



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas
silvestres de *Caenorhabditis elegans***

**TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

PRESENTADA POR

Ailin Lacour

BAJO LA DIRECCIÓN DE

Dr. Diego Rayes

Bahía Blanca, Febrero de 2022



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas silvestres de *Caenorhabditis elegans*

**TESINA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Ailin Lacour

Diego Rayes

Bahía Blanca, Febrero de 2022

AGRADECIMIENTOS

- A mi Director, Dr. Diego Rayes, por haberme acompañado en todo momento durante la realización de este trabajo con tanta paciencia y pasión;
- Al equipo de trabajo restante: Dra. María José de Rosa, Sebas, Gabi y Nati, por haberme apoyado en cada dificultad. Por el gran compañerismo y respeto que me transmitieron;
- A mi familia, por estar en todas, alentándome continuamente durante estos años en la UNS y por sobre todo, escuchándome;
- A Joaquín por su amor y paciencia que tantas veces me empujaron hacia adelante;
- A mis amigos y compañeros, por su apoyo incondicional.

INDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES FINALES	44
BIBLIOGRAFIA	45

RESUMEN

A lo largo de la historia, las ciencias biológicas se han valido de la utilización de distintos organismos vertebrados e invertebrados para identificar mecanismos y procesos fundamentales, muchos de los cuales terminaron teniendo una gran implicancia biomédica. Uno de los modelos invertebrados más utilizados en los últimos 35 años es el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*. Este pequeño gusano (1 mm de longitud en estadio adulto), ha sido encontrado en diversas regiones del planeta y presenta varias ventajas para realizar estudios biológicos. Por ejemplo, *C. elegans* se puede cultivar fácilmente en el laboratorio utilizando bacterias como fuente de alimento, tiene un ciclo de vida corto (3-4 días), produce ~300 larvas por generación y puede ser almacenado a -80°C indefinidamente(1). Además, tiene un cuerpo transparente que permite la observación directa de sus órganos internos por Nomarsky y la visualización de células específicas y procesos fisiológicos *in vivo* utilizando reporteros fluorescentes (2). El genoma de *C. elegans* fue el primero en ser completamente secuenciado (3). La disponibilidad de herramientas genéticas y experimentales han permitido importantes logros, tales como el mapeo del linaje celular de las 959 células somáticas del hermafrodita (4; 5) y un diagrama completo de cada una de las conexiones del sistema nervioso (6; 7). A su vez, estudios en este organismo han contribuido al entendimiento de procesos cruciales altamente conservados tales como la interferencia por ARN (8), el fenómeno de apoptosis (9), las vías de la insulina (10), las bases moleculares del envejecimiento (11), la fisiología del estrés (12), por citar algunos.

Más allá de la indiscutible relevancia de la utilización de este nematodo en ciencias biológicas y biomédicas, es necesario remarcar que la mayor parte de estos descubrimientos han procedido del uso de una única cepa adaptada al laboratorio desde 1963, proveniente de Bristol, Inglaterra, conocida como N2 (13). Dado que sólo se ha estudiado extensamente un único fondo genético, tenemos mucho más que aprender utilizando la diversidad natural de esta especie (14; 15). Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación a principios de este siglo, se reveló que cepas de *C. elegans* aisladas en otras regiones del mundo (en particular la cepa CB4856, aislada en Hawái) poseen un gran número de polimorfismos de nucleótido único (SNP por Single Nucleotide Polimorphism) en relación a la cepa estándar de laboratorio N2 (16; 17; 18; 19; 20; 21). La comparación de los SNPs entre estas cepas ha facilitado de manera decisiva el mapeo de genes involucrados en diversos procesos biológicos (22; 23). A su vez, en los últimos años el análisis de cepas salvajes ha permitido el estudio de procesos moleculares que subyacen a distintos fenotipos que son difíciles de observar en la cepa estándar de laboratorio N2. Esto demuestra la importancia de conocer y estudiar nuevas cepas silvestres (13). Con este objetivo, nos propusimos la recolección, identificación, y caracterización de una cepa de *C. elegans* Argentina. Al día de hoy, sólo el 1,2% de todos los *C. elegans* aislados en el mundo corresponden a cepas silvestres sudamericanas y, más aún, ninguna de estas cepas fue aisladas en nuestro país (<https://www.elegansvariation.org/strain/global-strain-map>).

En nuestro trabajo aislamos distintas especies de nematodos a partir de muestras de suelo de la región.

En una primera instancia, acotamos el número de individuos recolectados observando y comparando características típicas del nematodo *C. elegans*. Estas incluyen el tamaño, estrategia de reproducción, movimiento, morfología faríngea y velocidad de crecimiento. Además, agregamos información molecular realizando, en aquella cepa que pasó el primer filtro de selección, un análisis por PCR para identificar amplicones específicos de *C. elegans*. Finalmente, confirmamos mediante cruces genéticas el aislamiento de una cepa de *C. elegans* argentina a la que denominamos OAR137. Continuamos la investigación realizando una primera caracterización fenotípica base de la cepa. Hemos encontrado diferencias significativas en varios parámetros de locomoción, desarrollo, y resistencia a estrés oxidativo entre la cepa salvaje aislada por nosotros y la cepa de laboratorio N2. En primer lugar, la velocidad de movimiento en líquido de la cepa aislada en Argentina (OAR137) es significativamente mayor que la cepa de laboratorio N2. Este resultado, sumado a que la cepa OAR137 es más resistente a la acción paralizante del agonista nicotínico levamisol, sugiere diferencias importantes en la transmisión neuromuscular de ambas cepas. Además de las diferencias motoras, encontramos que los individuos de OAR137 presentan un modelo poblacional de aglutinación, con agregación social de animales (en comparación al patrón solitario y disperso característico de N2) y que dejan un menor número de descendencia. Al mismo tiempo, encontramos que la cepa salvaje OAR137 es más resistentes al estrés oxidativo en relación a la cepa de laboratorio N2. Esto último puede estar sugiriendo la existencia en la naturaleza de una compensación o “trade-off” entre la reproducción y la resistencia a estresantes. Este trabajo de tesis constituye el primer paso para identificar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas observadas en la locomoción y, a su vez, para explorar otros fenotipos diferenciales con respecto a la cepa estándar de laboratorio. Para ello, ya hemos enviado a secuenciar el genoma de nuestra cepa, con el objetivo (que excede los alcances de este trabajo de tesis) de identificar los genes involucrados en las diferencias observadas. A su vez, con nuestra identificación de la primera cepa argentina de *C. elegans* contribuimos al esfuerzo global destinado a explotar la variabilidad natural de esta especie en el entendimiento de procesos biológicos fundamentales. Dada la conservación de estos procesos en todo el reino animal, este estudio podría aportar a la comprensión universal de diversos mecanismos, tales como la transmisión neuromuscular.

INTRODUCCIÓN

Características generales del modelo.

En la segunda mitad del siglo XX, Sydney Brenner introdujo al nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* como modelo invertebrado para realizar estudios en biología del desarrollo. Hoy en día, *C. elegans* se ha vuelto para la comunidad científica un sistema de experimentación estándar, apropiado para la investigación de una gran diversidad de fenómenos biológicos involucrados en el área de la genómica, biología celular, metabolismo, neurociencia y desarrollo (2). Su simple ciclo de vida, la facilidad de cultivarlo en el laboratorio, su genoma compacto, entre otras características ventajosas, lo vuelven una herramienta poderosa para avanzar en la comprensión de preguntas de interés científico.

Caenorhabditis elegans se encuentra habitando los suelos de diversas regiones del mundo, donde se alimenta a base de microorganismos, en su gran mayoría, bacterias (24; 25). Las larvas recién nacidas, en su estadio L1, miden alrededor de 0,25 milímetros de largo y llegan a ≈ 1 milímetro en el estadio adulto, razón por la cual exige el uso de lupas de disección, o microscopios compuestos para poder visualizarlos (por lo general admiten un aumento de hasta 100X o 1000X respectivamente) (2). Su transparencia corporal permite distinguir fácilmente los órganos, células individuales y detalles subcelulares de *C. elegans*. A su vez, el empleo de marcadores fluorescentes permite identificar estructuras y patrones de expresión de genes, así como estudiar procesos biológicos dinámicos *in vivo*, ya sean fenómenos del desarrollo o del crecimiento celular, así como la caracterización de interacciones de proteínas o actividad neuronal *in vivo* (26; 27; 28). Estas características, sumada a la gran disponibilidad de técnicas de modificación genética para este organismo, lo convierten en un modelo excelente para estudios biológicos (29; 30).

C. elegans tiene un modo de reproducción muy particular conocido como androdioecia. En la naturaleza conviven dos sexos: hermafroditas autofecundantes (XX) y machos (XO), en lugar de hembras y machos como es de esperar en la mayoría de los grupos animales. En poblaciones mantenidas bajo condiciones de laboratorio, la generación de machos es muy rara (0.1%), ya que surgen durante la autofertilización sólo como el resultado de la pérdida del cromosoma X en la gametogénesis hermafrodita, que es de por sí un evento poco frecuente. Sin embargo, por medio de la reproducción sexual el porcentaje de machos aumenta hasta un 50% (2; 31). En su desarrollo, el individuo hermafrodita se caracteriza por formar, en primer lugar, una línea germinal masculina que da lugar a una cantidad limitada de espermatozoides ≈ 300 , y luego, el desarrollo de un mayor número de ovocitos. Dado que estos últimos suelen ser fecundados con un 100% de eficacia, el número promedio de autoprogenie de estos individuos es de ≈ 300 (13). Otro aspecto a resaltar en relación a los dos sexos de la especie, es que estos no pueden distinguirse fácilmente hasta el estadio de larva L4 en la que los hermafroditas poseen una cola ahusada y la vulva en desarrollo (medialuna o semicírculo blanco refringente en posición medio-ventral) y los machos una cola más ancha en punta de flecha (32; 33; 31) (Figura 1). La autofertilización hermafrodita permite mantener líneas genéticamente idénticas a partir

de un individuo. Además, confiere una gran ventaja para estudios neurobiológicos, dado que mutantes con severos defectos en el sistema nervioso, generalmente asociados a movilidad extremadamente reducida, son capaces de dejar descendencia. Esto no ocurre en ninguno de los modelos animales disponibles dado que necesitan el movimiento para aparearse y dejar descendencia.

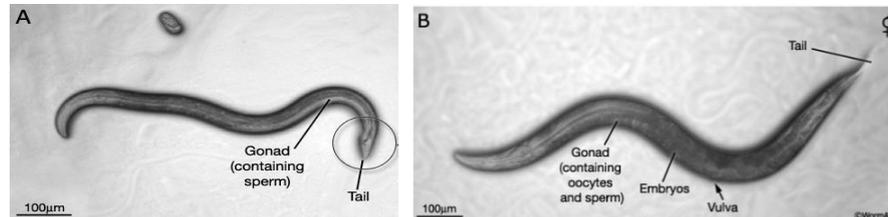


Figura 1. Detalles anatómicos comparativos entre machos (A) y hermafroditas (B) de la especie *Caenorhabditis elegans*. Adaptada de Wormatlas (<https://www.wormatlas.org/male/introduction/mainframe.htm>)

C. elegans se distingue por presentar un ciclo de vida corto (3,5 días a 20° C desde el huevo hasta el adulto) (13) (Figura 2). Sin embargo, es importante considerar el entorno físico y biótico en el que se desarrolla, ya que afecta profundamente a su fisiología y comportamiento, influyendo en última instancia en el ciclo de vida (25). En condiciones ideales, con abundancia de comida y baja densidad poblacional, el ciclo completo transcurre directamente a partir de un embrión, a través de cuatro estadios larvares atravesados por mudas (L1-L4), a un adulto. Los hermafroditas fértiles comienzan a producir progenie, y pueden vivir varias semanas más antes de morir de senescencia. En contraposición a lo

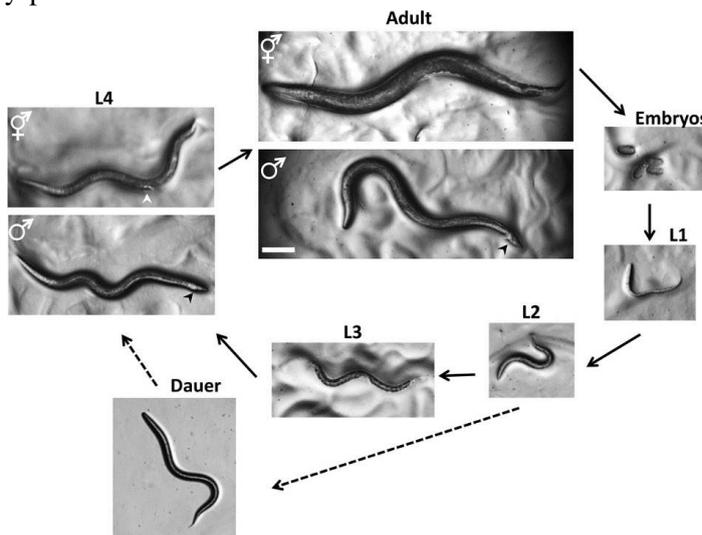


Figura 2. Ciclo de vida típico de *C. elegans*. Los ovocitos pueden ser fecundados por el esperma propio del hermafrodita o a partir del esperma obtenido de los machos mediante el apareamiento sexual. Las larvas dauer son más delgadas que todos los demás estadios larvares. Las fotografías se tomaron en placas de Petri (nótese el césped bacteriano en todas las imágenes, excepto en las de dauer) Reproducida a partir de (2)

descrito, bajo condiciones estresantes, las larvas L2 activan un ciclo de vida alternativo y mudan a una fase de diapausa migratoria conocida como larva "dauer" (del alemán "duradera"). Las señales ambientales censadas para ingresar a esta fase opcional incluyen la densidad poblacional, la disponibilidad de alimentos y la temperatura (34; 2). Dado que la cutícula altamente resistente de este estadio rodea completamente al animal (involucrando la abertura bucal), el nematodo no puede alimentarse y como consecuencia detiene su desarrollo. Este estadio dauer puede durar, al menos en el laboratorio, hasta 4-6 meses, a la

espera de mejores condiciones ambientales. Esta plasticidad en su desarrollo es clave en la dispersión de la especie (14; 15).

