros izquierdo y derecho de cada clase son estructuralmente similares. (Pinta, 2022; Bargman, 2006).

La quimiotaxis de *C. elegans* es medida al establecer un gradiente de alguna molécula atractante desde una fuente puntual donde se observa la acumulación de los nematodos en la fuente del atrayente. El atrayente puede ser soluble en agua y este se difunde a través del medio, agar en el caso de condiciones de laboratorio, aunque también puede ser un compuesto volátil. Generalmente, los compuestos volátiles son detectados por *C. elegans* en cantidades nanomolares, mientras que los atrayentes

solubles en agua son detectados en cantidades micro y milimolares (C. Bargmann, 2006; C. I. Bargmann et al., 1993).

Diversos compuestos volátiles orgánicos son atractivos para este gusano como alcoholes, cetonas, aldehídos o compuestos aromáticos, entre otros. Interesantemente, muchas de estas moléculas son parte del metabolismo bacteriano y seguramente el que *C. elegans* los detecte es un reflejo de la adaptabilidad de este animal por su entorno y la búsqueda de comida. Por ejemplo, se ha identificado que el diacetilo es un compuesto volátil atractivo para *C. elegans* que media la atracción por la bacteria no patogénica *Lactobacillus sp.* Por otra parte, *Serratia marcescens* libera 2-Butanona que resulta atractivo para el gusano. Muchos compuestos volátiles que generan atracción en *C. elegans* son detectados a través de las neuronas AWC y AWA, particularmente el odorante 2-Butanona genera atracción a distintas concentraciones y es detectado por las neuronas AWC, sin embargo, la exposición prolongada a butanona disminuye la quimiotaxis a este odorante (C. Bargmann, 2006; Worthy, Haynes, et al., 2018; Worthy, Rojas, et al., 2018).

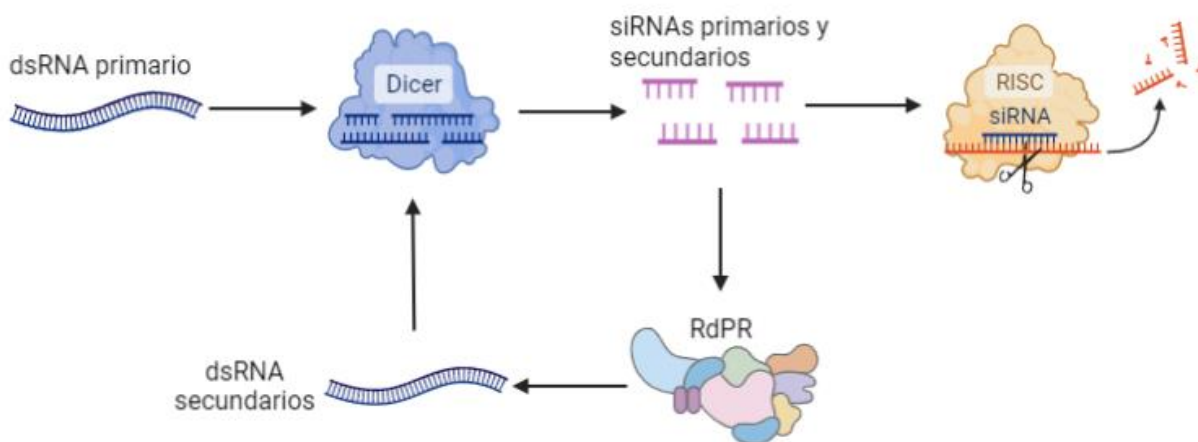
Es importante mencionar que diversos factores ambientales afectan la preferencia o quimiotaxis a un odorante, por ejemplo, la privación de comida cambia la quimiotaxis para el alcohol isoamílico, la exposición a una temperatura de 30 °C también altera la quimiotaxis e incluso un mismo odorante puede inducir respuestas de atracción o repulsión dependiendo de la concentración (Parida et al., 2014; Shimizu et al., 2019; Yoshida et al., 2012).

### **3.4 Importancia del procesamiento de RNA en *C. elegans***

Si bien el RNA tiene un rol fundamental para los organismos y los procesos biológicos relacionados con la síntesis proteica, esta molécula puede tener además un papel como regulador de la expresión genética. Ejemplo de ello es la regulación postranscripcional regulada por miRNAs, los cuales son RNAs pequeños generados a partir de sus propios genes o de intrones y que pueden degradar o interrumpir la traducción de un mRNA blanco (Cho et al., 2016).

En *C. elegans* se puede realizar un proceso de silenciamiento génico llamado RNA de interferencia (RNAi), el cual está bien caracterizado. Este silenciamiento génico es inducido por RNA de doble cadena (dsRNA) que actúa de forma transcripcional o postranscripcional. El RNAi es una herramienta muy poderosa para la investigación debido a sus características, ya que este proceso es sistémico y hereditario en *C. elegans* ((Grishok, 2005; Whangbo & Hunter, 2008).

Inicialmente el RNAi se realizaba inyectando en la gónada dsRNA homólogo al gen que se quería silenciar y observar el fenotipo de la descendencia, sin embargo, se desarrollaron técnicas que consistían en alimentar a los gusanos con bacterias que expresaran los dsRNAs o simplemente sumergirlos en una solución de dsRNA. A grandes rasgos la ruta clásica de RNAi es inducida por dsRNA endógenos o exógenos, el complejo Dicer se encarga de procesar los dsRNAs para formar RNAs pequeños de interferencia (siRNAs, por sus siglas en inglés). Posteriormente el Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA o RISC, por sus siglas en inglés, está asociado al siRNA y otras proteínas con el propósito de reconocer un mRNA específico y degradarlo. A la par de este proceso, otro complejo que contiene RNA polimerasas dependientes de RNAs (RdPRs) se encarga de la formación de dsRNAs a partir de los siRNAs previamente acumulados, estos dsRNAs son procesados nuevamente por el complejo Dicer con el fin de generar más siRNAs (Fig.5) (Grishok, 2005).



**Figura 5. Ruta clásica del RNAi.** Se puede observar que los dsRNAs tanto primarios como secundarios son procesados por proteínas Dicer para formar siRNAs. Estos se asocian al complejo RISC para la degradación de mRNAs o pueden asociarse a RdPRs para la síntesis de



nuevo dsRNAs, lo cual provoca la acumulación de siRNAs y por lo tanto un efecto exacerbado de silenciamiento.

### 3.4.1 RNAi ambiental y sistémico

Inducir el silenciamiento al sumergir gusanos en soluciones de dsRNA o alimentarlos con bacteria que expresan dsRNA es conocido como RNAi ambiental, es decir, los RNAs ambientales son internalizados desde el lumen intestinal. Posteriormente son liberados en el pseudoceloma, el cual es una cavidad corporal llena de líquido, una de cuyas funciones es proporcionar un medio para la señalización celular y transporte de nutrientes; para finalmente ser importados al tejido blanco e iniciar la ruta RNAi (Braukmann et al., 2017).

SID-2 es una proteína transmembranal expresada únicamente en células intestinales de *C. elegans* y es la responsable de internalizar el dsRNA ambiental en el intestino mediado por transporte vesicular. Es importante aclarar que a pesar de que SID-2 tiene un rol más directo con el procesamiento de dsRNA debido a su ubicación, este no es el único mecanismo de captura de dsRNA, además no se requiere de SID-2 para el transporte intercelular de RNA (Braukmann et al., 2017; McEwan et al., 2012).

Debido a la exclusiva expresión de SID-2 en las células intestinales, esta proteína no participa en el RNAi sistémico, es decir, la distribución del silenciamiento a otros tejidos. Se ha demostrado que las mutantes de *sid-2* son capaces de realizar RNAi después de inyectar dsRNA. Además de SID-2 existe una proteína transmembranal llamada SID-1, cuya función es la captura de dsRNA. SID-1 se encuentra expresada en todas las células del nematodo con excepción de las neuronales. Se determinó que en mutantes de *sid-1* no ocurre el silenciamiento por RNAi, así los dsRNAs hayan sido introducidos por inyección o alimentación, lo que indica que SID-1 es esencial para la internalización y distribución sistémica de los dsRNAs (Braukmann et al., 2017; McEwan et al., 2012).

Cabe mencionar que la respuesta de silenciamiento sistémica mediada por dsRNA parece ser exclusiva de *C. elegans* y otros organismos como los mamíferos, no poseen esta familia de transportadores de dsRNAs en sus genomas (Valdes et al., 2012).

### 3.4.2 Otras vías implicadas en el procesamiento de dsRNA

La mayoría de los organismos presentan por lo menos un sistema inmunitario rudimentario para defenderse en contra de agentes patógenos, por ejemplo, virus de RNA. Tanto el ssRNA como el dsRNA pueden ser reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones, también llamados PRR's por sus siglas en inglés. En mamíferos uno de los PRR's responsables del reconocimiento de dsRNA viral es el gen inducible por ácido retinoico o RIG-I. Este receptor al ser activado despliega la respuesta inmunitaria antiviral innata al inducir la transcripción de interferones tipo 1 y otros genes que participan en la respuesta antiviral. (Rehwinkel & Gack, 2020; Tatematsu et al., 2018).

Interesantemente, *C. elegans* despliega un mecanismo antiviral a través del proceso de RNAi mediante la proteína DRH-1. Inicialmente DRH-1 se identificó como una proteína asociada al proceso de RNAi, ya que interactuaba con RDE-4 y DCR-1, las cuales son proteínas necesarias para el procesamiento de dsRNAs en siRNAs. Sin embargo, se demostró que DRH-1 también es capaz de actuar independientemente para inducir la transcripción de genes de respuesta patógena intracelular contra el virus Orsay debido a que actúa como un PRR, ya que esta proteína presenta un dominio conservado de RIG-I capaz de reconocer el RNA de la replicación viral (Ashe et al., 2013; Sowa et al., 2020).

Otra proteína relevante en el proceso de RNAi en *C. elegans* es NRDE-3, la cual es una proteína Argonauta y forma parte de las rutas de RNAi, que como ya se mencionó son de gran importancia en los mecanismos que regulan la expresión génica. En ausencia de siRNAs NRDE-3 se encuentra localizada en el citoplasma, sin embargo, cuando esta proteína se asocia a siRNAs generados por RdPRs, este complejo se transloca al núcleo donde se asocia al pre-mRNA y a otras proteínas para realizar un silenciamiento génico a través de la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9me3) y la formación de heterocromatina (Lewis et al., 2020). Adicionalmente, se ha demostrado que la presencia de NRDE-3 es dosis-dependiente, es decir que, mientras

más cantidad hay de esta proteína la respuesta de RNAi es potenciada (Guang et al., 2008).

### 3.4.3 Efecto del RNA en la conducta de *C. elegans*

Como ya mencionamos el RNA tiene un papel fundamental sobre la expresión génica debido a que es una molécula capaz de enviar información compleja y precisa a distintos blancos en *C. elegans*. Por lo tanto, es de esperarse que estos cambios en el perfil génico del nematodo tengan un efecto sobre el fenotipo y por lo tanto su conducta (Legüe & Calixto, 2019).