En lo que respecta al plan corporal de un adulto de *C. elegans*, este es anatómicamente simple con alrededor de 1000 células somáticas, y un número fijo de 302 neuronas (35; 36) (Figura 3). Gracias al número invariable de células somáticas, investigadores lograron rastrear *in vivo* el destino de cada célula entre la fertilización y el estadio adulto y generar con esta información un linaje celular completo (2). Una ventaja de este hecho, sumado al conocimiento actual tan amplio de la neuroanatomía de *C. elegans*, es la fácil identificación, mediante pruebas genéticas, de las mutaciones que dan lugar a defectos del desarrollo y del comportamiento. Las mutaciones se pueden favorecer con la aplicación de una gran variedad de mutágenos, y gracias a la presencia del hermafroditismo en la especie, se segregan directamente como clones homocigotos sin tener que configurar retrocruces (6).

Otro punto importante que posiciona a *C. elegans* como un organismo excelente con el que estudiar la biología general de los metazoos, es la gran similitud entre sus procesos celulares y moleculares básicos con el de otros animales, incluidos los mamíferos (26). Se conoce, que al menos el 38% de los

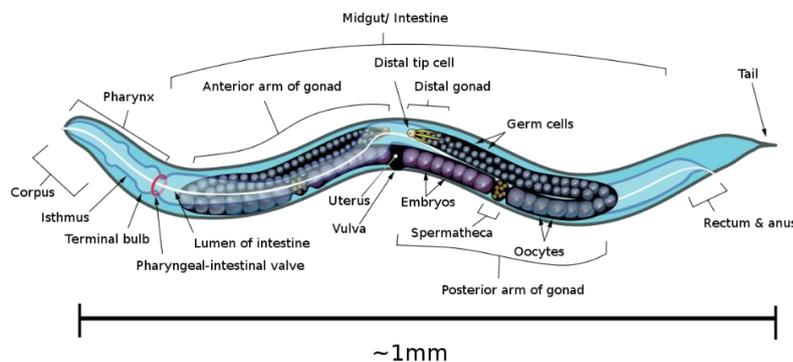


Figura 3. Diagrama anatómico lateral (izquierdo) de un hermafrodita en estadio adulto de *C. elegans*. Reproducida a partir de (88)

genes codificantes de proteínas de *C. elegans* tienen ortólogos en el genoma humano (37) y el 60-80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (26). Mas aún, el 40% de los genes que se sabe que están asociados con

enfermedades humanas tienen ortólogos claros en el genoma de *C. elegans* (38). Por lo tanto, muchos descubrimientos en esta especie tienen relevancia para el estudio de la salud humana y enfermedad. Sin embargo, y sorprendentemente, la mayor parte de estos descubrimientos han procedido del uso de una única cepa adaptada al laboratorio desde 1963, proveniente de Bristol, Inglaterra, conocida como N2 (13). Dado que sólo se ha estudiado extensamente un único fondo genético, tenemos mucho más que aprender utilizando la diversidad natural presente en esta especie (14; 15).

Adaptación al laboratorio.

Los organismos modelo son de gran importancia para comprender la biología básica y hacer avances en investigación biomédica. Sin embargo, existe un gran contraste entre un amplio conocimiento de *C. elegans* como un sistema experimental, y un gran desconocimiento acerca de su medio ambiente natural, a pesar de que este nematodo se ha catalogado como un organismo clave para la investigación biológica (39). La influencia del cultivo en el laboratorio es, y no solo en lo que respecta a este modelo animal, subestimada, particularmente en relación a cómo el entorno artificial puede afectar el resultado de la investigación. Este evento está muy bien documentado en la fijación de alelos derivados de laboratorio para los genes *npr-1*, *glb-5* y *nath-10* (13). Como consecuencia del descuido de la ecología natural de

la especie, la cepa estándar N2 usada en la mayoría de los laboratorios es distinta a todas las cepas silvestres de *C. elegans* (13; 40; 41). Desde su introducción a la comunidad científica por Sydney Brenner en 1974, N2 se extendió masivamente por todo el mundo utilizándose en muchos laboratorios, y se convirtió así en la cepa canónica de tipo salvaje. Sin embargo, antes de su preservación criogénica, se propagó durante muchas generaciones dando lugar a la acumulación y selección de mutaciones aleatorias. No se conoce con qué frecuencia fue transferida a nuevos cultivos durante estos años, pero sí se sabe que fue sometida a 300-2000 generaciones desde 1951 hasta 1969. Dada una tasa de mutación de la línea germinal de $2,7 \times 10^{-9}$ mutaciones por sitio por generación, se pueden haber acumulado hasta mil mutaciones neutrales antes de la conservación criogénica, además de las mutaciones adicionales originadas en cada laboratorio luego de su dispersión masiva (13). Se conoce que estas diferencias genéticas afectan de manera pleiotrópica a varios rasgos de la especie tales como el comportamiento, la susceptibilidad a los patógenos, el tamaño corporal, la reproducción, y la entrada en la fase dauer (14). El desinterés inicial en la ecología y evolución de *C. elegans* está directamente relacionado con el hecho de que más del 40% de los genes de esta especie aún no tienen una anotación funcional, e incluso más del 60% no presentan un fenotipo descripto (25). Mas aún, es posible que muchos de estos genes enigmáticos tengan funciones que solo pueden hacerse evidentes en una situación natural (42; 39). En este sentido, la inspección de la historia natural de *C. elegans* contribuye al avance de la investigación biológica en dos aspectos claves. En primer lugar, el aislamiento de cepas silvestres permite identificar la función de varios genes cuyo fenotipo mutante es desconocido (43; 44). En segundo lugar, el mejor conocimiento de su hábitat salvaje proporciona nuevos parámetros ambientales para probar mutantes de genes de interés (14).

Afortunadamente, a pesar del descuido de estos primeros años en el uso de la cepa, y conociendo que todo organismo evoluciona en respuesta a su entorno natural, en la actualidad cada vez son más las investigaciones y los esfuerzos dedicados a ampliar el estudio del desarrollo y la biología de *C. elegans* aislados de la naturaleza (14; 25). Al profundizar en el conocimiento de la historia natural de *C. elegans*, se establece un contexto más amplio y se mejoran las herramientas para estudiar su biología.

Presiones selectivas: la naturaleza frente al laboratorio.

El nematodo *C. elegans* puede mantenerse fácilmente en el laboratorio empleando, para este fin, placas de agar o cultivos líquidos suplementados con la cepa bacteriana *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimentación (15). Sin embargo, el cultivo en laboratorio proporciona condiciones ambientales casi constantes y muy distintas al ambiente previo en que estos habitaban. Por citar un ejemplo, el uso estándar de la cepa *E. coli* como alimento deriva del hecho de que, como organismo modelo, se encontraba disponible en muchos laboratorios, y no porque esta bacteria estuviera originalmente asociada a *C. elegans* salvajes (14). Además, hay que tener en cuenta el sustrato en el que se cultivan los animales, ya que las placas de agar ofrecen un soporte bidimensional, mientras que la fruta en descomposición, característica de su hábitat natural, constituye un entorno tridimensional. Por otro lado,

cuando los animales se extraen de la naturaleza y se transportan al laboratorio, los investigadores de manera no intencional imponen nuevas presiones que, en última instancia, pueden cambiar la genética del organismo. Esta propagación dirigida por los investigadores da lugar a una evolución mediante selección artificial, que inevitablemente afecta a las características genotípicas y fenotípicas de los organismos modelo, incluido *C. elegans* (13).

Además de la típica selección artificial en el laboratorio, *C. elegans* cuenta con las mutaciones acumuladas durante varios años antes de su criopreservación. Si bien éstas podrían no haber conferido ninguna ventaja selectiva, se sabe bien que su propagación en el laboratorio condujo a la fijación de varios alelos que confieren una fuerte ventaja en estas condiciones (13; 45). Las cepas de todo organismo modelo son ejemplos de una domesticación inusual en los que la endogamia generada por sus cultivos artificiales da como resultado una uniformidad fenotípica muy alejada de la situación característica de las cepas silvestres de esas mismas especies. Por dar un ejemplo, las respuestas olfativas de las cepas de laboratorio de *Drosophila* difieren de las estudiadas en cepas silvestres recién capturadas (40). El genotipo N2 de *C. elegans* no es una excepción. Varios estudios demuestran que esta cepa presenta un mayor “fitness” en condiciones de laboratorio que las cepas silvestres aisladas de la naturaleza, presentando diferencias fenotípicas en aspectos como el comportamiento de agregación, el tiempo de maduración, la fecundidad, el tamaño corporal, entre otros (40; 45). Una diferencia sorprendente entre N2 y la mayoría de los aislamientos silvestres está relacionada con la búsqueda de alimento. N2 se alimenta solo, mientras que la mayoría de las cepas salvajes se alimentan en grupos (Figura 4) (40; 13). En este sentido, la concentración de oxígeno atmosférico en las placas de agar es uno de los principales determinantes de estas diferencias comportamentales observadas (46). Se sabe que las placas presentan un nivel de oxígeno mucho mayor que los preferidos por las cepas silvestres, volviéndose una fuerte presión de selección sobre el organismo, afectando al crecimiento y a la fisiología del animal (Figura 4). Según Sterken (2015), los efectos dependientes del oxígeno son tan relevantes en *C. elegans* que “dos de cada tres alelos derivados del laboratorio están asociados con comportamientos alterados a mayores concentraciones de oxígeno” (13).

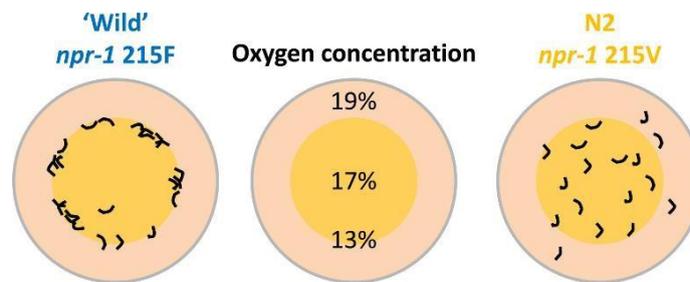


Figura 4. Efectos de la concentración de oxígeno en las placas de cultivo sobre cepas de *C. elegans* salvajes (diagrama de la izquierda) y la cepa canónica N2 (diagrama de la derecha). Obsérvese el patrón poblacional agrupado de la cepa salvaje vs el patrón solitario y disperso de N2. Las cepas silvestres de *C. elegans* prefieren, en cultivos artificiales, concentraciones de oxígeno inferiores a los niveles ambientales, manifestado por su desplazamiento al borde de la bacteria (naranja, diagrama central). Este hecho se suma a la agregación típica de estas cepas, lo que disminuye aún más la concentración local de oxígeno. La cepa N2 es menos sensible a las concentraciones de oxígeno y no se agrega a los bordes del césped bacteriano. Reproducida a partir de (13)

Otra característica diferencial entre cepas de este nematodo, es un dimorfismo fenotípico en el que los machos de varias cepas aisladas directamente de la naturaleza depositan en los hermafroditas un tapón copulatorio tras el apareamiento. Por el contrario, los hermafroditas cruzados con machos de la cepa estándar de tipo salvaje (N2 Bristol) carecen de esta masa gelatinosa sobre la vulva (39; 47). Es remarkable que, en contraposición al comportamiento dependiente de oxígeno, este fenotipo diferencial no se debe a una adaptación en el laboratorio, dado que algunas cepas silvestres carecen de este tapón (47).

Las investigaciones en un entorno artificial y el análisis de la cepa canónica de *C. elegans* N2, que muestra numerosas adaptaciones a las condiciones del laboratorio, pueden dar lugar a conclusiones alejadas de la situación real. El entorno biótico es de particular importancia en este contexto, ya que las interacciones son a menudo un motor importante de cambio evolutivo, especialmente aquellas que involucran a los organismos parásitos y patógenos. Por definición, los parásitos y patógenos reducen el fitness de su hospedador (en este caso *C. elegans*), imponiendo continuamente una alta presión de selección. En consecuencia, estos tipos de interacciones bióticas son probablemente un determinante clave en la configuración de la historia de vida y las características subyacentes del genoma de cualquier organismo, incluido *C. elegans* (25).

En resumen, a pesar del intenso trabajo de laboratorio sobre *C. elegans*, muchas características importantes de esta especie en la naturaleza siguen siendo un misterio. En los últimos 10-15 años varios científicos decidieron dedicar sus investigaciones al estudio de *C. elegans* aislados de la naturaleza con el propósito final de volverlo un organismo modelo apto para estudios evolutivos y ecológicos (14). Afortunadamente el centro *Caenorhabditis elegans* Natural Diversity Resource (CeNDR) reúne estos esfuerzos para facilitar el estudio de la diversidad natural de *C. elegans*. En esta organización se proponen como objetivos principales aceptar, organizar y distribuir cepas salvajes de *C. elegans* a los grupos de investigación interesados en trabajar con ellos; secuenciar los genomas completos de las cepas silvestres de *C. elegans* que los investigadores le proporcionen, brindar los datos de las secuencias alineadas y facilitar el descubrimiento de la variación genética en toda la especie; realizar mapeos de

asociación de todo el genoma para correlacionar el genotipo con el fenotipo e identificar la variación genética subyacente a los rasgos cuantitativos (<https://www.elegansvariation.org/>).

Aislamientos de *C. elegans* silvestres.

El nematodo de vida libre *C. elegans* se encuentra disperso por todo el mundo, y es particularmente abundante en ambientes con presencia de microorganismos, mayormente en zonas con materia orgánica en descomposición. Rara vez se lo ha encontrado en muestras de suelo puro. Parece, además, tener una preferencia por el clima templado húmedo (14). En este entorno es parte de una compleja red de interacciones microbianas que actúan como fuente de alimento, microbioma intestinal, parásitos y patógenos, y posiblemente competidores en estos nichos alimentarios semejantes. Las cepas silvestres se han aislado con éxito en materia orgánica en descomposición, e incluso de organismos "portadores", como caracoles o isópodos terrestres que facilitan su dispersión a nuevos hábitats (13). El aislamiento de *Caenorhabditis* y otros nematodos de la naturaleza requiere en una primera instancia de un muestreo a campo. En este sentido, cabe destacar que, a causa de su pequeño tamaño, los nematodos como *C. elegans* no pueden verse directamente durante la recolección, que entonces debe realizarse a ciegas. La forma más fácil y eficaz de recuperarlos de cualquier sustrato es colocar la muestra en una placa de cultivo estándar de *C. elegans*, quienes, debido a sus hábitos bacteriófagos, se arrastran fuera de la muestra hacia el césped bacteriano. Junto a esta característica, su movimiento rápido permite el aislamiento en cuestión de minutos u horas. La principal ventaja de este método de placas de agar es que permite recuperar todos los estadios de desarrollo de forma más o menos cuantitativa, excepto los estadios embrionarios, que sólo pueden recuperarse después de la eclosión (16).

Confirmación de la especie.

Una buena manera de comenzar con la identificación del género y posiblemente la especie de este nematodo es comparando observaciones, principalmente de las partes bucales y de los órganos sexuales, con dibujos o fotografías publicadas o con cultivos ya identificados (16).

Una confirmación a la identificación morfológica de los nematodos se basa en el análisis de las secuencias moleculares disponibles en las bases de datos, principalmente las secuencias de ADNr 18S, 28S e ITS rDNA. El ADNr 18S es útil a un nivel taxonómico amplio, mientras que las secuencias ITS son generalmente útiles para distinguir cepas coespecíficas o especies estrechamente relacionadas (48). A su vez, para discriminar entre las especies de *Caenorhabditis* más cercanas filogenéticamente (en especial las especies hermafroditas *C. elegans*, *C. briggsae* y *C. remanei*), se puede realizar una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada una de ellas. Wormbook brinda información de 3 pares de cebadores de PCR para el gen *glp-1* que amplifican diferentes tamaños de fragmentos en *C. elegans*, *C. briggsae* y *C. remanei* (16).

En un último paso de confirmación, la identidad de la especie puede determinarse por la generación de progenie fértil a partir de cruces de la cepa de laboratorio con la cepa incógnita. Para ello, se realizan

cruzas entre hermafroditas vírgenes (estadio L4 de la especie) de la cepa de interés, con machos de la cepa de laboratorio identificada, o viceversa (16). En las especies hermafroditas, los cruces exitosos pueden puntuarse por la aparición de una elevada proporción de progenie masculina en la F1. También se pueden determinar por un método más refinado, utilizando machos de cepas de laboratorio que expresen marcadores dominantes (por ejemplo, GFP). En este caso, la progenie cruzada se identifica por la presencia del marcador. Es importante mencionar que en muchas ocasiones los cruces entre especies relacionadas (como lo son *C. remanei* y *C. briggsae*) pueden dar lugar a progenie F1, pero la mayoría de los huevos que se ponen en estos cruces nunca eclosionan (16; 49). La presencia de F2, en cambio, es indicativa de que la cepa silvestre corresponde a la especie *elegans*.

OBJETIVOS

Objetivo General:

A pesar del incremento en el estudio de cepas silvestres de *C. elegans* en los últimos 10 años, al día de hoy, sólo el 1,2% de todos los *C. elegans* aislados en el mundo corresponden a cepas silvestres sudamericanas y, más aún, ninguna de estas cepas fue aislada en nuestro país (<https://www.elegansvariation.org/strain/global-strain-map>).

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se plantea como objetivo general el aislamiento y caracterización fenotípica de las primeras cepas de *C. elegans* argentinas.

Objetivo específico 1: Aislamiento de cepas de *C. elegans*

Se plantea utilizar materia vegetal en descomposición con el objetivo de aislar cepas silvestres de *C. elegans*. Además, para confirmar la pertenencia de los nematodos aislados a esta especie se propone:

- Analizar los caracteres morfológicos generales de los nematodos encontrados en el suelo y comparar los mismos con las cepas de *C. elegans* del laboratorio.
- Realizar cruces con la cepa estándar de laboratorio (N2, aislado en Bristol, Inglaterra) y analizar la viabilidad y la fertilidad de la descendencia para confirmar que los nematodos aislados pertenecen a la especie *C. elegans*.

Objetivo específico 2: Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

Una vez finalizado el objetivo específico 1 se propone:

- Cuantificar y comparar distintos fenotipos con la cepa estándar de laboratorio. Específicamente, se medirá: Descendencia promedio por individuo, cantidad de huevos depositados por hora, resistencia al estrés oxidativo, ingesta de alimento, actividad locomotora en líquido y resistencia al antihelmíntico levamisol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo. Con el objetivo de recolectar muestras de suelo de distintos sectores de nuestra ciudad, se emplearon bolsas de plástico con cierre tipo “ziploc” (para un volumen de 20ml por muestra), que fueron transportadas a nuestro laboratorio. Como no fue posible el procesamiento de éstas el mismo día de su recolección, se mantuvieron aireadas, evitando el cierre completo de las bolsas. En estas condiciones las muestras se pueden conservar por al menos 2-3 semanas a una temperatura entre 10 y 25°C, agregando unas gotas de agua periódicamente para mantener la humedad.

Para aumentar la probabilidad de encontrar nematodos del género *Caenorhabditis*, se utilizaron distintos cebos que pudieran atraerlos, tales como tomate y zapallo. Estos cebos se colocaron dentro una malla metálica que fue enterrada a unos pocos centímetros de la superficie, en una zona sombreada y relativamente húmeda. La presencia de este entramado evita que el cebo sea comido por aves o mamíferos (Figura 5). A su vez, se procesaron muestras tomadas de un compost formado por material orgánico en descomposición (hojas y restos de verduras y frutas).



Figura 5. (A) Demostración de la colocación del cebo (en este caso tomate en descomposición) dentro de una malla metálica para evitar que sea comido por aves o mamíferos. (B) Compost del cual se aisló la primera cepa de *C. elegans* argentina. (C) En el laboratorio, la muestra de suelo se colocó alrededor del césped bacteriano de *E. coli* en una placa de cultivo estándar de "*C. elegans*".

Aislamiento. Para llevar a cabo el aislamiento de los distintos nematodos habitantes del suelo, se utilizaron placas de Petri NGM estándar 90mm humedecidas con 1ml de agua (Ver Apéndice). En el centro de éstas se sembró alrededor de 50µl de la fase estacionaria de un cultivo de bacteria *E. coli* OP50 (crecidas en medio líquido Luria-Bertani, LB) que sirve como fuente de alimentación (Ver Apéndice). Esta cepa bacteriana es defectuosa en la síntesis de uracilo y no puede crecer en una capa gruesa facilitando la visualización de los nematodos (50).

A partir de 1,5L de medio de cultivo NGM se prepararon un total de 6 placas de Petri para cada condición (compost, tomate y zapallo), obteniéndose un total de 18 placas de aislamiento. Finalmente se esparcieron, alrededor del césped de *E. coli* OP50 en cada una de éstas, 10 gramos de muestra de suelo (Figura 5). Pasadas 3hs desde la inoculación de la muestra, y por 2 días, antes de que las placas de aislamiento comenzaran a contaminarse (principalmente por el crecimiento de hongos provenientes de las muestras de suelo), se observó el centro de cada una de estas en búsqueda de nematodos, ya que los mismos son atraídos y se arrastran fuera de la muestra hacia el césped bacteriano. Los distintos gusanos

encontrados se recogieron individualmente en nuevas placas de cultivo que fueron mantenidas en nuestro laboratorio a 20°C dentro un incubador específico para este fin.

Transferencia individual de gusanos. transferir gusanos entre placas es una técnica básica necesaria para cualquier experimento con nematodos. Para este fin se utilizó como herramienta lo que se conoce vulgarmente como “pick”, construido a partir de una pipeta de vidrio y un alambre de platino en su

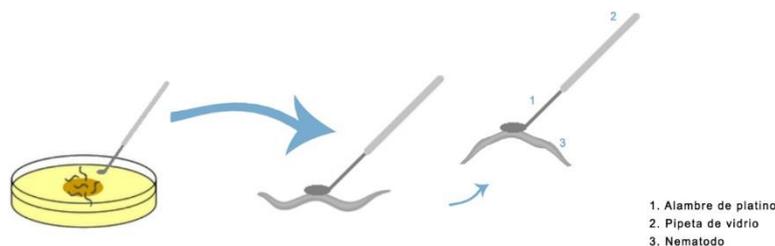


Figura 6. Esquema representativo de un “pick” para nematodos. Herramienta construida a base de un alambre de platino y una pipeta de vidrio que sirve para levantar y trasladar gusanos ocasionando el menor daño posible. Por lo general, previo al pasaje de cada individuo, se embebe el pick en bacteria que sirve como pegamento y facilita entonces la adhesión del animal al instrumento.

extremo (Figura 6). Además, como instrumento de base, se trabajó con un mechero de alcohol que permite el estudio en condiciones de semi-esterilidad. Las distintas placas de Petri utilizadas fueron abiertas por un breve lapso de tiempo, siempre al lado de la llama, y el pick de cada investigador fue expuesto al

fuego directo (antes y después de ser utilizado) hasta que éste se volvió de color rojo. De esta manera se disminuyen las probabilidades de contaminación por microorganismos presentes en el ambiente de trabajo.

Crecimiento de nematodos. Las cepas se cultivaron y mantuvieron bajo condiciones estándar a 20°C en placas de agar con medio de crecimiento de nematodos (NGM). Todos los animales utilizados para ensayos de comportamiento se mantuvieron en placas sembradas con *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento, asegurando en todo momento una baja densidad poblacional.

Tratamiento con solución de hipoclorito alcalino o Bleaching. Con el objetivo principal de descontaminar poblaciones que deben recuperarse libre de microorganismos, se preparó una solución de Bleaching a partir de hipoclorito de sodio y NaOH (Ver Apéndice). En una nueva placa de Petri esterilizada se colocó una gota de 20µl de esta solución, con la ayuda de una micropipeta automática, alejada de la bacteria OP50 de alimentación. Luego, se depositaron entre 20 y 30 gusanos grávidos de la población a descontaminar dentro de la gota formada, agitando levemente el pick en el líquido de limpieza para lograr que los nematodos se desprendan. Se debe trabajar rápidamente antes de que la gota se seque en el agar. El principio fundamental del método radica en que los nematodos, en cualquier estadio luego de su eclosión, son sensibles a la solución, mientras que los huevos, gracias a la protección de su cubierta de quitina, son resistentes a ella. Una vez en contacto con la sustancia descontaminante, los gusanos se quiebran liberando sus huevos al exterior. Estos eclosionan al día siguiente y migran hacia la bacteria. Dado que en este estadio los gusanos son muy frágiles, se puede esperar dos días para recogerlos en placas individuales y establecer una nueva población por autofecundación libre de hongos

y bacterias. Es importante no dejar pasar más tiempo, ya que las bacterias u hongos resistentes al tratamiento pueden comenzar a crecer.

Nota: Si la gota se seca o los gusanos no se inmovilizan por completo, se debe agregar otros 20µl de solución de “Bleaching” sobre la mancha original. Advertimos que, dadas sus características, esta técnica es ampliamente utilizada no solo para descontaminar poblaciones, sino también para sincronizar cultivos de *C. elegans* en la primera etapa larvaria (L1) (50).

Generación de machos. Dado que bajo condiciones normales solo el 0.1% de los ejemplares de *C. elegans* son machos, muchas veces se realizan incubaciones a altas temperaturas con el fin de favorecer en la descendencia un mayor porcentaje de aparición de los mismos. El sexo masculino surge como resultado de la pérdida meiótica de cromosoma X (X0), a muy baja frecuencia (<0.5%) (51). El método seguido consistió en picar aproximadamente 8 larvas de la cepa de interés en su estadio virgen L4 (Ver materiales y métodos) y someterlos a incubación a 30°C por 5 horas. Las altas temperaturas traen consigo un aumento en la probabilidad de errores en la disyunción del cromosoma X, lo que lleva en última instancia a la generación de gametos aneuploides, que al unirse a otro portador de X dan lugar a un organismo macho X0 (52). Luego del choque térmico, se volvieron a colocar los gusanos en el incubador a 20°C y se analizó su progenie en busca de machos. Vale aclarar que shocks térmicos más prolongados llevan a la esterilidad de los organismos, por lo que es crucial regular con precisión la temperatura de incubación para obtener óptimos resultados.