Se sabe que la exposición prolongada a odorantes puede inducir una plasticidad conductual denominada adaptación, esto se ve reflejado en la conducta de *C. elegans* ya que la respuesta de preferencia por el odorante disminuye debido a la exposición prolongada a este. Juang et al. demostraron que NRDE-3 es requerida en neuronas olfatorias AWC para promover este proceso de adaptación, esta proteína es cargada con siRNAs endógenos cuyo blanco es *odr-1*, un gen que, al ser silenciado por estos siRNAs, provoca el proceso de adaptación. Estos resultados demostraron que los siRNAs endógenos del nematodo modifican la conducta (Colbert & Bargmann, 1997; Juang et al., 2013).

Otro claro ejemplo del efecto del RNA sobre la conducta de *C. elegans* es la aversión. *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) es una bacteria que se encuentra en el hábitat natural de *C. elegans*, junto con otras bacterias. A pesar de la atracción del nematodo por esta bacteria, *C. elegans* aprende a evadirlas, después de que este ha sido infectado por *P. aeruginosa*, sin embargo, Kaletsky et al, concluyeron que un ncRNA (RNA no codificante) de PA14, junto con la maquinaria de RNAi del nematodo es necesario y suficiente para inducir este efecto de aversión a esta bacteria. Este hallazgo demuestra que basta de un ncRNA exógeno, en este caso bacteriano, para inducir un comportamiento aversivo, sin haber experimentado este estímulo aversivo previamente (Kaletsky et al., 2020; Samuel et al., 2016; Zhang et al., 2005).

Sin embargo, estos cambios conductuales no son exclusivos de sncRNAs, Fernandes et al, demostraron que *C. elegans* puede adquirir impronta olfatoria a odorantes específicos cuando estos son alimentados con tRNA<sup>Ala</sup> (UGC) purificados de gusanos que previamente adquirieron impronta olfatoria a odorantes específicos (Fernandes De Abreu et al., 2020).

A partir de los ejemplos anteriores, podemos esperar que cualquier alteración en el procesamiento del RNA, ya sea endógeno o exógeno, podría afectar el comportamiento de *C. elegans*.

#### **4. Justificación**

Tanto nuestro laboratorio, como otros grupos, hemos observado que diversos estímulos ambientales modifican el comportamiento de *C. elegans*, por ejemplo, que la exposición a concentraciones altas de glucosa afecta la memoria asociativa al benzaldehído o que periodos prolongados de ayuno inducen un aumento en la preferencia por 2-Butanona (Gutiérrez Chávez et al., 2021; Zurita León et al., 2022)

Por otro lado, se ha reportado que la exposición a algunas moléculas de RNA o la interrupción de alguna vía de procesamiento de este, modifica la conducta del gusano. No obstante, la mayoría de los resultados se han descrito con un enfoque sobre el RNA endógeno y el RNA de bacterias patógenas. En el particular caso de las bacterias patógenas, no es raro esperar que el RNA de las mismas, induzca cambios conductuales en *C. elegans*, debido a que la estructura del RNA puede ser reconocida extracelularmente como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), lo que promueve una respuesta inmunológica innata que pudiera alterar la conducta del gusano. Sin embargo, se desconoce el efecto que causa el RNA exógeno ambiental no patógeno sobre la conducta de *C. elegans* y sobre su preferencia a los odorantes.

A partir de lo anterior, decidimos examinar el efecto conductual que tendría sobre la preferencia de un odorante, el exponer a *C. elegans* a un RNA exógeno no patogénico de forma ambiental, en particular a un RNA de mamífero. Caracterizar este efecto establecería un sólido precedente e incluso una nueva línea de trabajo sobre el

cambio conductual ocasionado por otro tipo de estímulos como el RNA ambiental en este organismo.

## **5. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto que tiene la exposición ambiental a RNA exógeno sobre la preferencia a odorantes en *C. elegans* y qué vías están implicadas?

## **6. Hipótesis**

La exposición a RNA exógeno ambiental modifica la preferencia basal por el odorante 2-Butanona de *C. elegans*. Este cambio conductual será dependiente de las vías de procesamiento de dsRNA.

## **7. Objetivo general**

Determinar si la preferencia por el odorante 2-Butanona se modifica al exponer a *C. elegans* a RNA exógeno e identificar las vías que participan en el establecimiento de este cambio conductual

## **8. Objetivos particulares**

1. Definir la preferencia de *C. elegans* por el odorante 2-Butanona después de la exposición ambiental a un RNA exógeno.
2. Determinar si la preferencia de *C. elegans* por el odorante 2- Butanona es dosis-dependiente del RNA exógeno mediante una curva dosis-respuesta.
3. En cepas mutantes, caracterizar si las vías de procesamiento de RNA en *C. elegans* están implicadas en el cambio de la preferencia al odorante 2-Butanona posterior a la exposición a RNA exógeno.

4. Identificar si es posible inducir un cambio en la preferencia de *C. elegans* por la 2-Butanona mediante ensayos de exposición a un análogo sintético de dsRNA como el Poly I:C.

## 9. Metodología

### 9.1 Mantenimiento y cepas de *C. elegans*

Se utilizó NGM Lite (Nematode Growth Medium Lite) como medio para *C. elegans*, este medio es una preparación modificada del NGM previamente usado por Brenner en 1974, esta modificación contiene NaCl 1.5 %, bactotripton 4 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, colesterol 8 mg/L y agar 20 %, y fue originalmente usado por Sun y Lambie en 1997. Este medio se esteriliza en autoclave, es servido en cajas Petri de 30 y 100 mm y se deja solidificar. Las cajas con NGM Lite son inoculadas con bacteria *E. coli* OP50-1 cuyo propósito es ser la fuente de alimento para *C. elegans*. Esta bacteria fue incubada toda la noche, en medio Luria Bertani (LB) y estreptomycin (50 µg/mL) a 37°C en agitación (250 rpm) (Brenner, 1974; Stiernagle, 2006; Sun & Lambie, 1997). Las cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo están enlistadas en la Tabla 1. En todos los casos, los nemátodos se mantuvieron a una temperatura de 20 °C.

**Tabla 1. Cepas de *C. elegans* utilizadas**

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Descripción</b>
N2	Silvestre	Aislada en Bristol, Inglaterra en 1963 por Sidney Brenner.
NL3321	sid-1 (pk3321) V	Resistente a la ingesta dsRNA, pero sensible a inyección de dsRNA (Tijsterman et al., 2004)

HC271	ccls4251 I; qtls3 sid-2(qt42) III; mls11 IV.	Expresión de GFP en embriones de 4 células, músculo faríngeo e intestino. Resistente a RNAi sistémico sólo por ingesta. (Winston et al., 2007)
RB2519	drh-1 (ok3495) IV	Homocigoto de F1510. (The <i>C. elegans</i> Deletion Mutant Consortium, 2012)
YY158	<i>nrde-3</i> (gg66) X	RNAi nuclear defectuoso. (Guang et al., 2008)

## 9.2 Extracción de RNA de mamífero

Se obtuvo RNA a partir de cerebros de rata donados para este estudio usando el protocolo de extracción con Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante. Previo a esto, los cerebros fueron machacados y se dejaron macerar en Trizol durante 30 minutos. El RNA cuantificado fue alicuotado y almacenado en tubos de 200  $\mu$ L a  $-80$  °C.

## 9.3 Exposición a RNA exógeno y Poly I:C

Se utilizaron gusanos en estadio L1, estos fueron sincronizados 16 horas antes de comenzar el experimento, es decir la exposición al RNA exógeno o Poly I:C. El proceso de sincronización consiste en someter nematodos adultos grávidos a un tratamiento con hipoclorito e hidróxido de sodio con el fin de extraer los embriones. Podemos reconocer a estos gusanos grávidos porque bajo el microscopio observamos una gran cantidad de huevos dentro del gusano. Los embriones extraídos después del tratamiento de lisis se lavan de 6 a 8 veces con M9 y se resuspenden en el mismo buffer con 0.1 mL. El buffer M9 contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  17 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  23 mM, NaCl 86 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM. Transferimos los embriones obtenidos a cajas Petri de 30 mm con

100  $\mu$ L de bacteria *E. coli* OP50-1, procurando que estos queden distribuidos solamente dentro del césped de bacteria.

Los embriones eclosionan para volverse larvas en estadio L1, estas fueron expuestas al RNA exógeno o a Poly I:C (dependiendo del tratamiento) durante 2 h. Esto lo realizamos aproximadamente 16 h después de la sincronización, procurando que la mayoría de los embriones hubieran eclosionado, asegurando así que los gusanos estén en un estadio larvario L1.

El RNA exógeno o el Poly I:C debe ser cuidadosamente distribuido por todo el césped bacteriano, procurando que este quede cubierto por la disolución (Fig. 6). Al finalizar el periodo de exposición (2 h), los gusanos fueron lavados con M9 y transferidos a cajas de 100 mm con 4.5 mL de bacteria *E. coli* OP50-1 durante 48 h hasta la etapa de adulto joven para su uso en ensayos de quimiotaxis.



**Figura 6. Esquema de exposición a RNA exógeno o Poly IC.** El tiempo aproximado de eclosión es de 16 h, por lo tanto, la exposición se realiza 16 h después de la sincronización en larvas L1, estas se encuentran en cajas de 30 mm con 100  $\mu$ L de bacteria, esto porque las larvas estarán principalmente en el césped bacteriano, lo cual nos permite que el RNA o el Poly I:C se distribuya en todo el césped y la exposición sea más homogénea. Después de la exposición lavamos los gusanos con 1 mL de M9 y los transferimos a cajas de 100 mm con bacteria hasta que alcanzan la etapa de adulto joven (48 h).

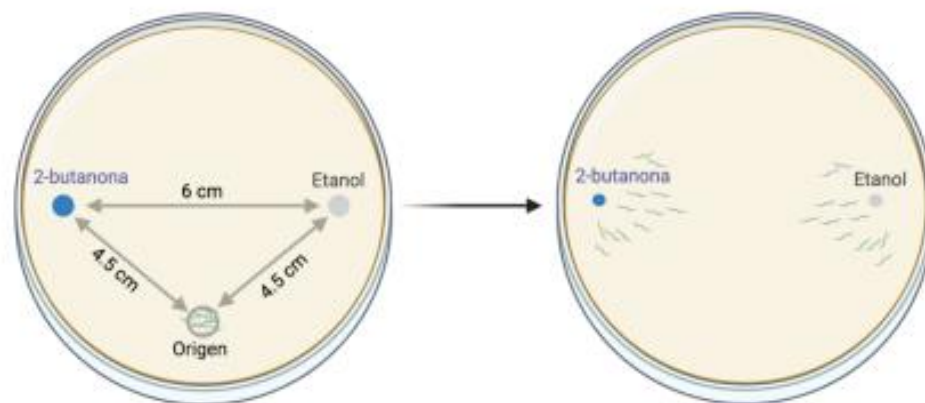


## 9.4 Ensayos de quimiotaxis

Se evaluó el cambio conductual de *C. elegans* mediante ensayos de quimiotaxis, estos se llevan a cabo en cajas de 100 mm sin bacteria por triplicado para cada una de las condiciones. El punto de origen es el vértice central de un triángulo isósceles como se muestra en la figura 7, por otra parte, en uno de los vértices restantes se adiciona 1  $\mu\text{L}$  de 2-butanona al 0.01 % o 0.1 %, mientras que en el otro vértice se añade 1  $\mu\text{L}$  de etanol, ya que este es el vehículo de la 2-butanona.