Lisis celular para PCR. Con el fin de obtener el ADN del interior celular, se transfirieron entre 10-20 animales por cepa a un tubo de 0,2ml con 6µl o 10-20µl del buffer de lisis respectivamente (Ver apéndice). Subsecuentemente, los tubos se sometieron dentro del ciclador (Ivema T18) a un ciclo de 65°C por 1 hora y luego a 95°C por 15 minutos (este último paso sirve para inactivar a la Proteínasa K presente en el buffer de lisis). Estas muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Reacción en cadena de la polimerasa, PCR. Los primers necesarios para corroborar la pertenencia de nuestra cepa aislada (OAR137) a la especie *elegans* se obtuvieron de la empresa MacroGen. Estos se reciben dentro de una caja en su forma liofilizada, por lo que es necesario la resuspensión para poder utilizarlos. Además de los oligonucleótidos, el pedido contiene una hoja con la descripción y los datos necesarios de concentración de los primers expresado en nM y µM, secuencia exacta de nucleótidos, % de Guaninas y Citosinas y el volumen de agua a añadir para obtener una concentración final de 100pM/µl, entre otros (Figura 7). Estos fueron centrifugados en una primera instancia para asegurar la formación de un pellet y evitar la pérdida de producto, y luego se resuspendieron en el volumen de agua ultra pura libre de nucleasas, necesario para generar un stock de 100pM/µl. Según WormBase, los individuos pertenecientes a la especie *elegans* amplifican un producto de PCR para el gen *glp-1* de 208pb, mientras que *C. remanei* y *C. briggsae* en 391pb y 302pb respectivamente. Dada esta información, y habiendo aislado en el laboratorio otras especies de nematodos distintas a *C. elegans*, se

decidió someter a reacción una mezcla equitativa de los 3 pares de primers en simultaneo (1 par específico de cada especie) (16). Se sometieron 20 individuos de cada cepa a un protocolo de lisis celular utilizando como control positivo a N2 y a la cepa Hawaiana CB4856, y como control negativo una muestra de agua ultrapura. Además,

Oligo		Daf16Realfw			
SEQ	5'-TTGCTCCACCCATCATAG-3' (20mer)				
GC%	MW		Yield	scale (μmoles)	Tm(°C)
	calculated	measured			
50	5957	5	25	0.025	58.4
vol. for 100pmol/μl		Purification		Modification	
250		Desalt			

Figura 7. Representación de la ficha técnica que acompaña a los primers obtenidos por primera vez en el laboratorio. Se muestra únicamente una sección de la hoja original.

se sometieron a lisis la cepa de interés OAR137 y tres cepas de las aisladas en una primera instancia, las cuales suponíamos que no pertenecían a la especie *elegans*. 1μl de solución de lisis (conteniendo el ADN Genómico de cada cepa) fue añadida a un total de 19μl de solución de reacción de PCR (Ver solución de reacción de PCR) en tubos de 0.2ml aptos para el termociclador.

Cada muestra generada fue sometida al

siguiente programa de PCR (Tabla 1):

CICLO	TEMPERATURA	PROCESO	TIEMPO
1 ciclo	93°C	Desnaturalización	2 minutos
35 ciclos	95°C	Desnaturalización	30 segundos
	58,5°C	Annealing	30 segundos
	72°C	Elongación	1 minuto
1 ciclo	72°C	Elongación Final	5 minutos

Tabla 1. Programa de PCR utilizado.

- Solución de reacción de PCR (Volumen final 20 μl):

- 1 μl de dNTP's (2.5 mM)
- 2 μl de buffer (10X)
- 1 μl primer forward *glp-1 C. elegans* (10pM/μl) *
- 1 μl primer forward *glp-1 C. briggsae* (10pM/μl) *
- 1 μl primer forward *glp-1 C. remanei* (10pM/μl) *
- 1 μl primer reverse *glp-1 C. elegans* (10pM/μl) *
- 1 μl primer reverse *glp-1 C. briggsae* (10pM/μl) *
- 1 μl Primer reverse *glp-1 C. remanei* (10pM/μl) *
- 1 μl TAQ ADN polimerasa
- 1 μl solución de lisis conteniendo ADN de interés

- 9µl H₂O ultra pura libre de nucleasas (ddH₂O)

* Nota: Se agregaron todos los primers específicos para diferenciar los tres géneros de *Caenorhabditis* en la misma reacción. Los tamaños de los amplicones permiten diferenciar la especie (16), ver resultados).

Dado los volúmenes pequeños utilizados, con cada reactivo agregado se utilizó una microcentrífuga de mesa para evitar la pérdida de productos que pudieran quedar en la superficie o incluso en la tapa de los tubos para PCR empleados.

Preparación de geles para electroforesis. Para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones de la PCR deben visualizarse a través de una electroforesis en geles de agarosa, en nuestro caso al 1%. Estos fueron preparados diluyendo 0,5g de agarosa en 50ml de buffer o tampón TAE. La solución obtenida se calentó en el microondas hasta que la turbidez del medio desapareció. Antes de depositar el gel en una bandeja para su solidificación, se le agregó 1µl de bromuro de etidio, molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena que al ser expuesto a luz UV emite una señal que permite visualizar los amplicones en forma de bandas (53). Este compuesto fue manipulado con guantes de látex, desechados en sus correspondientes recipientes, dado el conocimiento de su origen mutagénico y teratógeno. Se sembraron un total de 8 calles, incluyendo un marcador de peso molecular (Thermo Scientific™ SM1343, 70pb-20.000pb) para facilitar la identificación de los productos de PCR. Para este propósito las muestras se solubilizaron en buffer de cargado (LB), para poder visualizar el frente de corrida. A todos los tubos de PCR (20µl) se les añadió entonces 4µl de buffer LB (que viene concentrado 6X), y además se preparó en un tubo Eppendorf 5µl de Ladder o marcador de peso molecular junto con 1µl de solución LB. Una vez en la cuba electroforética cerrada, y conectada a 70-80 V, se dejó migrar y dar lugar a la separación de los ácidos nucleicos hacia el polo positivo por 20-30 minutos en buffer TAE 1X. Finalmente, se retiró el gel de la cuba y se expuso bajo luz ultravioleta para su visualización.

Preparación de un fijado de microscopio. Para poder visualizar los gusanos bajo microscopio, se preparó lo que se conoce como “pad” o almohadilla para gusanos. Para su preparación, se pesó 1g de

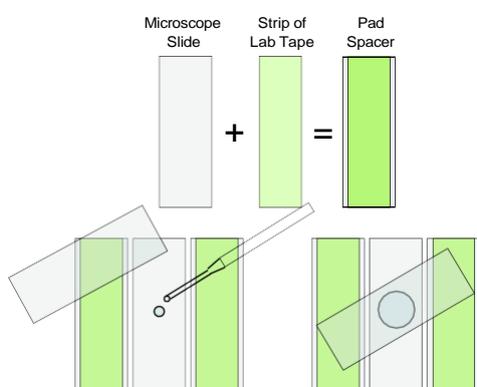


Figura 8. Esquema representativo de la generación de pads o almohadillas para montar nematodos y poder luego visualizarlos al microscopio.

agarosa y se la agregó a 50 ml de solución M9 (agarosa al 2%). La mezcla se llevó al microondas con el objetivo de disolverla. Es importante revisar la solución por intervalos de 30 segundos y agitar entre cada ciclo para evitar que hierva y se vuelva pegajosa. La preparación obtenida puede alicuotarse (utilizando una pipeta estéril de 25ml) en tubos estériles de 5ml que pueden almacenarse y utilizarse durante varios meses. Para hacer la almohadilla se disolvió uno de los tubos en baño de agua a 50-60°C y se colocaron dos espaciadores a cada lado de un portaobjetos de microscopio (Figura 8).

Luego, con una pipeta Pasteur se depositó una gota pequeña de solución de agarosa en el portaobjeto e inmediatamente con suma precaución se colocó otro portaobjetos por encima, como se observa en la figura 8. Finalizado este paso, se retiró cuidadosamente el portaobjetos superior y el pad quedó listo para ser utilizado.

Para el montaje de animales vivos se colocó una gota de 20µl de buffer M9 (que contiene azida sódica (NaN₃) 10-25mM) en el centro de la almohadilla de agar y luego con la ayuda de un pick, se depositaron los gusanos de interés. Posteriormente se cubrió el preparado con un cubreobjetos y se lo fijó con esmalte transparente. El NaN₃ anestesia a los nematodos que quedan inmovilizados facilitando la visualización al microscopio. Las imágenes tomadas se llevaron a cabo en microscopía de fase y de epifluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-S) y fueron procesadas por el software Image J FIJI.

Cepas usadas. Para llevar a cabo los distintos experimentos de caracterización fenotípica de la nueva cepa aislada se utilizaron, además de la cepa a analizar, las siguientes cepas de *Caenorhabditis elegans*:

❖ **N2:** Definida como cepa estándar de laboratorio o tipo salvaje de referencia. Este aislamiento fue recolectado originalmente por L. N. Staniland a partir de compost de hongos cerca de Bristol, Inglaterra, antes de 1956 y fue utilizada libremente hasta 1969, cuando la congelación estándar se volvió un protocolo de rutina para el almacenamiento de cepas (39).

❖ **CB4856:** Cepa aislada en Hawái y denominada originalmente HA8 por L. Hollen en agosto de 1972. Esta fue entregada al laboratorio de R. Anderson, donde se le dio el nombre CB4856 (39).

❖ **Iz829 *ufls34(Punc-47::mcherry)*:** Expresa la proteína roja fluorescente *m-cherry* bajo el control del promotor del gen *unc-47* (Transportador Vesicular de GABA). Esta cepa transgénica tiene, por lo tanto, todas las neuronas Gabaérgicas marcadas con *m-cherry* roja fluorescente. Fue construida en el laboratorio de Michael Francis en la Universidad de Massachusetts y cedida a nosotros muy gentilmente.

Ensayo de resistencia a Levamisol. Se sometieron 20 individuos de cada cepa de interés a placas con 0.5mM de levamisol (o (S) -6-fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo [2,1-b] [1,3] tiazol). 24hs previas al ensayo, entre 40 y 50 larvas L4 de cada genotipo a estudiar fueron trasladadas a una placa NGM estándar sembrada con OP50, e incubadas a 20°C. Este procedimiento asegura que todos los animales tengan la misma edad (adultos jóvenes) cuando comience el experimento.

Se colocaron 3µl de bacteria OP50 en el centro de cada placa de levamisol, lo que ayudó a concentrar los gusanos en un área pequeña facilitando el conteo. Es importante dejar entreabierta la tapa de las placas para que las bacterias se sequen a temperatura ambiente (30 minutos deberían ser suficientes). Luego, se colocaron 20 gusanos de una de las cepas a estudiar en una placa de levamisol (tiempo 0') y se inició un temporizador lo más pronto posible. Se revisaron las distintas placas a los 75 minutos después del contacto con la droga para registrar el número de gusanos paralizados sobre el total de gusanos depositados. A pesar de que se pueden encontrar diferentes puntos finales en la literatura, en

general se considera que un gusano está paralizado cuando no se mueve después de pinchar tres veces con un alambre de platino en la cabeza y la cola. Para analizar los datos se realizó un gráfico de barras que indica la proporción de gusanos paralizados en levamisol.

Ensayo de locomoción en medio líquido. Para el ensayo de motilidad, se seleccionaron 24 larvas en estadio L4 de cada cepa y se determinó la tasa de cambios de curvatura (“thrashes”) colocando cada individuo en una gota de medio líquido M9. Para este fin se utilizó una placa de 96 pocillos con fondo cóncavo. Luego de 6 minutos de habituación al medio líquido, se contó el número de cambios de curvatura que sufre la parte media del cuerpo del animal durante un período de 30 segundos. Estos cambios de curvatura en líquido son tradicionalmente utilizados como medida de la capacidad de movimiento del individuo (54; 55). Los resultados se informaron como thrashes por minuto. Este ensayo se realizó por quintuplicado y se empleó como control interno de la cepa N2, a individuos de IZ829.

Ensayo cantidad de progenie (“Brood Size”). Para evaluar el número total de crías por individuo en la cepa aislada, se transfirió 1 nematodo en estadio larvario L4 a una placa de NGM nueva con OP50. Se emplearon 8 réplicas para cada cepa a evaluar: N2, CB4856 y OAR137. Diariamente los nematodos en estudio fueron transferidos a placas nuevas hasta finalizar su periodo reproductivo de aproximadamente 6 días, contando en cada ocasión el número de larvas emergidas cada día. Al final del periodo reproductivo se sumó el total de descendencia por individuo.

Ensayo puesta de huevos por hora. Se aislaron 12 gusanos grávidos sincronizados por edad (24hs post-L4) de cada cepa a testear, y luego de tres horas se extrajeron de las placas de NGM. Se procedió a contabilizar el número de huevos depositados por cada gusano en ese lapso de tiempo.

Ensayo de resistencia al estrés. Para testear la resistencia al estrés de las distintas cepas analizadas se probó un ensayo de estrés oxidativo, analizando el efecto del sulfato de hierro (FeSO_4) agregado en las placas de cultivo (12). Se transfirieron alrededor de 30 animales L4 a placas de agar de 35mm que contenían FeSO_4 en una concentración 10mM, y se los dejó actuar por 1 hora. Pasado el tiempo, se puntuó el porcentaje de animales muertos, considerados como aquellos que ante 3 toques con el pick de platino en su cabeza y cola no respondieron con ninguna clase de movimiento. El ensayo se realizó 9 veces distribuidos en tres días distintos (3 x día) para cada cepa testeada. Los análisis estadísticos se realizaron en base al promedio de supervivencia de cada placa evaluada (n=9).