Para facilitar el conteo de los nemátodos, en los vértices donde están los odorantes, se añade azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), ya que éste es un compuesto anestésico, ya que inhibe el complejo IV de la cadena transportadora de electrones, impidiendo la síntesis de ATP que es esencial para el movimiento (Sulston y Hodkin, 1988; Stannard y Horecker, 1947).

Para realizar este ensayo, los gusanos deben estar en su etapa de adulto joven, estos fueron recolectados y lavados cuidadosamente con M9 para eliminar el exceso de bacteria, se colocaron entre 100 a 300 gusanos en el punto de origen, el excedente de M9 se seca con papel absorbente y se deja que los gusanos migren a cualquiera de los odorantes, lo que aproximadamente tiene una duración de 2 h (ver Fig. 7).



**Figura 7. Ensayo de quimiotaxis a butanona.** En cajas de 100 mm con agar, de lado izquierdo se añade el odorante 2-butanona, el cual está diluido en etanol, del lado derecho se adiciona etanol (vehículo), además ambos lados tienen azida de sodio para paralizar a los gusanos una vez que migran. En el punto de origen se colocan los gusanos cuidadosamente (Pinta, 2022).

Transcurridas 2 h, contamos los gusanos que migraron hacia la 2-butanona, al EtOH y los que no eligieron ningún odorante, estos últimos forman parte del total de gusanos. El cambio conductual se grafica en términos de Cambio Relativo, el cual es calculado a partir del Índice de Quimiotaxis (IQx) como se muestra a continuación en las siguientes ecuaciones:

$$\text{Índice de Quimiotaxis (IQx)} = \frac{\# \text{gusanos en butanona} - \# \text{gusanos en etanol}}{\# \text{total de gusanos}}$$

$$\text{Cambio Relativo} = \frac{IQx \text{ del tratamiento} - IQx \text{ promedio del control}}{|IQx \text{ promedio del control}|}$$

En conjunto con lo anterior, a mayor Cambio Relativo, mayor es la preferencia por el odorante 2-Butanona y viceversa.

## 9.5 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa a partir del protocolo "Bleach Gel", el cual es una variación del protocolo convencional de electroforesis en gel de agarosa, cuya principal diferencia es el uso de cloro comercial, esto con el fin de inhibir RNAsas y evitar la degradación del RNA. La preparación del gel se observa en la Tabla 2. Posteriormente observamos el gel en un transiluminador para determinar la integridad del RNA extraído como se indica en el protocolo de electroforesis de RNA de Evrogen Technologies

**Tabla 2. Protocolo de electroforesis en gel de agarosa “Bleach Gel”** (Modificado de: Aranda et al. (2012))

<b>Preparación de “Bleach Gel”</b>
1. Añadir agarosa al buffer TAE 1x para obtener una concentración final de 1 % m/V
2. Añadir cloro comercial hasta obtener una concentración final de 1 % V/V, incubar por 5 min a temperatura ambiente y agitar ocasionalmente
3. Calentar la suspensión para disolver la agarosa
4. Dejar enfriar y adicionar 6 µL de Gel Green, para la tinción de los ácidos nucleicos.
5. Servir en el molde del gel y dejar que solidifique y colocar en la cámara de electroforesis, esta debe estar llena con buffer TAE 1x
<b>Carga y corrida de muestras de RNA</b>
6. Cargar las muestras de RNA previamente mezcladas con buffer de carga
7. Correr a 100 V durante aproximadamente 35 min

## 9.6 Análisis estadísticos

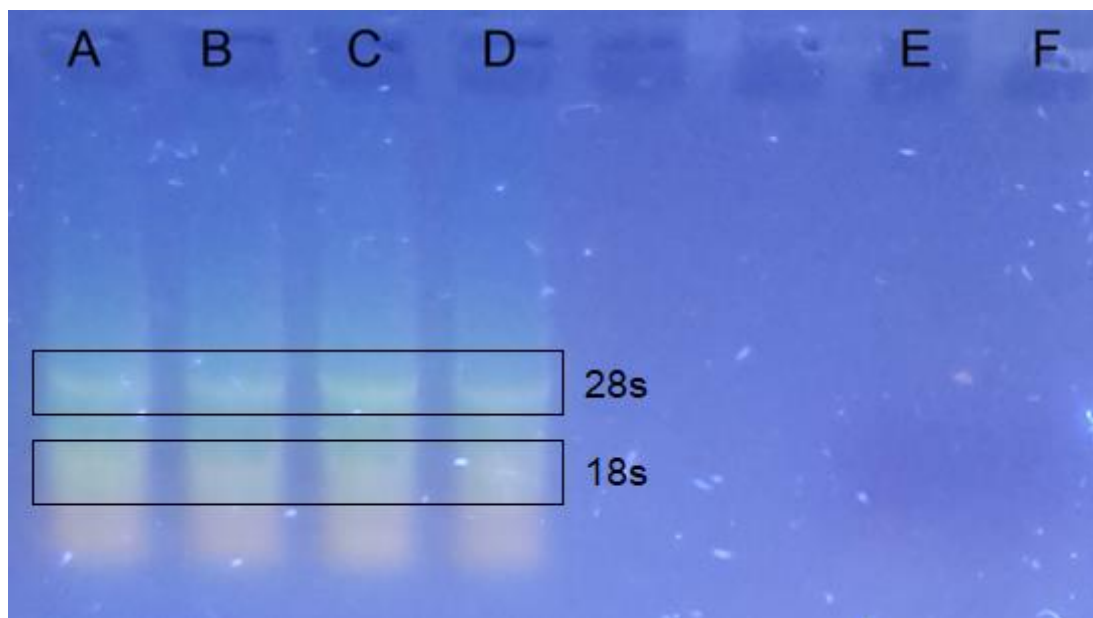
Los datos obtenidos fueron graficados y analizados con GraphPad Prism 7. Para comprobar la significancia, se realizó *t* de Student, considerando  $p < 0.05$  como prueba estadísticamente significativa.

## 10. Resultados

### 10.1 Integridad del RNA exógeno

Para evaluar el efecto de RNA exógeno sobre la conducta en *C. elegans*, decidimos utilizar RNA de mamífero, en particular de cerebro de rata que se encontraba almacenado en EtOH previo a su purificación y cuantificación. El primer paso fue evaluar la integridad de dos lotes distintos de RNA total extraídos en distintas fechas, esto con el objetivo de definir si este RNA era adecuado y confiable para su uso durante los experimentos de exposición, sin embargo, solo utilizamos un lote para los experimentos de exposición.

Para corroborar la integridad del RNA de cerebro de rata, este se corrió en un gel de agarosa (Figura 8). En los carriles A y B observamos bandas características de los RNAs ribosomales (rRNA 28s y 18s) y los mensajeros (mRNA), lo cual nos indica que la integridad del RNA es adecuada para realizar ensayos de exposición a RNA exógeno. Para corroborar la integridad y pureza de nuestras muestras de RNA, uno de nuestros controles fue usar durante el ensayo de exposición a RNA exógeno un tratamiento con DNasa I, estos fueron cargados en los carriles C y D donde podemos apreciar que el RNA no es afectado por este tratamiento ya que observamos las bandas de rRNA, así como la distribución de mRNA a lo largo de los carriles (Fig. 8). El último de los controles fue cargado en los carriles E y F, este consistía en tratar el RNA total con RNasa A, donde observamos que no hay ninguna señal, por lo tanto, el tratamiento con RNasa fue efectivo (Fig. 8). Lo anterior corrobora la presencia de RNA e indica que **la integridad del RNA extraído no fue comprometida y puede ser utilizado para posteriores ensayos de exposición en *C. elegans*.**



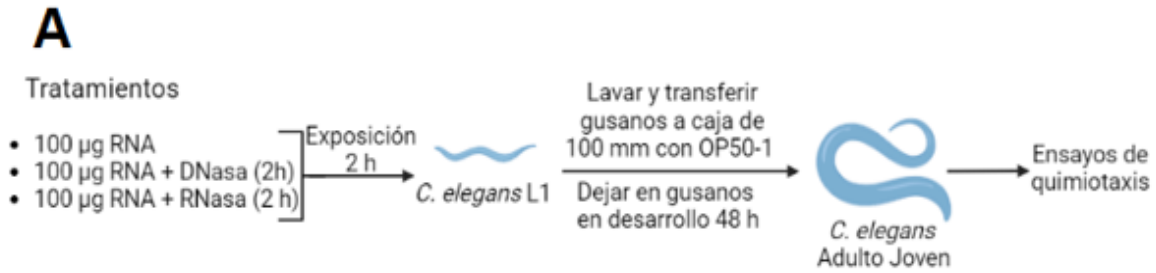
**Figura 8. Integridad del RNA exógeno.** RNA total fue extraído con la técnica de Trizol a partir de cerebro de rata y 2  $\mu$ g fueron corridos en un gel de agarosa al 1 %. Los carriles A (Lote 1) y B (Lote 2) fueron cargados con RNA de dos muestras distintas donde podemos observar las dos bandas características de las subunidades 28s y 18s de rRNA, así como RNA mensajeros

(mRNA) a lo largo de los carriles. Los carriles C(Lote 1) y D (Lote 2) fueron cargados después de un tratamiento de 1 h con DNasa I, de igual forma podemos apreciar ambas bandas de las subunidades de rRNA y mRNA. Finalmente, en los carriles E (Lote 1) y F (Lote 2) no apreciamos ninguna banda debido a que el RNA recibió un tratamiento con RNasa A de 1 h previo a cargarlo en el gel. El gel fue teñido con GelGreen. Lote 1 ( $A_{260}/A_{280} = 2.03$ ) y Lote 2 ( $A_{260}/A_{280} = 2.01$ ), la relación de absorbancia 260/280 de ambos lotes indican que el RNA extraído tiene buena pureza.

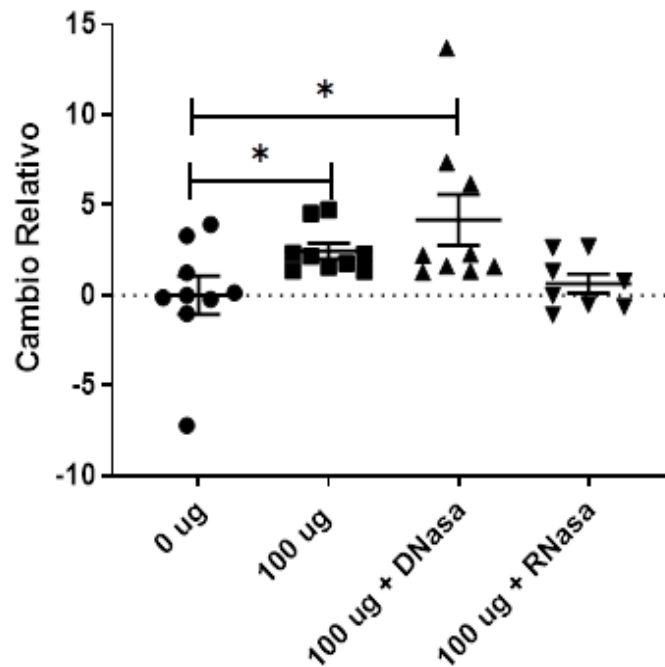
## **10.2 La exposición ambiental a RNA exógeno induce un aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona en *C. elegans***

Una vez que corroboramos que el RNA que extrajimos tiene una integridad adecuada para su uso, procedimos a evaluar si el exponer a *C. elegans* a este RNA exógeno tenía consecuencias en su comportamiento. Para esto expusimos a *C. elegans* en etapa larvaria L1 a RNA (Figura 9A) y realizamos ensayos de quimiotaxis la preferencia al odorante 2-Butanona. Como ya mencionamos, en *C. elegans* diversos estímulos ambientales pueden inducir cambios en la preferencia a los odorantes (Parida et al., 2014; Shimizu et al., 2019; Yoshida et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron que la preferencia al odorante 2-Butanona aumenta de forma significativa después de haber expuesto a los gusanos al RNA exógeno en comparación con los que no fueron expuestos a este (Fig. 9B). Para corroborar si podemos atribuirle al RNA este aumento en la preferencia por la 2-Butanona, realizamos dos tratamientos distintos al RNA: una fracción fue tratada con DNasa I y otra con RNasa A. Observamos que el aumento en la preferencia a la 2-Butanona a una concentración de 0.1 y 0.01% se mantiene en la condición con DNasa de forma significativa, sin embargo, este aumento no se presenta al tratar el RNA con RNasa (Fig.9B). **Por lo tanto, podemos concluir que el cambio en la preferencia al odorante 2-Butanona es inducido por la exposición al RNA exógeno.**



**B** Exposición a RNA exógeno



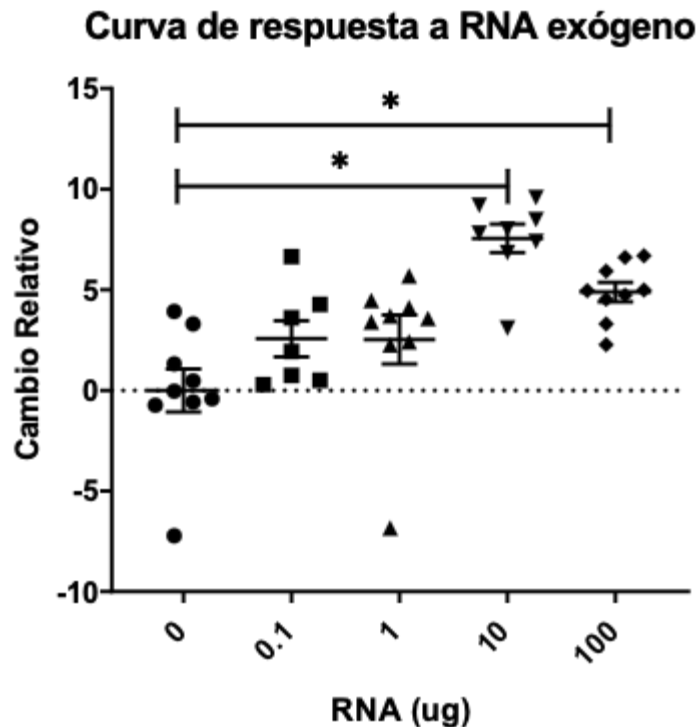
**Figura 9. Cambio en la preferencia al odorante 2-Butanona. A:** Esquema de exposición a RNA exógeno. **B:** Evaluación de quimiotaxis por el odorante 2-butanona. Los ensayos de quimiotaxis a 2-Butanona se realizaron simultáneamente para las cuatro condiciones de exposición a RNA exógeno en la cepa silvestre N2. Los tratamientos con DNasa y RNasa se incubaron durante 2 horas a 37 °C previo a la exposición. Cada punto representa un ensayo de quimiotaxis con N =3, a su vez cada N cuenta con 2 a 3 réplicas cada una con por lo menos 100 animales. La prueba estadística realizada fue t de Student donde comparamos cada tratamiento con el control de 0 µg. Se considera que hubo diferencias significativas entre dos condiciones si  $p < 0.05$  (\*).

### **10.3 El aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona depende de la cantidad de RNA exógeno**

Después de comprobar que el RNA exógeno induce un aumento en la preferencia de 2-Butanona, procedimos a determinar si este aumento en la preferencia es dependiente de la cantidad de RNA, es decir, si es un efecto dosis-dependiente.

Para esto realizamos la exposición a RNA exógeno ambiental en *C. elegans* a distintas concentraciones donde observamos un ligero aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona cuando los gusanos son expuestos a cantidades de 0.1 y 1  $\mu\text{g}$  de RNA, sin embargo, este aumento no es significativo ( $p = 0.0977$  y  $p = 0.1379$  respectivamente) (Fig. 10). Por otra parte, cuando exponemos a los nematodos a cantidades más altas de RNA, como lo son 10 y 100  $\mu\text{g}$ , la preferencia a la 2-Butanona aumenta de forma significativa, mostrando incluso un pico más alto de respuesta para la cantidad de 10  $\mu\text{g}$  de RNA exógeno (Fig. 10). A su vez podemos observar una tendencia directamente proporcional entre la cantidad de RNA contra el aumento en la preferencia por el odorante, sin embargo, esta tendencia se pierde en 100  $\mu\text{g}$  (Fig. 10).

**De este experimento concluimos que el cambio en la preferencia por la 2-Butanona es dependiente de la cantidad de RNA exógeno a la que *C. elegans* es expuesto.** Además, determinamos que la cantidad idónea de RNA para futuros experimentos es de 10  $\mu\text{g}$ , ya que representa el pico más alto de respuesta y podemos realizar múltiples experimentos con menor cantidad de RNA.



**Figura 10. El cambio en la preferencia por la 2-Butanona es dosis-dependiente al RNA exógeno.** Expusimos a los nematodos en etapa L1 durante 2 h a distintas cantidades de RNA, todas resuspendidas hasta un volumen final de 20  $\mu$ L. Realizamos los ensayos de quimiotaxis a 2-Butanona simultáneamente en una cepa silvestre N2. Cada punto representa un ensayo de quimiotaxis con N =3, a su vez cada N cuenta con 2 a 3 réplicas cada una con por lo menos 100 animales. Realizamos una t de Student como prueba estadística, donde comparamos cada tratamiento con el control de 0  $\mu$ g, Se considera que hubo diferencias significativas entre dos condiciones si  $p < 0.05$  (\*).

#### **10.4 La exposición a RNA exógeno requiere de SID-1, SID-2 y NRDE-3 para el aumento en la preferencia a 2-Butanona**

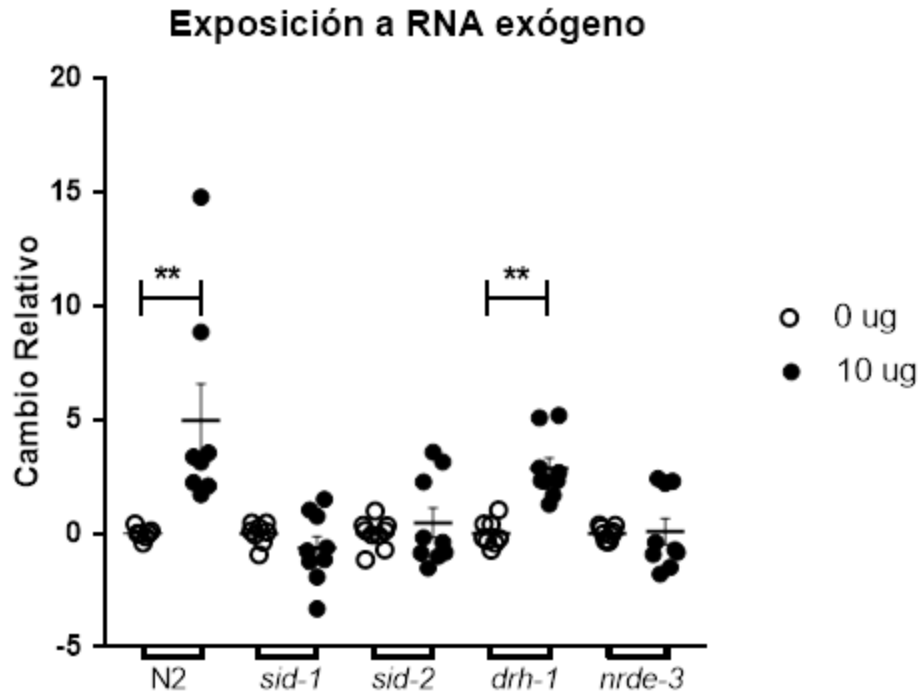
Una vez que optimizamos la cantidad de RNA exógeno adecuado para los siguientes experimentos, nuestro siguiente objetivo fue determinar si vías de procesamiento de RNA están involucradas en el aumento de la preferencia por la 2-Butanona. Nuestros candidatos fueron proteínas involucradas en el proceso de RNAi. Inicialmente seleccionamos a los transportadores SID-1 y SID-2, que como ya



describimos, participan en la distribución sistémica y captura intestinal del dsRNA respectivamente. También evaluamos a DRH-1 que además de estar implicada en el RNAi, es capaz de reconocer RNA de replicación viral de forma citosólica. Por último, investigamos la participación de NRDE-3, una proteína argonauta cuya función más destacada es translocarse al núcleo para el silenciamiento génico.

Nuestros experimentos demostraron que tanto SID-1 como SID-2 son necesarios para que ocurra un aumento en la preferencia por la 2-Butanona posterior a la exposición a RNA ya que cepas mutantes de estas dos proteínas, NL3321 (*sid-1*) y HC271 (*sid-2*), no presentan aumento en la preferencia por la 2-Butanona después de la exposición al RNA exógeno. Estos resultados sugieren que se requiere de ambas proteínas para que ocurra este aumento en la quimiotaxis a 2-Butanona mediada por RNA exógeno (Fig. 11). Por otra parte, observamos que la cepa mutante de DRH-1, RB2519 (*drh-1*), sí presenta un aumento significativo en la preferencia por la 2-Butanona, esto indica que, al menos en nuestras condiciones experimentales, no es necesario DRH-1 para que ocurra un cambio en la preferencia por el odorante 2-Butanona después de una exposición al RNA exógeno (Fig. 11). Finalmente, la cepa carente de la proteína argonauta NRDE-3 (YY158), no presenta un aumento en la preferencia por 2-Butanona post-exposición al RNA, evidenciando así que esta proteína también es indispensable para que ocurra este cambio en la preferencia por el odorante 2-Butanona (Fig. 11).