Ensayo alimentación. Con el fin de evaluar posibles diferencias en la alimentación entre las cepas salvajes (CB4856 y OAR137) y la cepa N2 ampliamente utilizada en el laboratorio, se utilizaron placas suplementadas con bacteria *E. coli* modificadas genéticamente para expresar un marcador fluorescente verde (*E. coli* OP50-GFP) y un gen de resistencia a ampicilina. De este modo, la bacteria consumida por los gusanos puede visualizarse y cuantificarse fácilmente bajo microscopia de fluorescencia. 24hs previas al ensayo se transfirieron 40 gusanos L4 de cada una de las cepas a testear a 3 placas distintas

con bacteria OP50 de rutina como fuente de alimentación para asegurarse que todos los animales estuvieran igualmente alimentados al momento de iniciarse el experimento. A su vez, se prepararon las capsulas específicas que además del agar NGM contienen ampicilina (100µg/mL) para evitar la proliferación de aquellas bacterias que no expresen el plásmido conteniendo el gen de GFP y de resistencia a la ampicilina. A diferencia de las demás capsulas utilizadas a lo largo de la tesina, se sembró en forma de césped cubriendo casi la totalidad de la superficie de la placa. Esto se realiza para maximizar la permanencia de los gusanos en el césped bacteriano. Idealmente se debe evitar que esta llegue al borde de las capsulas, ya que los gusanos podrían escaparse perjudicando los resultados obtenidos. El día del ensayo, se transfirieron alrededor de 15 gusanos (evitando el arrastre de bacteria no fluorescente) a las placas con OP50-GFP y se esperó 5 minutos para su alimentación. Luego de este periodo de tiempo, se pasaron los gusanos a un portaobjeto con una gota de NaN_3 (0.25mM) en el centro que los paraliza y facilita la visualización. Luego, se cubrió cada portaobjeto con un cubreobjetos y se tomaron fotografías por microscopia de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-S) en 10X, 1 segundo de exposición. La intensidad de fluorescencia en el tracto intestinal de cada nematodo fue cuantificada utilizando el software Image J FIJI.

Protocolo de congelación y descongelación. Para asegurar la disponibilidad de cepas en futuros experimentos y evitar, al mismo tiempo, la acumulación de mutaciones, todas las cepas fueron congeladas y almacenadas a -80°C en el freezer de la institución y una réplica de los mismos en nitrógeno líquido. Se utilizó la técnica de congelamiento estándar para *C. elegans* (1) para la cual se prepararon 3 placas de Petri grandes (90 mm) con individuos de la cepa a congelar y se las dejó hambrear para favorecer el desarrollo de larvas en el estadio L1. Estas son de elección ya que toleran bien las condiciones de temperatura del procedimiento. Es importante que las placas estén libres de la bacteria alimenticia y que no haya otra contaminación antes de continuar, ya que los gusanos no se desprenderán de la placa si hay bacterias residuales. Para cada cepa que se congeló, se etiquetó un tubo de centrifuga de 15ml y seis viales de congelación (1.5ml) con el nombre y la fecha de la cepa. Con la ayuda de una pipeta de Pasteur, y bajo condiciones de esterilidad se inclinaron las placas y se les agregó 3,5ml buffer M9. Es importante agitar varias veces el líquido para lograr la resuspensión de la mayor cantidad posible de animales. Este líquido conteniendo los nematodos fue colocado en un tubo de centrifuga de 15ml. Este procedimiento debería dejar un volumen total de aproximadamente 3ml (alrededor de 0,5ml se absorben en el agar). Una vez recolectada la suspensión, se midió el volumen obtenido, y con una pipeta nueva de 10ml se agregó igual cantidad de solución de congelación o “freezing solution” (Ver composición en apéndice) a la mezcla M9 / gusano en el tubo Falcon. Luego, se mezclaron bien las dos soluciones pipeteando hacia arriba y hacia abajo y se extrajeron todos los 6ml de M9 /gusano /solución de congelación en la pipeta de 10 ml para añadirlos a los 6 viales de congelación en alícuotas de 1ml. Dos días después, se descongeló un vial para asegurar que los gusanos sobrevivieron al proceso de congelación. Con los cinco viales restantes, se colocaron tres viales en un ultrafreezer a -80°C , un vial en nitrógeno líquido para un almacenamiento a largo plazo y un vial en un ultrafreezer de -80°C de

respaldo separado. La solución de congelamiento contiene glicerol, que evita la formación de cristales y en consecuencia la lisis celular durante la técnica. Con el mismo propósito, los tubos para congelación se colocaron dentro de un recipiente de poliestireno expandido (Telgopor) cubierto con algodón evitando el congelamiento brusco.

La descongelación de los gusanos se realizó a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto para asegurar que los mismos queden todos juntos en el fondo del tubo, y se los mantuvo en placas con agar tipo microbiológico NGM y OP50 para su alimentación, a 20°C.

Análisis de datos. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el método One-Way Anova que realiza el programa Sigma Plot versión 14; los datos se presentaron como la media \pm DE; las diferencias se consideraron significativas cuando se obtuvo un $p < 0.05$; los gráficos fueron desarrollados con GraphPad Prims Version 6 (GraphPad Software Corporation San Diego, California, USA); la cantidad de bacteria consumida en medio basal por cada cepa fue medida con el programa Fiji- ImageJ.

Apéndice: lista de materiales, soluciones y reactivos

- Lupa binocular de disección: Biotraza XTD-217.
- Medio agar tipo microbiológico Nematode Growth Medium (NGM): (para 1L: agar (17g); peptona (2.5g); NaCl (3g); ddH₂O.c.s.p. 1L, libre de ARNasas). La solución fue luego autoclavada, enfriada a 60°C y enriquecida con soluciones estériles de: 1ml MgSO₄ (1M); 1ml CaCl₂ (1M); 25ml Buffer fosfato (1M); 1ml colesterol en etanol (5mg/ml).
- Buffer fosfato 1M: KH₂PO₄ (108,3g); K₂HPO₄ (35,6g); ddH₂O.c.s.p. 1L; (pH 6,0).
- Medio Luria Bertani (LB): (para 1L: peptona (10g); extracto de levadura (5g); NaCl (10g) ddH₂O.c.s.p. 1L). Ajustar a pH 7,0 con NaOH.
- Buffer de lisis: KCl (100mM); Tris (pH 8,3) (20mM); MgCl₂ (5mM); IGEPAL (o NP₄O) (0.9 %); Tween-20 (0.9 %); Gelatina (0.02 %); Proteinasa K (400μg/ml); dH₂O.
- Cultivo de bacteria *E. coli* OP50: (crecidas en medio líquido Luria-Bertani, LB, incubadas a 37°C durante toda la noche en agitación).
- Placas de Petri NGM estándar 90mm y 35mm.
- Placas de 96 pocillos con fondo cóncavo.

- Pick: Construido a partir de un fino cable de platino unido a una pipeta de vidrio.

- Solución de Bleaching: Hipoclorito de sodio al 5% (lavandina); H₂O destilada; pellets de hidróxido de sodio en la siguiente proporción: 2ml de hipocloruro de sodio al 5% (NaOCl), 2ml dH₂O, 1 pellet.

- Buffer TAE (50X): Base Tris (C₄H₁₁NO₃) (242g); Ácido acético glacial (57,1g); Na₂EDTA.2H₂O (37,2g); ddH₂O.c.s.p. 1L. Para 1X diluimos 20ml en 1L de ddH₂O.

- Reactivos y equipo para congelar cepas: buffer M9, Freezing solution, 2 pipetas de vidrio de 10ml, 1 tubo de centrifuga de 15ml, viales de congelación (6 por cepa) (utilizamos viales de criotubo Nunc de 1,8ml).
 - Freezing solution: 200ml 1M NaCl, 100ml 1M KPO₄ a pH 6.0, 600ml Glycerol. Llevar a 2 litros con agua destilada; agregar a botellas de vidrio cuadradas en alícuotas de 200ml; autoclavar en ciclo líquido (121C 15min). *Nota:* Agregar por única vez, antes de su primer uso, 60µl de MgSO₄ 1M cada 200ml.
 - Buffer M9: Na₂HPO₄ (5.8g), KH₂PO₄ (3.0g), NaCl (0.5g), NH₄CL (1.0g). Llevar a 1 litro con agua destilada; autoclavar en ciclo líquido (121C 15min).

RESULTADOS

Objetivo 1:

El paso más difícil de nuestro proyecto fue diferenciar nematodos del género *Caenorhabditis elegans* del resto de los gusanos que comparten hábitat con él. Para llevar a cabo nuestro primer objetivo específico, iniciamos la búsqueda con una identificación morfológica que permitió reducir el número de cepas recolectadas a solo aquellas que presentaban características propias del género *Caenorhabditis*. En un paso final, mediante cruza genéticas, seleccionamos una cepa que efectivamente pertenecía a la especie *C. elegans*.

Aislamiento de una cepa perteneciente a la especie *C. elegans*.

Con el objetivo de aislar una nueva cepa del nematodo *C. elegans* se recolectaron, en bolsas tipo ziploc, muestras de suelo provenientes de 3 cebos localizados en el jardín de nuestros hogares: zapallo, tomate, compost. En el laboratorio, las muestras se dispersaron dentro de placas con agar (como se

CEPA	ORIGEN	♀	VEL. CRECIMIENTO
1	compost	si	++++
2	compost	si	++++
3	compost	si	++++
4	compost	si	++
5	compost	si	++
6	tomate	si	++
7	tomate	si	+
8	tomate	si	+
9	zapallo	si	++
10	compost	si	+
11	compost	si	++++
12	compost	si	+++
13	compost	si	+++
14	compost	si	++++
15	compost	si	+

Tabla 2. Número de cada cepa aislada, suelo de origen de ese aislamiento, pertenencia al sexo hermafrodita, y velocidad de crecimiento. Un número mayor de cruces indica una mayor velocidad de crecimiento.

describió en el apartado materiales y métodos), y luego de 2hs se observaron los distintos gusanos típicos del suelo circulando en la bacteria sembrada en el centro de las mismas. Cada animal encontrado fue aislado individualmente en nuevas placas. Teniendo en cuenta que los nematodos pueden ser identificados por criterios tanto morfológicos como moleculares, decidimos ir apartando cepas no *elegans* partiendo de características generales hacia más puntuales (16). Por lo tanto, conociendo que en la naturaleza gran parte de los ejemplares de *C. elegans* son hermafroditas, se realizó un primer descarte de capsulas, conservando solo aquellas que dejaron descendencia por autofecundación.

Pudimos aislar un total de 29 nematodos hermafroditas. Sin embargo, debido a la complejidad de manipular tantas poblaciones en simultáneo, decidimos seguir la investigación con las primeras 15 cepas (presentadas en la Tabla 2) en quienes continuamos con la evaluación de características propias de la especie *C. elegans*. Las muestras restantes fueron almacenadas quedando disponibles para futuros estudios. Vale aclarar que, a pesar de los intentos de aislamiento bajo condiciones de asepsia, los nematodos recolectados por primera vez de la naturaleza acarrear numerosos microorganismos (Bacterias y hongos principalmente) propios de su entorno natural. Para poder trabajar con cultivos monoaxénicos, aquellas placas contaminadas fueron sometidas a la técnica de Bleaching (Ver sección materiales y métodos) obteniendo así una nueva población libre de hongos y bacterias.

Además de ser hermafrodita, el principal parámetro de selección utilizado fue la velocidad de crecimiento a 20°C. Típicamente el ciclo de vida de *C. elegans* en el laboratorio a esta temperatura es de 3 días. Se aislaron individuos de cada una de las 15 cepas y se observó la densidad poblacional a los 4-6 días de este aislamiento. Teniendo en cuenta N2 como velocidad de referencia (++++), se desarrolló la cuarta columna de la Tabla 2 para poder descartar las cepas con diferente velocidad de crecimiento.

Habiendo acotado el número de cepas aisladas a aquellas con una mayor posibilidad de pertenecer a

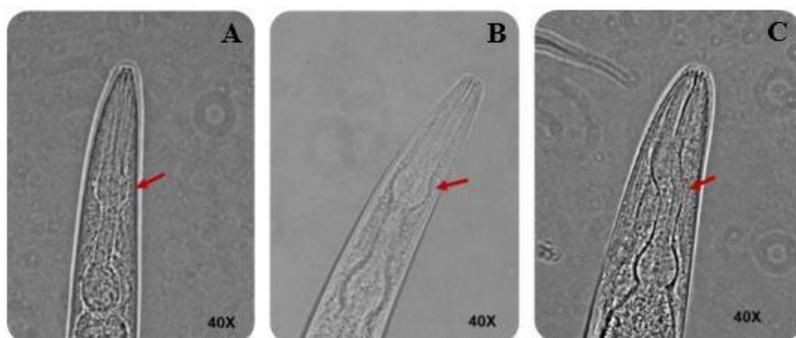


Figura 9. Fotografías tomadas en fase (40X) de las faringes de dos cepas de la especie *C. elegans* y una cepa correspondiente a un nematodo no *elegans*. (A) Cepa estándar de laboratorio N2, (B) Posible cepa de *C. elegans* aislada en Argentina y (C) Faringe de un nematodo no *elegans*. Las flechas rojas señalan los metacorpus correspondientes. Obsérvese la morfología redonda de los dos primeros y la forma más bien cilíndrica que sigue el metacarpus de la cepa C.

la especie *elegans*, continuamos el proceso de selección midiendo características más puntuales. Así, se procedió con la búsqueda de un candidato *C. elegans* en 5 cepas (aquellas que al igual que la cepa estándar N2 presentaron una velocidad de crecimiento de +++) en quienes evaluamos la morfología faríngea mediante la comparación de fotografías tomadas en fase (Figura 9).

Encontramos que la cepa 2 presentó el metacarpus redondo característico de *C. elegans*.

Si bien esta forma de faringe es característica del género *Caenorhabditis*, no necesariamente implica que el nematodo aislado pertenece a la especie *elegans*.