De los resultados anteriores podemos concluir que **múltiples vías del procesamiento del RNA están implicadas en el aumento de la preferencia por 2-Butanona, específicamente SID-1, SID-2 y NRDE-3**; sin embargo, es importante precisar que otras vías podrían estar involucradas en este cambio de la preferencia a odorantes mediada por RNA exógeno.



**Figura 11. El aumento en la preferencia por 2-Butanona está mediado por múltiples vías del procesamiento del RNA.** Empleamos la cepa silvestre N2 y cuatro cepas mutantes de distintas vías del procesamiento del RNA: NL3321 (*sid-1*), HC271 (*sid-2*), RB2519 (*drh-1*) y YY158 (*nrde-3*). Todas las cepas cuentan con un control que no fue expuesto al RNA, mientras que los tratamientos fueron realizados con 10  $\mu$ g de RNA exógeno resuspendido en un volumen final de 20  $\mu$ L durante 2 h. Se llevaron a cabo ensayos de quimiotaxis simultáneos al odorante 2-Butanona para las 5 cepas. Cada punto representa un ensayo de quimiotaxis con N =3 con por lo menos 100 individuos. A su vez cada N cuenta con 2 a 3 réplicas, realizamos una t de Student como prueba estadística, donde comparamos cada tratamiento con el control de 0  $\mu$ g. Se considera que hubo diferencias significativas entre dos condiciones si  $p < 0.05$  (\*).

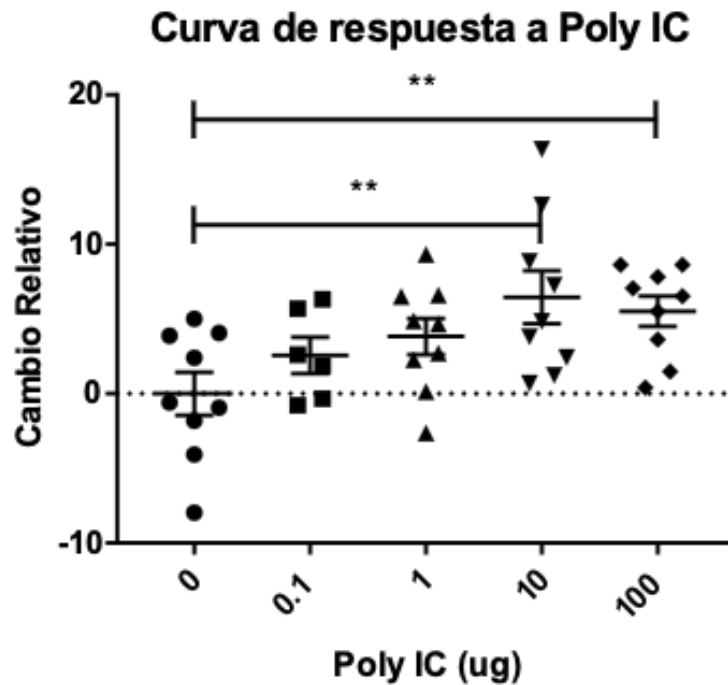
### 10.5 La exposición a Poly I:C induce un aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona en *C. elegans*

Es relevante mencionar que los Receptores tipo Toll o TLRs por sus siglas en inglés, forman parte de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs). Estos receptores son proteínas integrales de membrana encargados del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs. En *C. elegans* se sabe poco

sobre estos receptores, sin embargo, se ha demostrado que TOL-1 es requerido para prevenir una infección bacteriana por *Salmonella enterica* en la faringe, a su vez se ha comprobado que se requiere de TOL-1 en neuronas BAG para inducir una conducta de aversión a *Serratia marcescens* (Brandt & Ringstad, 2015; Crespo-Lessmann et al., 2010; Tenor & Aballay, 2008).

Con base en lo anterior y los resultados obtenidos, nos planteamos como objetivo determinar si el cambio en la preferencia a 2-Butanona es mediado por secuencias específicas de RNA o si es por un reconocimiento estructural. Para esto empleamos ácido poliinosínico:policitidílico, mejor conocido como Poly I:C. Este es un polímero sintético de ácido inosínico y ácido citidílico, capaz de formar una estructura similar a un dsRNA mediante puentes de hidrógeno. El Poly I:C actúa como ligando de los receptores TLR-3 de mamíferos, es usado como adyuvante en vacunas y tratamientos antitumorales (Chen et al., 2020; Ngoi et al., 2008).

Nuestros resultados **al exponer a nematodos a Poly I:C** mostraron que **hay un aumento significativo en la preferencia por la 2-Butanona cuando los gusanos son expuestos a 10 y 100 µg de este compuesto** (Fig. 12). **De igual forma podemos observar una tendencia directamente proporcional entre la cantidad de Poly I:C y el Cambio Relativo, o sea la preferencia por el odorante** (Fig. 12), lo cual nos indica que la respuesta es dosis-dependiente de la exposición a este compuesto.



**Figura 12. El Poly I:C puede promover un aumento en la preferencia por la 2-Butanona.** Expusimos la cepa silvestre N2 de *C. elegans* a distintas concentraciones de Poly I:C resuspendido en agua con un volumen final de 20  $\mu$ L durante 2 h. Los ensayos de quimiotaxis realizados fueron simultáneos. Cada punto representa un ensayo de quimiotaxis con N =3, cada uno con entre 100 y 300 individuos. A su vez cada N cuenta con 2 a 3 réplicas. Realizamos una t de Student como prueba estadística, donde comparamos cada tratamiento con el control de 0  $\mu$ g. Se considera que hubo diferencias significativas entre dos condiciones si  $p < 0.05$  (\*).

## 11. Discusión

Las decisiones conductuales de los organismos se basan en la transmisión de la información del ambiente a través de sistemas sensoriales, esto les permite a los organismos sobrevivir y adaptarse a su entorno, por ejemplo, la interacción entre organismos, la búsqueda de alimento e incluso el reconocimiento y evasión de depredadores o patógenos.

En particular el nemátodo *C. elegans* es capaz de censar una gran cantidad de estímulos ambientales para establecer respuestas diversas que abarcan desde el reconocimiento y preferencia por algunos odorantes hasta la aversión de niveles bajos o

altos de oxígeno. En particular los cambios conductuales demuestran la capacidad de adaptación que posee *C. elegans* para adaptarse a su ecosistema y asegurar su supervivencia, por ejemplo, la exposición a concentraciones altas de glucosa afecta la memoria asociativa al benzaldehído y periodos prolongados de ayuno inducen un aumento en la preferencia por 2-Butanona ( Gutiérrez Chávez et al., 2021; Zurita León et al., 2022).

Otros de los estímulos reportados (Tatematsu et al., 2018) involucran al RNA, molécula intermediaria en la transferencia de información genética de DNA a proteína y que posee funciones regulatorias, como regulación postranscripcional. Su estructura puede ser reconocida extracelularmente como un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs), lo que promueve una respuesta inmunológica innata.

Sin embargo, se sabe poco sobre el efecto que tiene el RNA exógeno ambiental no necesariamente patógeno, sobre la conducta de *C. elegans*. En este trabajo demostramos que la exposición a un RNA exógeno ambiental, en particular el proveniente de tejido de mamífero, puede inducir cambios en la preferencia a odorantes en *C. elegans*.

### **11.1 Consideraciones de nuestro protocolo de exposición a RNA exógeno ambiental**

Antes de discutir sobre las consideraciones de nuestro protocolo, es importante recordar que la electroforesis en gel de agarosa que realizamos indica que la integridad del RNA extraído fue adecuada para su uso durante los experimentos, además el tratamiento con DNasa nos permitió descartar contaminación con DNA genómico y finalmente el tratamiento con RNasa fue totalmente efectivo. Adicionalmente, se usó un lote único de RNA durante los experimentos de exposición a este; los puntos anteriormente mencionados indicarían que los cambios conductuales observados después de la realización de nuestro protocolo son totalmente atribuibles a la exposición a RNA exógeno.

Diseñamos nuestro protocolo de exposición a RNA partiendo del protocolo realizado por Kaletsky et. al, el cual consiste en añadir pequeñas cantidades de bacteria en distintas áreas de la caja Petri formando pequeños céspedes bacterianos, a cada pequeño césped de alimento se le añade 240  $\mu\text{g}$  de RNA bacteriano (Kaletsky et al., 2020). En nuestro caso optimizamos el protocolo reduciendo el área de exposición a un solo pequeño césped bacteriano, lo cual nos permite realizar más réplicas y más condiciones de tratamiento. Otro de nuestros propósitos fue asegurar que todos o por lo menos la gran mayoría de nematodos ya hubieran eclosionado, además de que estos estuvieran expuestos al RNA durante su desarrollo, sin embargo, redujimos el tiempo de exposición a 2 h para minimizar la degradación del RNA. Es importante destacar que el establecimiento de este protocolo de exposición representa una importante aportación dentro del laboratorio para futuros proyectos.

Una alternativa a este protocolo pudo haber sido el “*soaking*”, este es un método para inducir RNAi al sumergir a los nematodos en una solución de dsRNA, sin embargo, consideramos que esta metodología no sería adecuada para nuestros objetivos, ya que los resultados de nuestro laboratorio demostraron que sumergir a los gusanos en una solución salina durante largos periodos de tiempo afecta la conducta de los nemátodos y el aprendizaje (Gutiérrez et al. En preparación). Si bien nuestros objetivos no están relacionados con el aprendizaje, este no deja de formar parte de la conducta por lo que el sumergir a los gusanos durante 2 h en una solución de RNA podría interferir con la preferencia por 2-Butanona como un efecto cruzado o resultado del ayuno (Conte et al., 2015; Laranjeiro et al., 2019).

## **11.2 Consideraciones de la quimiotaxis y efecto conductual por exposición a RNA exógeno ambiental**

Medimos la preferencia por el odorante 2-Butanona en la cepa N2 de *C. elegans* después de una exposición de 2 h a RNA exógeno durante la etapa larvaria L1. Este cambio conductual fue evaluado mediante ensayos de quimiotaxis y posteriormente graficado en términos de Cambio Relativo, sustituyendo el Índice de Quimiotaxis que es comúnmente usado en este tipo de gráficas, donde a mayor Cambio Relativo mayor es

la preferencia por 2-Butanona; el principal motivo de cambiar el Índice de Quimiotaxis por el de Cambio Relativo es amortiguar la variabilidad de respuesta entre réplicas y entre cada N, estableciendo una línea basal de respuesta por el odorante más homogénea y que los cambios conductuales se puedan observar de forma más clara. La variabilidad de respuesta entre cada N y réplicas se debe a la sensibilidad del nematodo por el ambiente, ya sea fluctuaciones de temperatura, humedad y olores; además observamos que después de cierto tiempo de cultivo en el laboratorio, la preferencia basal de los gusanos por la 2-Butanona aumenta. Sospechamos que esto se debe a la manipulación constante de este organismo y al ambiente, que como ya mencionamos, modifica la conducta. Incluso graficando los resultados en términos de Cambio Relativo, hay algunos puntos que presentan dispersión dentro de las gráficas (Fig. 8 y 9), lo cual se explica por lo mencionado sobre la variabilidad. A pesar de la variabilidad dentro de los experimentos, observamos cambios estadísticamente significativos en la preferencia por la 2-Butanona después de la exposición a RNA exógeno.

Recordemos que nuestro protocolo de exposición está basado en el trabajo realizado por Kaletsky et. al, así mismo la cantidad de RNA exógeno que decidimos utilizar fue la misma cantidad de sRNAs bacterianos que utilizaron para el efecto de aversión a PA14, es decir 100  $\mu$ g (Kaletsky et al., 2020). Observamos que el efecto que induce la exposición a RNA exógeno es un claro aumento en la preferencia por la 2-Butanona, por otra parte, cuando realizamos un tratamiento con RNasa a nuestro RNA, el cambio en la preferencia por este odorante desaparece y como control adicional y para descartar algún posible efecto asociado a DNA como consecuencia de una posible contaminación en nuestra alícuota de RNA, realizamos un tratamiento de DNasa y observamos que el aumento de la preferencia por 2-Butanona prevaleció. Estos resultados no solo resaltan la capacidad de *C. elegans* para reconocer el RNA exógeno, sino la universalidad del RNA como molécula para interactuar y modificar la conducta de este organismo a pesar de no estar presente en el mismo ambiente. Lo más sorprendente, es que en nuestro protocolo la exposición a RNA solo ocurre en un periodo de 2h en nemátodos en etapa larvaria L1, y el cambio conductual que genera está exposición a RNA exógeno prevalece hasta la adultez del nematodo a pesar del corto periodo de exposición en una etapa temprana de desarrollo, este fenómeno habla de la

gran capacidad que tiene este organismo para establecer una respuesta contra RNA exógeno no patógeno. Otro punto importante de este aumento en la preferencia por la 2-Butanona, es que solo está ocurriendo cuando el animal es expuesto al RNA íntegro de mamífero, es decir, que los ribonucleótidos formados por el tratamiento con RNasa, por sí mismos no inducen un aumento en la preferencia por el odorante.

### **11.3 El RNA exógeno ambiental induce un aumento en la preferencia al odorante 2-Butanona de forma dosis-dependiente**

Para evaluar si el aumento en la preferencia por 2-Butanona es dosis-dependiente de la cantidad de RNA exógeno a la que son expuestos los gusanos durante el experimento-realizamos una curva dosis-respuesta con distintas cantidades de RNA, de igual manera realizamos ensayos de quimiotaxis para posteriormente graficar los resultados en términos de Cambio Relativo. Nuestras especulaciones fueron ciertas ya que a pesar de observar una relación directamente proporcional entre la preferencia por 2-Butanona y la cantidad de RNA exógeno, obtuvimos un pico de mayor respuesta cuando los gusanos son expuestos a 10  $\mu\text{g}$  de RNA. Por lo tanto, esta es nuestra cantidad óptima de RNA exógeno para observar una mayor respuesta en la preferencia por 2-Butanona.

Es relevante preguntarnos por qué con la cantidad más alta de RNA exógeno (100  $\mu\text{g}$ ) a pesar de observar un aumento estadísticamente significativo en la preferencia por el odorante, la respuesta es menor a la observada en comparación con 10  $\mu\text{g}$  de RNA. Si bien este aumento en la preferencia por 2-Butanona ocurre a 100  $\mu\text{g}$ , este efecto parece ser ligeramente contrarrestado por un fenómeno que desconocemos y que está ligado a esta cantidad de RNA, sin embargo, no ha sido descrito. Creemos que esta respuesta puede ser debido a que los receptores que censan el RNA se saturan y esto podría generar un efecto compensatorio en la preferencia por el odorante, o simplemente que debido a la exposición a cantidades más altas de RNA exógeno, podríamos observar un incremento en la aversión por 2-Butanona.



#### **11.4 Múltiples vías de RNAi están involucradas en el aumento de la preferencia por el odorante 2-Butanona**

Mediante el uso de cepas mutantes que carecen de proteínas que participan en el proceso de RNAi y procesamiento del RNA, determinamos algunas de las vías que son indispensables para que ocurra el aumento en la preferencia por 2-Butanona después de la exposición a RNA exógeno (Fig. 11).

Los resultados de las cepas de gusanos con mutaciones en *sid-1* y *sid-2* indican que no hay cambios en la preferencia por el odorante después de la exposición a RNA. De este resultado podemos interpretar que el RNA exógeno ingresa a las células a través del transportador intestinal SID-2 y se distribuye a otros tejidos a través de SID-1, incluso podríamos inferir que el tipo de RNA involucrado en el aumento de la preferencia por 2-Butanona es dsRNA, debido a que se ha demostrado que SID-2 se encuentra únicamente en la membrana de células intestinales y permite la captura y acumulación de dsRNAs mayores a 25 pb provenientes del lumen intestinal. Sin embargo, también se sabe que SID-2 puede internalizar ssRNAs cuando estos forman estructuras tipo dsRNA (McEwan et al., 2012). En relación con lo anterior, se ha descrito que los dsRNAs internalizados son retenidos en estructuras citoplásmicas, manteniéndose inaccesibles para la maquinaria de RNAi, donde a través de SID-1 son transportados al citosol y/o al pseudoceloma. Adicionalmente, se ha demostrado que SID-1 transporta específicamente dsRNAs (McEwan et al., 2012; Shih & Hunter, 2011). Por lo tanto, podemos concluir que después de la captura del RNA exógeno vía SID-2, este podría ser transportado a otros tejidos a través de SID-1, sin embargo, existe la posibilidad de que SID-1 esté transportando dsRNAs endógenos generados como respuesta a la exposición al RNA exógeno.

Otro de nuestros resultados obtenidos fue mediante el uso de la cepa mutante de *nrde-3*, Esta proteína aparentemente está implicada en el aumento de la preferencia por 2-Butanona después de la exposición a RNA exógeno. Se ha demostrado que en ausencia de siRNAs NRDE-3 se encuentra de forma citosólica, sin embargo, esta se transloca al núcleo cuando se asocia con siRNAs generados a partir de RNA Polimerasas dependientes de RNA (RdPR), además en el núcleo se asocia a otras proteínas e impide

la transcripción de la RNA Polimerasa II, evitando así la elongación del mRNA (Guang et al., 2008; Zhuang et al., 2013). Nuestro resultado sugiere que hay siRNAs amplificándose para el establecimiento conductual, que es el aumento en la preferencia por 2-Butanona, sin embargo, desconocemos si estos siRNAs provienen directamente del RNA de mamífero o si son parte de una cascada de señalización río abajo como consecuencia de la captura del RNA exógeno.

A diferencia de los resultados anteriores, la cepa mutante de *drh-1*, indica que no es indispensable la proteína DRH-1 para que ocurra el aumento en la preferencia por el odorante. Sabemos que la proteína DRH-1 es una proteína homóloga de RIG-I y promueve la defensa antiviral contra el virus de Orsay, a través de mecanismos de RNAi (Guo et al., 2013; Sowa et al., 2020). Esto concuerda con nuestros resultados, ya que el origen de nuestro RNA no es viral, aunque esperábamos observar cierta participación de DRH-1, ya que el RNA de mamífero al ser un RNA desconocido por *C. elegans* podría promover el despliegue de mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica innata, sin embargo, esto no ocurre y DRH-1 parece estar exclusivamente ligado a la respuesta antiviral.

Es importante mencionar que el RNA de mamífero que obtuvimos, contiene todo tipo de RNAs, tales como RNA ribosomal, mRNAs, tRNAs, ncRNAs, etc. Nuestros resultados sugieren que el tipo de RNA responsable del aumento en la preferencia por 2-Butanona es de tipo dsRNA, sin embargo, no podemos atribuirle el aumento en la preferencia únicamente a este RNA sin evidencias más sólidas como puede ser el aislamiento y exposición a dsRNA debido a que como ya mencioné, se ha demostrado en el reciente trabajo de Fernandes De Abreu et al. que el tRNA de Alanina tiene un papel importante en la regulación de la quimioatracción. En este trabajo observaron que los gusanos adquieren impronta olfatoria después de ser alimentados con tRNAs de alanina de gusanos que sí adquirieron impronta olfatoria. La impronta olfatoria es el proceso por el cual un animal expuesto a señales olfatorias durante un intervalo de tiempo definido adquiere una memoria permanente por esas señales. (Fernandes De Abreu et al., 2020; Remy & Hobert, 2005).

Estos resultados demuestran lo involucrado que está el proceso de RNAi con lo que parece ser una respuesta inmunitaria innata y como esto se ve reflejado en el cambio conductual de *C. elegans* a través de la preferencia por el odorante 2-Butanona, Foster et al. demostraron que OLRN-1, que es una proteína involucrada en programar la expresión de receptores de odorantes en neuronas AWC, regula la respuesta inmunológica en intestino (Foster et al., 2020), por lo cual sería pertinente conocer su participación en el aumento de la preferencia por 2-Butanona después de la exposición a RNA exógeno, ya que este odorante es detectado en neuronas AWC.

### **11.5 Efecto de la estructura del dsRNA en la preferencia por 2-Butanona**

Finalmente, nuestro último resultado indica que la exposición al ácido poliinosínico:policitidílico o Poly I:C en una cepa silvestre de *C. elegans* también induce un aumento en la preferencia por la 2-Butanona. Adicionalmente, caracterizamos que hay una relación directamente proporcional entre la cantidad de Poly I:C a la que los gusanos fueron expuestos y la preferencia por 2-Butanona, lo cual indica que la preferencia por este odorante es un efecto dosis-dependiente de Poly I:C, como ocurre con el RNA exógeno

Recordemos que el Poly I:C es un dsRNA sintético que actúa como ligando de los receptores TLR-3 en mamíferos y es empleado como adyuvante en vacunas y tratamientos antitumorales (Chen et al., 2020; Ngoi et al., 2008). Sin embargo, *C. elegans* no expresa TLR-3, sino TOL-1 que es un homólogo de los TLRs de mamíferos. Podríamos inferir que TOL-1 es necesario para el establecimiento conductual en el aumento de la preferencia por el odorante después de la exposición a Poly I:C, sin embargo, nuestros resultados no nos permiten aseverar esto con certeza, por lo tanto, consideramos que es pertinente realizar experimentos de exposición a Poly I:C en mutantes *tol-1* para confirmar si el Poly I:C actúa de forma dependiente o independiente de la vía de TOL-1 al promover un aumento en la preferencia por el odorante. Por otra parte, se ha descrito que TOL-1 participa en el establecimiento de la conducta de aversión contra patógenos y para una adecuada inmunidad innata contra algunas bacterias Gram-negativo (Brandt & Ringstad, 2015; Tenor & Aballay, 2008).