Para evaluar características más específicas, desarrollamos un análisis por PCR, utilizando un set de primers que amplifican el gen *glp-1*. El tamaño de los amplicones que generan permite diferenciar entre *C. elegans* y sus dos especies más relacionadas *C. remanei* y *C. briggsae* (Ver materiales y métodos). En primer lugar, se realizó la lisis de 20 individuos de la cepa 2, utilizando como control positivo a N2 y a la cepa Hawaiana CB4856 (que fue empleada en el resto de esta tesina como control con el fin de proveer información genotípica y fenotípica de una cepa silvestre), y como control negativo una muestra de agua ultrapura. Además, se sometieron a lisis tres cepas de las aisladas en una primera instancia, las cuales suponíamos que no pertenecían a la especie *elegans*. Estas últimas fueron las cepas 4, 6 y 9,

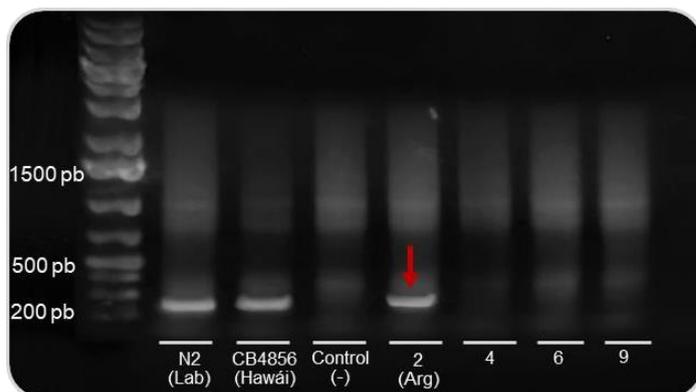


Figura 10. Gel de electroforesis mostrando en la primera calle un marcador de peso molecular, y en las 4 siguientes la corrida de ácidos nucleicos de la cepa estándar N2, la cepa hawaiana CB4856, un control negativo (agua ultra pura) y la cepa argentina aislada del compost (Cepa 2) a quien denominamos OAR137. Las siguientes calles corresponden a las cepas 4, 6 y 9 aislados del suelo, no correspondientes a *C. elegans*. La flecha roja indica la banda en aproximadamente 208pb característica de la especie *C. elegans* en nuestra cepa argentina, presente también en los dos controles positivos (N2 y CB4856).

dando un total de 7 calles en los geles de electroforesis posteriormente armados. Se decidió utilizar como marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus de Thermo Scientific™ SM1343, para facilitar la identificación de los productos. Este se visualiza en la primera calle del gel desarrollado (Figura 10).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20µl (Ver materiales y métodos). Las temperaturas y tiempos utilizados en cada paso de PCR fueron detalladas en materiales y métodos. Los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% y

sometidos a electroforesis a 70-80V como se describió en materiales y métodos. Tanto las muestras como el marcador de peso molecular fueron sembrados en las distintas calles, con el agregado previo de Loading Buffer para poder visualizar el frente de corrida. Pasados 30 minutos se frenó la corrida y se reveló bajo luz ultravioleta, observándose los resultados en la figura 10. Como se puede ver, tanto los controles positivos como nuestra cepa incógnita presentan un fragmento amplificado en 208pb (banda típica de *C. elegans*), ausente en los demás controles. Este ensayo es una evidencia muy fuerte de la pertenencia de la cepa aislada (Cepa 2) a la especie *C. elegans*, quien de ahora en más denominamos como OAR137. Se sugiere, además, que el resto de las cepas no pertenecen a *C. remanei* ni *C. briggsae* ya que no se observan los perfiles moleculares ni los amplicones típicos definidos por la Wormbase (391pb y 302pb respectivamente). Lamentablemente no teníamos estas especies de nematodos disponibles en el laboratorio durante el desarrollo de esta tesina para utilizarlos como controles. Mas allá de este inconveniente, la presencia de una banda de 208pb es una evidencia de que la cepa 2 (OAR137) pertenece a la especie *C. elegans*.

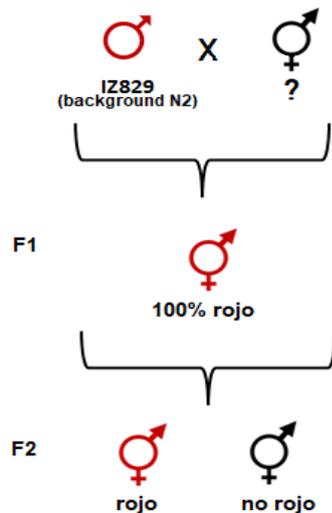


Figura 12. Esquema de las cruces sexuales desarrolladas entre hermafroditas de la cepa incógnita aislada del suelo argentino, con machos de laboratorio que expresan fluorescencia roja en sus neuronas Gabaérgicas. Se muestra además la F1 y F2 esperadas en caso de una cruce sexual fértil exitosa.

Dado que una especie se define formalmente por la capacidad de dar progenie fértil en un cruce, realizamos cruces entre hermafroditas vírgenes de la cepa incógnita y machos de laboratorio de la cepa IZ829, que expresan fluorescencia roja en sus neuronas Gabaérgicas (Figura 11). Estos animales transgénicos se obtuvieron en el laboratorio del Dr. Francis en la Universidad de Massachussets por microinyección de la construcción, y posterior incorporación al genoma de la cepa N2, del constructo *Punc-47::mcherry* (56). Para llevar a cabo la cruce sexual, colocamos en una misma placa 2 larvas L4 hermafroditas de la cepa silvestre con 7 machos de laboratorio IZ829. Debido a que *C. elegans* tiene la capacidad de autofecundarse, el hecho de observar machos en la descendencia asegura el cruce sexual de la cepa silvestre con N2. Sin embargo, dado que se emplearon para el ensayo machos fluorescentes, la presencia de descendencia roja ya indica de por sí una cruce sexual exitosa. Para comprobar la fertilidad del cruce sexual, se aislaron en nuevas placas

hermafroditas vírgenes rojos de la F1, y siguiendo nuestra hipótesis, si la progenie es fértil se espera al cabo de unos días encontrar descendencia. Para poder visualizar los resultados preparamos un fijado para microscopio siguiendo el protocolo detallado en el apartado materiales y métodos, obteniendo la figura 12. Como se puede ver en la foto, el cruce sexual fue fértil, observándose individuos fluorescentes y no fluorescentes en la F2. La presencia de progenie fértil derivada tanto de autofecundación como de cruces sexuales, nos indica que el nuevo aislamiento silvestre pertenece a la misma especie que la cepa de prueba, en este caso N2, por lo tanto, se confirmó finalmente el aislamiento de una cepa de *C. elegans*

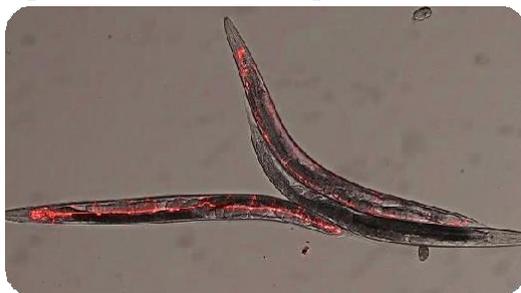


Figura 11. Microscopía de fluorescencia (10X) de la F2 derivada del cruce sexual entre hermafroditas de la cepa salvaje OAR137 y machos de laboratorio N2. La presencia de un alto porcentaje de nematodos expresando *m-cherry* indica que la F1 obtenida de la cruce fue fértil y confirma que los nematodos de ambas cepas pertenecen a la misma especie.

argentina (designado como OAR137). Para no dejar dudas de la posibilidad de fecundación entre ambas cepas y corroborar el ensayo realizado, se ejecutó la cruz recíproca con machos de la cepa silvestre y hermafroditas del laboratorio, para la cual se siguió el protocolo de obtención de machos descrito en materiales y métodos. Esta segunda prueba también resultó positiva, observándose machos en la F1 y en la F2, asegurando así que la nueva generación no derivó únicamente de una autofecundación.

Una vez cumplido el objetivo general de aislar una

nueva cepa de *C. elegans* argentina, criopreservamos la cepa 2 (OAR137) en las instalaciones de nuestra

institución para futuros estudios. Para este fin se siguió el protocolo de congelamiento visto en materiales y métodos utilizando larvas L1.

Debido a que ya encontramos una cepa con la que trabajar, y a la dificultad de mantener tantas poblaciones en simultáneo, decidimos congelar y guardar a -80°C otras cepas aisladas no pertenecientes a la especie *C. elegans* para utilizar en futuras investigaciones, que quedan fuera del alcance de la tesis. Dado que existen en un banco, denominado Caenorhabditis Genetic Center (CGC), cepas de nematodos *Caenorhabditis sp.* y otros disponibles, se podrían realizar el mismo tipo de cruza que el descrito en párrafos previos, con el objetivo de identificar la especie. Esta identificación de cepas “no *C. elegans*”, también escapa a los alcances de nuestra tesis dado los tiempos que se necesitarían para que estas cepas lleguen a nuestra ciudad.

Objetivo 2

Una vez finalizado el objetivo específico 1 nos propusimos cuantificar y comparar distintos fenotipos con la cepa estándar de laboratorio.

Con el objeto de brindar información fenotípica acerca de la nueva cepa aislada, se realizaron una serie de ensayos ya descritos para la cepa estándar N2. Si un fenotipo específico es distinto entre la cepa aislada y N2, es muy posible que haya diferencias moleculares que expliquen esta variación. Por lo tanto, esta información combinada con estudios fenotípicos más profundos y análisis genéticos podría ser útil para identificar nuevas vías y mecanismos moleculares.

Características cualitativas y cuantitativas de la cepa aislada.

Para poder caracterizar la nueva cepa aislada, los experimentos se desarrollaron en la cepa estándar N2, en la cepa hawaiana CB4856 (empleada como control de una cepa salvaje) y en la cepa argentina OAR137.

Tapón copulatorio. En varias placas conteniendo hermafroditas y machos de la cepa salvaje OAR137, observamos la presencia de una masa gelatinosa en la vulva de los hermafroditas (Figura 13). Analizando esto con más detalle, determinamos que los machos de la cepa aislada al aparearse con hermafroditas de cualquier cepa, es decir tanto de la propia como con N2 (u otras), dejan un material gelatinoso sobre la vulva del animal receptor. Este depósito mucoso, descrito en la bibliografía como tapón copulador (39; 47), también se observa en apareamientos utilizando machos de la cepa CB4856, pero no cuando se utilizan machos de la cepa N2 (Figura 13).

La formación de tapones copulatorios está ampliamente distribuida a lo largo de los distintos grupos biológicos. Esta propiedad ha sido descrita tanto en vertebrados mamíferos, aves y reptiles, como en



Figura 13. Formación del tapón copulatorio. Fotografías tomadas bajo lupa de disección de los hermafroditas N2 luego de aparearse con machos N2 (Izquierda), CB4856 (centro), o OAR137 (Derecha). Obsérvese que en la primer fotografía desde la izquierda no hay rastro de material de taponamiento sobre la vulva; Tanto en la segunda como en la tercer fotografía (CB4856 y OAR137 respectivamente) hay una gran masa gelatinosa sobre la vulva (flecha roja), el tapón copulatorio.

invertebrados (57). Incluso ya fue registrado para *C. elegans* (39; 47). En la naturaleza existen distintas estrategias reproductivas que pueden ser empleadas por los machos para evitar

que las hembras copulen múltiples veces, el uso de un tapón copulatorio podría cumplir con esta función. Varios autores demuestran que los tapones copulatorios son empleados para bloquear la apertura genital o el tracto reproductivo de la hembra, evitando la competencia espermática o incluso para evitar la pérdida de los espermatozoides (58; 57). Sin embargo, en *C. elegans* no parece cumplir la misma función general de ofrecer una ventaja notable a machos con este fenotipo, como ocurre para la mayoría de los grupos en los que ha sido estudiado (39). Mas allá de la verdadera función de esta propiedad en la naturaleza, encontramos que, al igual que otras cepas salvajes de *C. elegans*, los machos de OAR137 (así como los de CB4856) depositan en los hermafroditas un tapón copulatorio tras el cruce sexual. Al igual que N2, varias cepas silvestres aisladas en Europa y Norte América también han perdido este fenotipo debido a la inserción de un retrotransposón en un exón de un gen similar a la mucina, *plg-1*, cuyo producto es un componente estructural importante del tapón copulatorio (47). Esto indica que la ausencia de tapón copulatorio en la cepa de laboratorio, no se asocia con su adaptación al mismo.

Agregación poblacional o clumping. Otra característica descriptiva observada en la nueva cepa aislada está relacionada a su comportamiento social. La mayoría de los comportamientos animales son variables dentro y entre especies, en parte debido a variación genética entre individuos y a factores medioambientales. De igual manera a lo observado en nuestras cepas, estudios previos resaltan en las poblaciones formadas por cepas salvajes una notable agregación de individuos en los bordes de las placas (Figura 14) (13; 59). Esta propiedad está ausente en la cepa de laboratorio N2, quienes depositan sus huevos de manera dispersa y relativamente uniforme a lo largo de la bacteria. Esta característica diferencial está directamente asociada a la concentración de oxígeno atmosférico en las placas de agar. Se sabe que las placas presentan un nivel de oxígeno mucho mayor que los preferidos por las cepas silvestres, volviéndose una fuerte presión de selección sobre el organismo, afectando al crecimiento y a la fisiología del animal que se desplazan al borde de la bacteria (zona de la placa con menor % de oxígeno) (13). La agregación de animales disminuye aún más la concentración local de oxígeno permitiendo la supervivencia. Por su parte, la cepa N2 es menos sensible a las concentraciones de oxígeno y no se agrega a los bordes del césped bacteriano (Figura 14). Se especula que esta conducta de

agregación podría ser importante para favorecer la reproducción, la comunicación interindividual y la defensa contra patógenos(60).

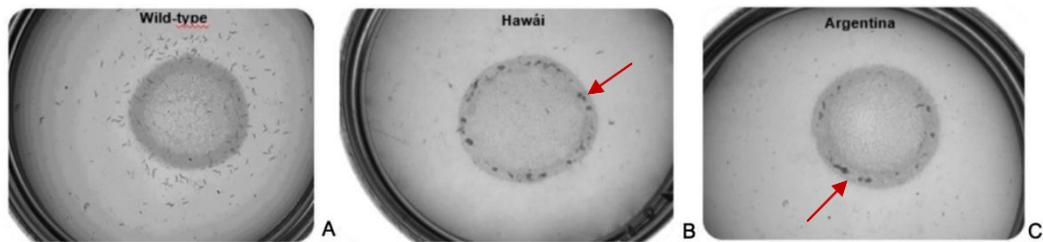


Figura 14. Se muestran los patrones poblacionales típicos de distintas cepas del nematodo *C. elegans*. (A) Obsérvese la dispersión de individuos a lo largo de la placa de cultivo, característico de la cepa estándar de laboratorio N2. (B) y (C), en ambas poblaciones silvestres (CB4856 y OAR137 respectivamente) se puede visualizar la agregación de individuos en los bordes de la bacteria (círculo gris en el centro de las placas) señalados con una flecha roja.

Puesta de huevos por hora. Otro parámetro sencillo que evaluamos, esta vez de forma cuantitativa, fue la velocidad de puesta de huevos de la nueva cepa aislada. Para ello aislamos gusanos grávidos sincronizados por edad (24hs post-L4) y luego de tres horas los extrajimos de las placas de NGM. Para

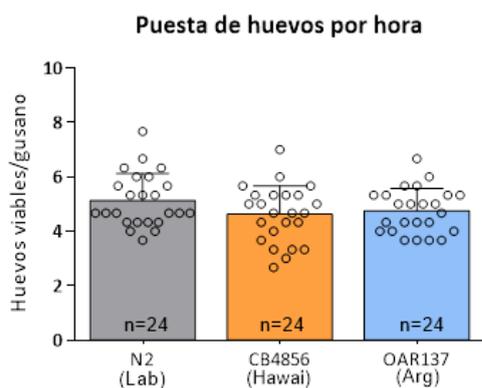


Figura 15. Promedio y desvío estándar de la puesta de huevos por hora en cada una de las cepas evaluadas: N2 en gris, CB4856 en naranja y OAR137 en celeste.

visualizar posibles diferencias en la oogénesis y en el tiempo de puesta entre huevos, se contó el número de huevos de cada placa en cada una de las cepas de referencia, siguiendo el protocolo descrito en la sección materiales y métodos. El promedio por hora por gusano fue de $5,139 \pm 0,987$ para la cepa N2, $4,625 \pm 1,046$ para CB4856, y $4,750 \pm 0,824$ para OAR137 (SP, $n = 24$) como se observa en la figura 15. Estas puestas promedio no varían significativamente entre grupos bajo las condiciones de cultivo empleadas ($P = 0,160$, test de ANOVA).

Ensayo Cantidad de Progenie o Brood size. Debido a que, bajo condiciones normales, *C. elegans*

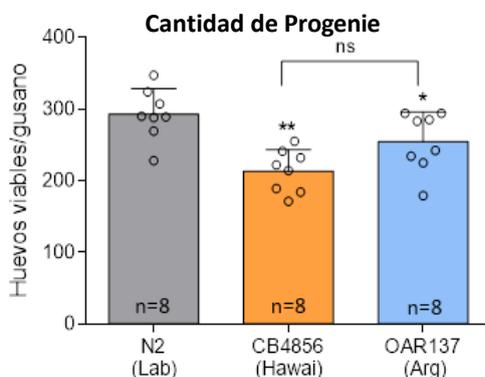


Figura 16. Promedio y desvío estándar de la puesta total de huevos por individuo. N2 en gris, CB4856 en naranja y OAR137 en celeste.

se reproduce por autofecundación, el número de huevos puestos por individuo a lo largo de su vida depende directamente del número de espermias que estos poseen. Típicamente un hermafrodita de N2 (no fecundado por un macho) deja una descendencia aproximada de 300 individuos (2). Para evaluar una posible diferencia en este parámetro entre las cepas silvestres y la cepa adaptada al laboratorio, medimos el número promedio de progenie siguiendo el método de conteo descrito en

materiales y métodos. Específicamente,
aislamos

gusanos hermafroditas juveniles (antes de que comiencen a dejar descendencia, estadio L4) de las distintas cepas y las replicamos en nuevas placas cada 24 horas, por un total de 6 días. Luego cuantificamos la descendencia contando la cantidad de larvas presentes en cada placa. Como se puede visualizar en el gráfico de barras de promedios, ninguna de las cepas deja una descendencia menor a 171 individuos, ni mayor a 347 (Figura 16). Esta característica ha sido descrita también por otros autores, quienes mencionan la posible vía de selección de este parámetro (51). Presentar mutaciones que aumenten el número de espermatogénesis no es ventajoso porque este proceso está asociado a un retraso en el de la ovogénesis y consecuentemente, a un incremento en el tiempo de generación de huevos dando como consecuencia un crecimiento lento de la población. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los hermafroditas de N2 producen consistentemente un mayor número de progenie que las demás cepas testeadas. Mientras que N2 presenta un promedio de progenie viable de $292,75 \pm 35,704$, CB4856 y OAR137 depositan en promedio $213,50 \pm 29,689$ y $254,50 \pm 41,421$ huevos viables respectivamente (S.P., $n = 8$) (Figura 16). Encontramos diferencias altamente significativas entre la cepa de laboratorio N2 y la cepa hawaiana CB4856 ($P < 0,001$, test de ANOVA) y diferencias significativas entre N2 y la cepa argentina OAR137 ($P < 0,05$, test de ANOVA).

Para complementar los dos ensayos realizados, se decidió, además, cuantificar la progresión de la puesta de huevos a lo largo de los días testeados (Figura 17). El hecho de no encontrar diferencias en la puesta de huevos por hora durante el primer día de fertilidad, pero sí en la cantidad promedio de progenie por individuo hermafrodita, nos llevó a hipotetizar que la diferencia observada en el número promedio total de progenie deriva de la presencia de un mayor periodo fértil en N2.

Al cuantificar la progenie total como la suma de larvas emergidas por día, el experimento nos brinda información del porcentaje de descendencia total depositada a lo largo de cada uno de los días del periodo de puestas, obteniendo datos de la posible estrategia reproductiva de cada cepa (Figura 17). Si bien en todas las cepas el máximo de progenie se da temprano, en el día 2, es importante tener en cuenta

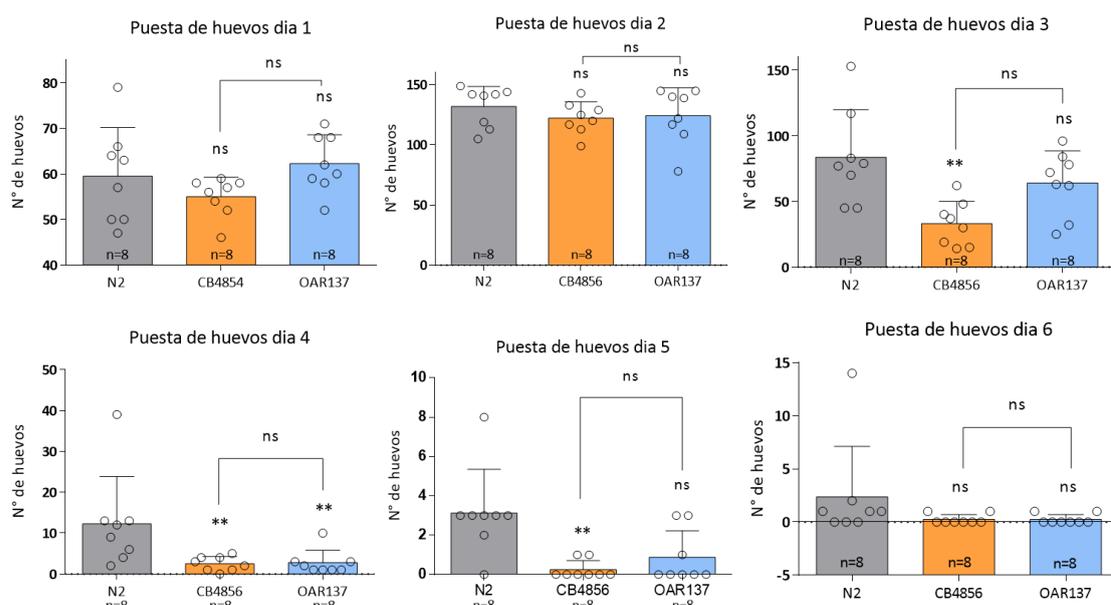


Figura 17. Promedio y desvío estándar de la puesta total de huevos por individuo a lo largo de los 6 días de deposición. N2 en gris, CB4856 en naranja y OAR137 en celeste.

que la cuantificación del día 1 está subestimada dado que durante gran parte de ese día los animales eran todavía inmaduros (los aislamos como L4, y necesitan varias horas para empezar a poner huevos). Según nuestro análisis, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para los dos primeros días. Esto sugiere que en la naturaleza prevalece la estrategia reproductiva R-selected para *C. elegans*, y, por lo tanto, es de esperar la compensación a favor de crías tempranas, en lugar de más grandes. Sin embargo, a partir del tercer y cuarto día, la cepa estándar N2 deja mayor cantidad de progenie, que CB4856 y OAR137 respectivamente ($p < 0,05$, test de ANOVA). Esta observación es similar a lo registrado por otros autores (51): N2, adaptado al laboratorio, presenta un periodo fértil más amplio en relación a las dos cepas salvajes, y es esta la posible causa del mayor número de progenie promedio observado.

Resistencia a estrés. Con el fin de evaluar la resistencia al estrés oxidativo, analizamos la supervivencia de las cepas a la exposición del agente oxidante sulfato de hierro (FeSO_4) agregado en las placas de cultivo. Como se describió en materiales y métodos, se transfirieron alrededor de 25 gusanos L4 de cada cepa a testear, a placas de agar de 35mm que contenían FeSO_4 en una concentración 10mM, y se los dejó actuar por 1 hora. Pasado el tiempo, se puntuó el porcentaje de animales muertos, considerados como aquellos que ante 3 toques con el pick de platino en su cabeza y cola no respondieron con ninguna clase de movimiento. Como se observa en la figura 18, la medición de supervivencia en la cepa de laboratorio N2 da un valor promedio general de $0,389 \pm 0,143$ (S.P., $n=9$). Para las cepas CB4856 y OAR137 este parámetro es de $0,608 \pm 0,0787$ (S.P., $n=9$) y $0,621 \pm 0,0954$ (S.P., $n=9$)

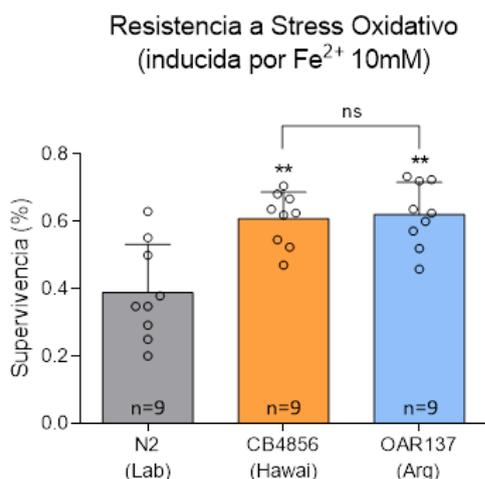


Figura 18. Porcentaje de supervivencia al estrés oxidativo y el desvío estándar correspondiente. Éste fue medido para cada individuo luego de permanecer 1 hora en contacto con una solución de hierro 10mM. Se realizaron un total de 9 determinaciones en 3 días distintos, utilizándose alrededor de 30 animales para cada ocasión. N2 en gris, CB4856 en naranja y OAR137 en celeste.

respectivamente. Por comparación mediante análisis estadístico (One Way ANOVA, Holm-Sidak method), se obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas salvajes (CB4856 y OAR137) y N2 ($P < 0,001$). Sin embargo, el análisis para las cepas CB4856 y OAR137 no muestra diferencias significativas entre sus valores medios ($P = 0,808$). Podemos concluir que las cepas salvajes tienen mayor capacidad de resistir el estrés oxidativo que la cepa N2. Es posible que la ausencia de condiciones estresantes durante el cultivo en el laboratorio haya aliviado la presión de selección sobre los genes implicados en la resistencia a estrés (Ver discusión).

Alimentación. Ha sido ya largamente establecido, no sólo en *C. elegans* sino en levaduras y vertebrados, que la restricción dietaria (sin llegar a la malnutrición), aumenta el tiempo de vida y la resistencia a estresantes ambientales de los organismos (61; 62; 63). En *C. elegans*, por ejemplo, mutantes en el gen que afecta la funcionalidad faríngea, hace que los animales entren en restricción dietaria, llevando a un aumento de más del 30% en su supervivencia y capacidad de resistir estresantes (64). Sin embargo, la restricción dietaria tiene un costo: la disminución de la capacidad reproductiva (65). Dado el perfil que observamos en la cepa silvestre OAR137 (Reducida cantidad de progenie y aumentada capacidad de resistencia contra estrés oxidativo), surge la hipótesis de que quizás estos animales estén en un estado similar a la restricción dietaria. Como resulta obvio, la forma más natural de llegar a la restricción dietaria es limitando la cantidad de alimento ingerido. Es por ello que medimos la ingesta de alimento en las cepas salvajes (CB4856 y OAR137) y la cepa N2 ampliamente utilizada en el laboratorio. Para ello utilizamos una bacteria *E. coli* transformada con un plásmido conteniendo el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y un gen de resistencia al antibiótico ampicilina. La bacteria fluorescente consumida por los gusanos se puede visualizar en el intestino de los animales y cuantificar fácilmente bajo microscopia de fluorescencia. 24hs previas al ensayo se transfirieron 40 gusanos L4 de cada una de las cepas a testear en placas con bacteria OP50 común (sin GFP) como fuente de alimentación para que estos estén bien alimentados (Ver materiales y métodos). Al día siguiente, se colocaron estos mismos individuos (ya adultos de estadio 1) en placas de NGM que contenían ampicilina sembradas con la bacteria que expresa GFP, por 5 minutos. Luego se montaron estos animales en pads de agarosa y se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia. El análisis y la cuantificación de la fluorescencia intestinal se realizó mediante la utilización del software Image J FIJI. Como se observa en la figura 19, no observamos diferencias significativas en la cantidad de bacteria fluorescente en el intestino entre las tres cepas. Esto sugiere que la ingesta alimenticia es comparable entre las cepas salvajes y la cepa silvestre, y no es esta la razón de las diferencias observadas en la fertilidad y la respuesta a estrés.