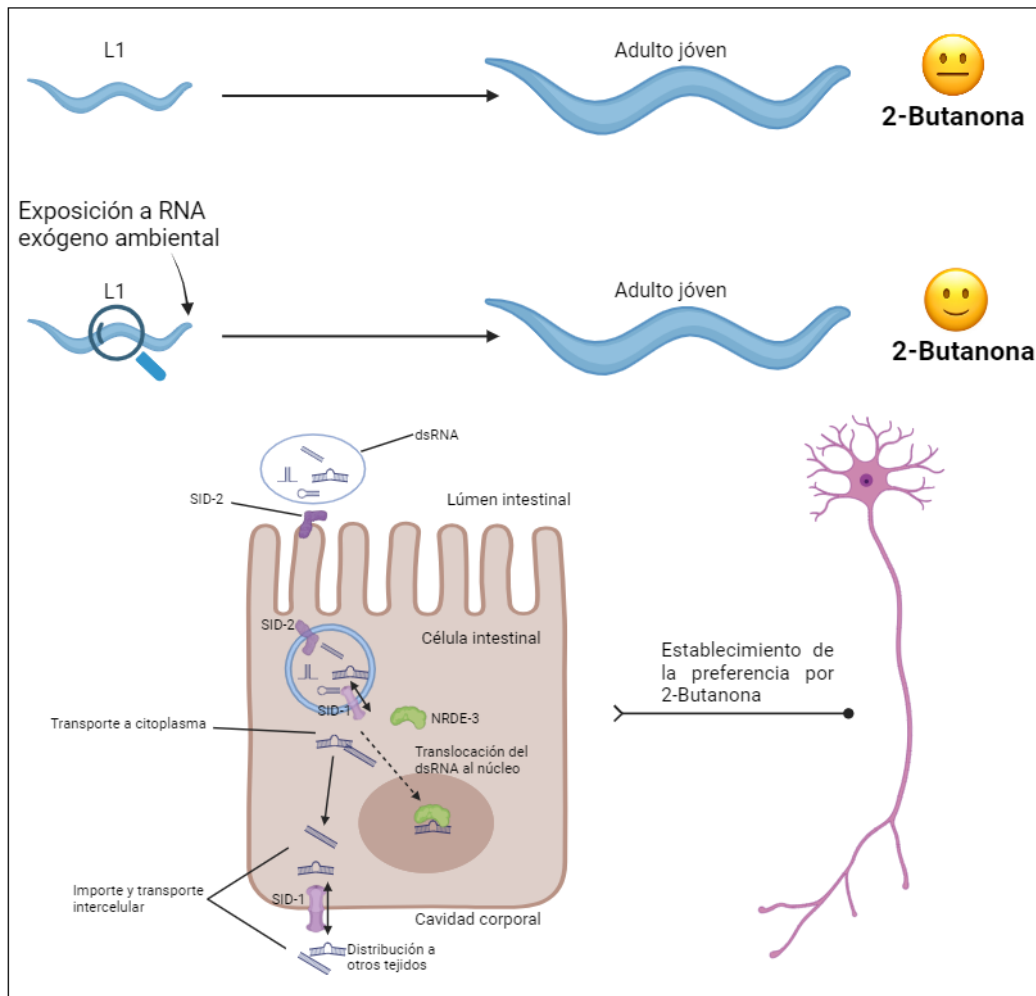
Como ya mencionamos el Poly I:C asemeja la estructura de un dsRNA, por lo tanto, creemos que el aumento de la preferencia por 2-Butanona se debe a la propia estructura de este compuesto y no a una secuencia específica, lo cual estaría más asociado a una respuesta inmunitaria innata. Además, esto nos hace pensar que el RNA exógeno responsable de la modificación en la preferencia por el odorante es de tipo dsRNA, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que exista una secuencia específica dentro del RNA de mamífero que esté involucrada en este cambio conductual.

Finalmente, los antecedentes expuestos en esta tesis en conjunto con nuestros resultados indican que el RNA exógeno ambiental no patógeno contribuye en gran medida a la modificación conductual de *C. elegans*, lo cual nos parece algo sorprendente, debido a que constantemente los organismos (incluyendo a *C. elegans*), están expuestos a RNA ambiental y esto nos orilla a pensar que el RNA regula la conducta y sus modificaciones. Adicionalmente, este fenómeno podría estar involucrado en la respuesta inmunitaria innata, por ejemplo, diversos estudios en humanos demostraron que la exposición experimental a la endotoxina LPS (lipopolisacárido) provoca un incremento en la sensación de soledad, a diferencia de esto, se ha reportado que el tratamiento con LPS en humanos, provoca a los participantes un mayor deseo de conexión social (Devlin et al., 2021). Es importante mencionar que esta toxina actúa sobre receptores TLR-4, ocasionando un incremento de interleucinas y citocinas proinflamatorias tanto de forma periférica como central en regiones cerebrales específicas. En resumen, los antecedentes ya mencionados indican que además de lo compleja que es la conducta, esta puede cambiar en diversas direcciones y que estos cambios conductuales son cruciales para una respuesta óptima contra la enfermedad (Kopeck et al., 2019). En relación con lo anterior, podríamos hipotetizar que el RNA patógeno puede estar involucrado en los cambios conductuales ocasionados por la respuesta inmunitaria innata, que al ser reconocido por TLRs, se despliega una cascada de señalización innata contra el patógeno que podría conducir a una modificación conductual, sin embargo, esto no ha sido demostrado.

## 12. Conclusiones

1. La preferencia de *C. elegans* por el odorante 2-Butanona aumenta después de la exposición ambiental a RNA exógeno.
2. La preferencia de *C. elegans* por el odorante 2- Butanona es dependiente de la cantidad de RNA exógeno durante la exposición.
3. Las proteínas SID-1, SID-2 y NRDE-3 son indispensables para el establecimiento de la preferencia al odorante 2-Butanona en *C. elegans* después de la exposición a RNA exógeno.
4. La exposición al compuesto Poly I:C induce un aumento en la preferencia de *C. elegans* por la 2-Butanona.

### 13. Resumen gráfico



### 14. Perspectivas

A pesar de haber evaluado la preferencia en diversas cepas mutantes asociadas al proceso de RNAi, consideramos que sería interesante realizar lo mismo usando otras cepas involucradas ya sea en el procesamiento del RNA, factores de transcripción, conducta, etc. Además, consideramos importante realizar ensayos de exposición a Poly I:C en las cepas mutantes que usamos para este trabajo y considerar algunos otros candidatos que pudieran estar involucrados en este cambio conductual. En relación con lo anterior, consideramos que es importante realizar un screening genético *de novo*, esto

nos da mayor alcance para identificar las vías involucradas en el establecimiento de la conducta de interés, al generar mutaciones aleatorias puntuales por sustitución de nucleótidos usando como mutágeno metanosulfonato de etilo.

Es relevante también identificar con certeza qué tipo de RNA es el responsable del aumento en la preferencia por 2-Butanona, hasta ahora consideramos que la fracción de dsRNAs podría ser la responsable de nuestro efecto de interés, sin embargo, no podemos descartar otros tipos de RNA. Si lográramos identificar qué tipo de RNA está involucrado en la respuesta de preferencia, podríamos pensar que hay una secuencia específica de RNA detrás de este mecanismo.

Otro aspecto importante para evaluar es conocer si este cambio conductual ocurre únicamente en la etapa larvaria L1 o si puede establecerse en otras etapas de desarrollo de *C. elegans*. Adicionalmente nos gustaría saber si el RNA también modifica la preferencia a otros odorantes como puede ser el benzaldehído, octanol, alcohol isoamílico, etc. Es relevante mencionar que emplearíamos el protocolo de exposición que desarrollamos para evaluar la preferencia a estos odorantes.

Finalmente, en este trabajo utilizamos solo RNA de mamífero como fuente de RNA exógeno, pero sería relevante evaluar si RNA purificado de *C. elegans* induce el mismo cambio conductual a 2-butanona, otros odorantes u otras conductas. Incluso sería relevante evaluar si RNA purificado de nemátodos donde ya se estableció un cambio conductual inducen conductas distintas en los nemátodos expuestos.

## 15. Referencias

- Agarose Gel Electrophoresis of RNA - MX. (s. f.). Recuperado 14 de mayo de 2023, de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/protocols/nucleic-acid-purification-and-analysis/rna-protocol/agarose-gel-electrophoresis-of-rna.html>
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Pericellular structures. In WormAtlas. doi:10.3908/wormatlas.1.20
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Ashe, A., BÉlicard, T., Le Pen, J., Sarkies, P., Frézal, L., Lehrbach, N. J., Félix, M. A., & Miska, E. A. (2013). A deletion polymorphism in the *Caenorhabditis elegans* RIG-I homolog
- Bargmann, C. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>
- Bargmann, C. I., & Horvitz, H. R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron*, 7(5), 729–742. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90276-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90276-6)
- Bargmann, C. I., Hartweg, E., & Horvitz, H. R. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell*, 74(3), 515-527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-H](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-H)
- Billi, A. C., Fischer, S. E., & Kim, J. K. (2014). Endogenous RNAi pathways in *C. elegans*. WormBook: the online review of *C. elegans* biology, 1–49. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.170.1>
- Brandt, J. P., & Ringstad, N. (2015). Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior. *Current Biology*, 25(17), 2228-2237. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.037>
- Braukmann, F., Jordan, D., & Miska, E. (2017). Artificial and natural RNA interactions between bacteria and *C. elegans*. *RNA Biology*, 14(4), 415-420. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1297912>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Burkhart, K. B., Guang, S., Buckley, B. A., Wong, L., Bochner, A. F., & Kennedy, S. (2011). A pre-mRNA-associating factor links endogenous siRNAs to chromatin regulation. *PLoS genetics*, 7(8), e1002249. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002249>



- Chen, E., Chen, C., Niu, Z., Gan, L., Wang, Q., Li, M., Cai, X., Gao, R., Katakam, S., Chen, H., Zhang, S., Zhou, R., Cheng, X., Qiu, Y., Yu, H., Zhu, T., & Liu, J. (2020). Poly(I:C) preconditioning protects the heart against myocardial ischemia/reperfusion injury through TLR3/PI3K/Akt-dependent pathway. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00257-w>
- Cho, S. K., Ryu, M. Y., Shah, P., Poulsen, C. P., & Yang, S. W. (2016). Post-Translational Regulation of miRNA Pathway Components, AGO1 and HYL1, in Plants. *Molecules and Cells*, 39(8), 581-586. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0085>
- Colbert, H. A., & Bargmann, C. I. (1997). Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 4(2), 179-191. <https://doi.org/10.1101/lm.4.2.179>
- Conte, D., MacNeil, L. T., Walhout, A. J. M., & Mello, C. C. (2015). RNA Interference in *Caenorhabditis Elegans*. *Current protocols in molecular biology*, 109, 26.3.1-26.330. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2603s109>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Crespo-Lessmann, A., Juárez-Rubio, C., & Plaza-Moral, V. (2010). Papel de los receptores toll-like en las enfermedades respiratorias. *Archivos De Bronconeumologia*, 46(3), 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2009.07.011>
- Devlin, B. A., Smith, C. J., & Bilbo, S. D. (2021). Sickness and the Social Brain: How the Immune System Regulates Behavior across Species. *Brain Behavior and Evolution*, 97(3-4), 197-210. <https://doi.org/10.1159/000521476>
- Evrogen Technologies: RNA electrophoresis protocol. (s. f.). Recuperado 25 de abril de 2023, de <https://evrogen.com/technologies/RNA-electrophoresis.shtml>
- Fernandes De Abreu, D. A., Salinas-Giegé, T., Drouard, L., & Remy, J.-J. (2020). Alanine tRNAs Translate Environment Into Behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 571359. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.571359>
- Foster, K. J., Cheesman, H. K., Liu, P., Peterson, N. D., Anderson, S. M., & Pukkila-Worley, R. (2020). Innate Immunity in the *C. elegans* Intestine Is Programmed by a Neuronal Regulator of AWC

Olfactory Neuron Development. Cell Reports, 31(1), 107478.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.042>

Grishok, A. (2005). RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*. FEBS Letters, 579(26), 5932-5939.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.001>

Guang, S., Bochner, A. F., Pavelec, D. M., Burkhart, K. B., Harding, S., Lachowiec, J., & Kennedy, S. (2008). An Argonaute Transports siRNAs from the Cytoplasm to the Nucleus. Science, 321(5888), 537-541. <https://doi.org/10.1126/science.1157647>

Guang, S., Bochner, A. F., Burkhart, K. B., Burton, N., Pavelec, D. M., & Kennedy, S. (2010). Small regulatory RNAs inhibit RNA polymerase II during the elongation phase of transcription. Nature, 465(7301), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nature09095>

Guo, X., Zhang, R., Wang, J., Ding, S.-W., & Lu, R. (2013). Homologous RIG-I-like helicase proteins direct RNAi-mediated antiviral immunity in *C. elegans* by distinct mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(40), 16085-16090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307453110>

Gutiérrez Chávez L. G. (2021) Determinación de mecanismos regulatorios en la conducta por periodos prolongados de ayuno en *C. elegans* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2021/junio/0813114/Index.html>

Hall, D. H. (2017). Gap junctions in *C. elegans*: Their roles in behavior and development: Gap Junctions in *C. elegans*. Developmental Neurobiology, 77(5), 587-596. <https://doi.org/10.1002/dneu.22408>

Hart, A. (2006). Behavior. WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.87.1>

Hermaphrodite—Nervous System—General Overview. (s. f.). Recuperado 21 de junio de 2023, de <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/nervous/Neuroframeset.html>

Hobert, O. (2003). Behavioral plasticity in *C. elegans*: Paradigms, circuits, genes. Journal of Neurobiology, 54(1), 203-223. <https://doi.org/10.1002/neu.10168>

Juang, B.-T., Gu, C., Starnes, L., Palladino, F., Goga, A., Kennedy, S., & L'Etoile, N. D. (2013). Endogenous Nuclear RNAi Mediates Behavioral Adaptation to Odor. Cell, 154(5), 1010-1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.006>

Kaletsky, R., Moore, R. S., Vrla, G. D., Parsons, L. R., Gitai, Z., & Murphy, C. T. (2020). *C. elegans* interprets bacterial non-coding RNAs to learn pathogenic avoidance. Nature, 586(7829), 445-451. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2699-5>

- Kopec, A. M., Smith, C. J., & Bilbo, S. D. (2019). Neuro-Immune mechanisms regulating social behavior: Dopamine as mediator? *Trends in neurosciences*, 42(5), 337-348. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.02.005>
- Laranjeiro, R., Harinath, G., Hewitt, J. E., Hartman, J. H., Royal, M. A., Meyer, J. N., Vanapalli, S. A., & Driscoll, M. (2019). Swim exercise in *Caenorhabditis elegans* extends neuromuscular and gut healthspan, enhances learning ability, and protects against neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(47), 23829-23839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909210116>
- Legüe, M., & Calixto, A. (2019). RNA language in *Caenorhabditis elegans* and bacteria interspecies communication and memory. *Current Opinion in Systems Biology*, 13, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.08.005>
- Lewis, A., Berkyurek, A. C., Greiner, A., Sawh, A. N., Vashisht, A., Merrett, S., Flamand, M. N., Wohlschlegel, J., Sarov, M., Miska, E. A., & Duchaine, T. F. (2020). A Family of Argonaute-Interacting Proteins Gates Nuclear RNAi. *Molecular Cell*, 78(5), 862-875.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.007>
- Loxterkamp, E., Cha, J., Wu, K., Sullivan, J., Holbrook, O., Ghaith, H., Srun, L., & Bauer, D. E. (s. f.). Behavioral Differences between Male and Hermaphrodite *C. elegans*. Open Access.
- Marsh, E. K., & May, R. C. (2012). *Caenorhabditis elegans*, a Model Organism for Investigating Immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2075-2081. <https://doi.org/10.1128/AEM.07486-11>
- McEwan, D. L., Weisman, A. S., & Hunter, C. P. (2012). Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell*, 47(5), 746-754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.014>
- Meneely, P. M., Dahlberg, C. L., & Rose, J. K. (2019). Working with Worms: *Caenorhabditis elegans* as a Model Organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 19(1). <https://doi.org/10.1002/cpet.35>
- Ngoi, S. M., Tovey, M. G., & Vella, A. T. (2008). Targeting Poly I:C to the TLR3-independent pathway boosts effector CD8 T cell differentiation through IFN $\alpha/\beta$ . *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(11), 7670-7680.
- Parida, L., Neogi, S., & Padmanabhan, V. (2014). Effect of temperature pre-exposure on the locomotion and chemotaxis of *C. elegans*. *PloS one*, 9(10), e111342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111342>

- Pinta Castro, Francisco. (2022) Efecto del ayuno sobre la preferencia a odorantes a través del factor de transcripción CRH-1/CREB en *C. elegans*, <http://132.248.9.195/ptd2022/noviembre/0833059/Index.html>
- Prasad, B. C., & Reed, R. R. (1999). Chemosensation: Molecular mechanisms in worms and mammals. *Trends in Genetics*, 15(4), 150-153. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01695-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01695-9)
- Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y., Sundaram, M. V., & Pack, A. I. (2008). Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature*, 451(7178), 569-572. <https://doi.org/10.1038/nature06535>
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors: Their regulation and roles in RNA sensing. *Nature Reviews Immunology*, 20(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>
- Remy, J.-J., & Hobert, O. (2005). An interneuronal chemoreceptor required for olfactory imprinting in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5735), 787-790. <https://doi.org/10.1126/science.1114209>
- Richmond, J. (2006). Synaptic function. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.69.1>
- Samuel, B. S., Rowedder, H., Braendle, C., Félix, M.-A., & Ruvkun, G. (2016). *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27), E3941-E3949. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607183113>
- Schlee M. 2013. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology* doi: 10.1016/j.imbio.2013.06.007
- Shih, J. D., & Hunter, C. P. (2011). SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA*, 17(6), 1057-1065. <https://doi.org/10.1261/rna.2596511>
- Shimizu, K., Ashida, K., Hotta, K., & Oka, K. (2019). Food deprivation changes chemotaxis behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Biophysics and physicobiology*, 16, 167–172. [https://doi.org/10.2142/biophysico.16.0\\_167](https://doi.org/10.2142/biophysico.16.0_167)
- Sowa, J. N., Jiang, H., Somasundaram, L., Teclé, E., Xu, G., Wang, D., & Troemel, E. R. (2020). The *Caenorhabditis elegans* RIG-I Homolog DRH-1 Mediates the Intracellular Pathogen Response upon Viral Infection. *Journal of virology*, 94(2), e01173-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-19>

- Stannard J. y Horecker B. (1947) "The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide" en *J Biol Chem* 172:599-608.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. En *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19649/>
- Sulston JE, Hodgkin J 1988 Methods. In: *The Nematode Caenorhabditis elegans*, ed Wood WB. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 587–606.
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. En *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology* [Internet]. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19649/>
- Sun, A. Y., & Lambie, E. J. (1997). *Gon-2*, a Gene Required for Gonadogenesis in *Caenorhabditis Elegans*. *Genetics*, 147(3), 1077-1089.
- Tatematsu, M., Funami, K., Seya, T., & Matsumoto, M. (2018). Extracellular RNA Sensing by Pattern Recognition Receptors. *Journal of Innate Immunity*, 10(5-6), 398-406. <https://doi.org/10.1159/000494034>
- Tenor, J. L., & Aballay, A. (2008). A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Reports*, 9(1), 103-109. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401104>
- The *C. elegans* Deletion Mutant Consortium. (2012). Large-Scale Screening for Targeted Knockouts in the *Caenorhabditis elegans* Genome. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2(11), 1415-1425. <https://doi.org/10.1534/g3.112.003830>
- Tijsterman, M., May, R. C., Simmer, F., Okihara, K. L., & Plasterk, R. H. A. (2004). Genes Required for Systemic RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 14(2), 111-116. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.029>
- Valdes, V. J., Athie, A., Salinas, L. S., Navarro, R. E., & Vaca, L. (2012). CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE*, 7(3), e33962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033962>
- Whangbo, J. S., & Hunter, C. P. (2008). Environmental RNA interference. *Trends in Genetics*, 24(6), 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.03.007>
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10565-10570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611282104>

- Worthy, S. E., Haynes, L., Chambers, M., Bethune, D., Kan, E., Chung, K., Ota, R., Taylor, C. J., & Glater, E. E. (2018). Identification of attractive odorants released by preferred bacterial food found in the natural habitats of *C. elegans*. *PLOS ONE*, 13(7), e0201158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201158>
- Worthy, S. E., Rojas, G. L., Taylor, C. J., & Glater, E. E. (2018). Identification of Odor Blend Used by *Caenorhabditis elegans* for Pathogen Recognition. *Chemical Senses*, 43(3), 169-180. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjy001>
- Yan, Z., Cheng, X., Li, Y., Su, Z., Zhou, Y., & Liu, J. (2022). Sexually Dimorphic Neurotransmitter Release at the Neuromuscular Junction in Adult *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 780396. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.780396>
- Yohe, L. R., & Brand, P. (2018). Evolutionary ecology of chemosensation and its role in sensory drive. *Current Zoology*, 64(4), 525-533. <https://doi.org/10.1093/cz/zoy048>
- Yoshida, K., Hirotsu, T., Tagawa, T., Oda, S., Wakabayashi, T., Iino, Y., & Ishihara, T. (2012). Odour concentration-dependent olfactory preference change in *C. elegans*. *Nature communications*, 3, 739. <https://doi.org/10.1038/ncomms1750>
- Zhang, Y., Lu, H., & Bargmann, C. I. (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 438(7065), Article 7065. <https://doi.org/10.1038/nature04216>
- Zhuang, J. J., Banse, S. A., & Hunter, C. P. (2013). The Nuclear Argonaute NRDE-3 Contributes to Transitive RNAi in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 194(1), 117-131. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.149765>
- Zurita León, M., Valdés, V. J., Universidad, N. A. de M., & Universidad, N. A. de M. (2022). Efecto de alta glucosa sobre la memoria asociativa del nemátodo *Caenorhabditis elegans*.