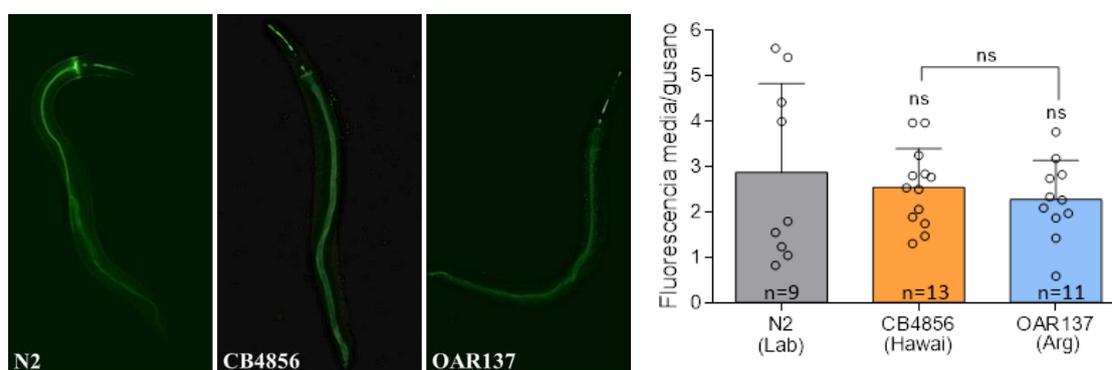


Figura 19. Izquierda. Fotografías (aumento 10X) de animales alimentados con *E. coli* OP50-GFP (fluorescencia verde) durante 5 minutos. Nótese la fluorescencia en el tubo digestivo. **Derecha:** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en el tubo digestivo. El análisis estadístico aplicado indica que no hay una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0,859$) entre todos los grupos testeados.

Thrashes. Para evaluar la locomoción en medio líquido se estudió en las cepas de interés un parámetro de movilidad de los nematodos conocido como “thrashes” (54). Para llevarlo a cabo se

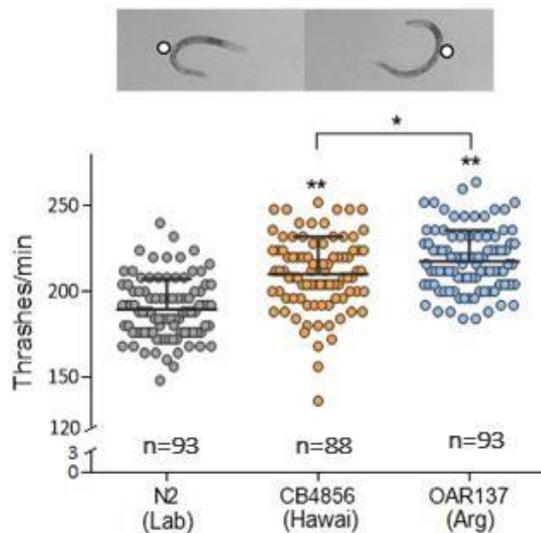


Figura 20. Arriba: Cambio de curvatura en medio líquido denominado “thrash”. Este fenotipo se utiliza como parámetro de locomoción. **Abajo.** Promedio y desvío estándar del número de “thrashes” por minuto. N2 en gris, CB4856 en naranja y OAR137 en celeste.

utilizaron placas de 96 pocillos con fondo cóncavo en donde se colocó un gusano por pocillo en 200µl de medio líquido M9. Luego de 6 minutos de habituación, se cuantificó el número de cambios de curvatura que sufre la parte media del cuerpo del animal durante un período de 30 segundos. El gráfico resultante muestra que, de manera significativa, la cepa OAR137 presenta cambios más rápidos en su curvatura en relación a las demás cepas testeadas (Figura 20). La medición de thrashes por minuto de la cepa de laboratorio N2 da un valor promedio general de $189,505 \pm 17,712$ (S.P., n=93). Para las cepas CB4856 y OAR137 este parámetro es de $210,273 \pm 21,628$ (S.P., n=88) y $217,677 \pm 18,114$ (S.P., n=93) respectivamente. Por comparación mediante análisis estadístico, se

obtuvieron diferencias altamente significativas entre las cepas salvajes (OAR137 Y CB4856) y la cepa estándar de laboratorio ($p < 0,01$, test de ANOVA), e incluso diferencias significativas entre las dos cepas silvestres (OAR137 Y CB4856) ($p = 0,010$, test de ANOVA). Este componente argumenta a favor de la similitud entre cepas salvajes y la posible adaptación y alteración genética de N2 en el laboratorio. Además, la hiperactividad en líquido que presenta la cepa aislada en Argentina es un parámetro de potencial relevancia en estudios relacionados a la transmisión neuromuscular.

Levamisol. Con el propósito de complementar el ensayo anterior y conocer si existe una alteración en la transmisión neuromuscular, se evaluó la movilidad de las distintas cepas bajo el efecto del compuesto agonista de los receptores nicotínicos musculares levamisol. En las sinapsis químicas, la exocitosis de un neurotransmisor de la neurona presináptica da como resultado la activación de los receptores postsinápticos y finalmente conduce a la excitación o inhibición de la célula postsináptica. Al igual que los mamíferos, *C. elegans* usa acetilcolina (ACh) para controlar la contracción muscular. La ACh liberada de las neuronas motoras colinérgicas hacia la hendidura sináptica activa los receptores colinérgicos ionotrópicos en el músculo de los nematodos, lo que lleva a la entrada de calcio al músculo y, por lo tanto, a la contracción. Levamisol, una droga utilizada como nematocida en el tratamiento de parasitosis, ejerce su efecto terapéutico activando uno de los dos tipos de receptores colinérgicos en los

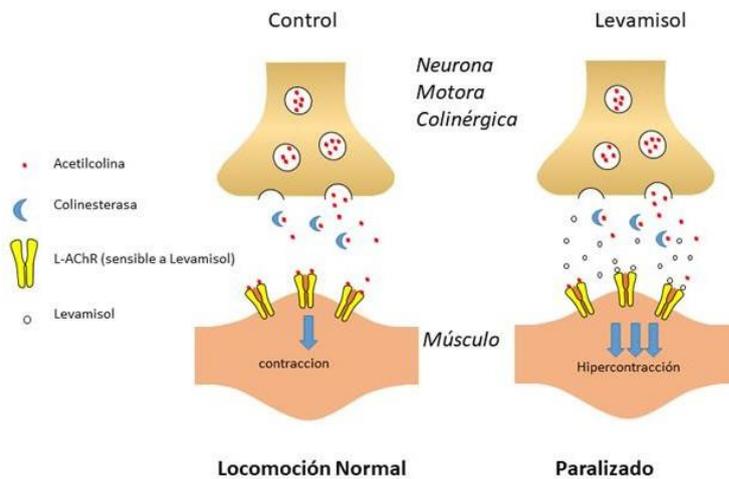


Figura 21. En la unión neuromuscular de los nematodos la liberación de acetilcolina permite la contracción del músculo y el movimiento. El agente nematocida levamisol produce una hiperactivación de los receptores de ACh en el músculo produciendo parálisis espástica y muerte.

músculos de la pared corporal produciendo hipercontracción muscular y parálisis de la mayoría de los nematodos, incluido *C. elegans* (Figura 21) (66; 67; 55).

Para conocer de manera general la posible existencia de alguna diferencia en la transmisión neuromuscular, se colocaron individuos adultos de estadio en placas que contenían 0.5mM de levamisol, y se analizó, luego de 75 minutos, el

número de nematodos paralizados (Para más detalles, ver la sección materiales y métodos). La parálisis fue definida como la pérdida de movimiento en respuesta al toque con un hilo de platino tres veces en la parte anterior y posterior del cuerpo. A partir de este ensayo farmacológico se obtuvo la figura 22. Como se puede observar en el gráfico, encontramos diferencias significativas entre la cepa de laboratorio

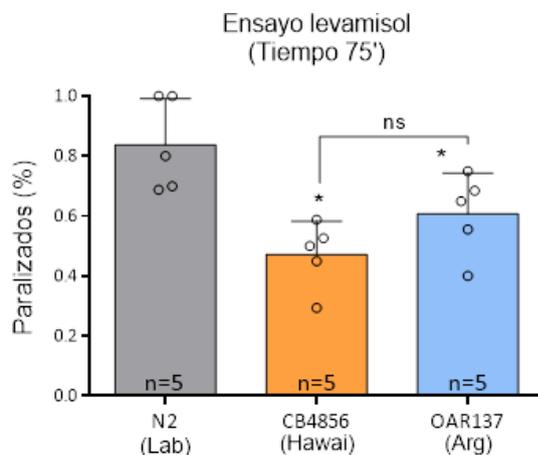


Figura 22. Porcentaje de parálisis inducida por el agonista de los receptores nicotínicos musculares, levamisol para las tres cepas testeadas. En el gráfico se muestran la media y el desvío estándar.

N2 y ambas cepas salvajes (CB4856 y OAR137) ($p < 0.05$). Sin embargo, no se hallaron diferencias entre estas últimas. Esta resistencia a levamisol nunca había sido reportada en ninguna cepa silvestre. Estos resultados podrían estar indicando la existencia de diferencias a nivel neuromuscular, ya sea en los receptores musculares o en las cascadas río abajo de estos. Esperamos en un futuro poder complementar el ensayo con el uso de la droga aldicarb (inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa), y conocer concretamente el nivel pre o postsináptico de estas diferencias observadas.

DISCUSIÓN

Los organismos modelo son necesarios para identificar mecanismos moleculares fundamentales, muchos de los cuales presentan gran implicancia biomédica, y también para avanzar en el entendimiento de los procesos evolutivos. La mayoría de las investigaciones realizadas sobre *C. elegans* ha abordado las propiedades de este animal en un único entorno de laboratorio. Dado que el protocolo estándar de congelamiento de cepas surgió varios años después del primer aislamiento, la cepa salvaje N2 ha acumulado mutaciones, que dieron origen a un fenotipo disímil al hallado en la naturaleza (39). En los últimos años, varios investigadores han dedicado sus esfuerzos al estudio de cepas salvajes de *C. elegans* con el objeto de poder evaluar fenotipos que resultan enmascarados en la cepa estándar de laboratorio. En este trabajo contribuimos a esta idea aislando una nueva cepa del nematodo en los suelos de nuestra región y evaluando sus principales propiedades fenotípicas para verificar el grado de similitud con N2. En este punto, es importante mencionar que, si bien mandamos a secuenciar el genoma de nuestra cepa, al día de hoy no tenemos los resultados, lo que impide conocer el origen evolutivo de la cepa aislada. *C. elegans* es principalmente un colonizador de hábitats ricos en microbios, incluyendo materia orgánica en descomposición, donde los recursos son finitos y se agotan rápidamente. Por lo tanto, existe una posibilidad de que la cepa aislada en Argentina haya sido transportada en sus orígenes en alguna embarcación asociada a cultivos agrícolas del exterior. Incluso, hay registros de que *C. elegans* media interacciones positivas entre las plantas leguminosas y las bacterias *rhizobium*, y por lo tanto juega un rol importante en la rizosfera (68; 69). Sin embargo, independientemente de su procedencia exógena o autóctona, nuestros datos son de utilidad para avanzar en el entendimiento de procesos altamente conservados, así como facilitar el estudio de preguntas biológicas fundamentales.

Aislamiento de una cepa perteneciente a la especie *C. elegans*.

El aislamiento de más de 40 nematodos a partir de un solo muestreo nos indicó que el método utilizado para este fin fue satisfactorio (Agar culture plate method). A pesar de la simpleza de la técnica, el principal inconveniente radica en la gran contaminación de los aislamientos obtenidos, ya que estos permanecen en contacto con restos de materia vegetal y otros microorganismos presentes en el suelo, para lo que, en la mayoría de los casos, es necesario aplicar un protocolo de descontaminación. Esta dificultad menor se podría haber evitado con técnicas alternativas descritas en la bibliografía como la del Embudo de Baermann, particularmente útil en el caso de querer obtener nematodos que no son atraídos por la bacteria *E. coli*, o cuando se los requiere libre de esta (16). Sin embargo, considerando el éxito del método de placas de agar, el uso casi obligatorio de la técnica de Bleaching para descontaminar no debería ocasionar una dificultad extra en el aislamiento de los nematodos de interés.

Identificación de la especie *elegans*.

Para aproximarnos a la detección del género *Caenorhabditis*, comparamos observaciones de la velocidad de crecimiento, tamaño de individuos y presencia de hermafroditas entre los aislamientos y dibujos de nematodos ya publicados en la web (16).

Esta identificación fue completamente visual, teniendo por sí, un margen de error dado por la subjetividad del método. Sin embargo, luego de seleccionarse las cepas más similares a *C. elegans*, confirmamos su pertenencia a la especie *elegans* mediante un análisis por PCR y cruces sexuales utilizando cepas de especies conocidas del género (16). Los cruces son los métodos de elección para identificar formalmente una especie dentro del género *Caenorhabditis*, ya que según su definición una especie se delimita por la capacidad de dar progenie fértil en cruce (70). Habiendo resultado positiva la cruce sexual, evidenciada por progenie con el marcador fluorescente empleado, y además confirmando la fertilidad de esta, no hay lugar a dudas que el nematodo aislado en el territorio argentino pertenece a la especie buscada. Como se mencionó anteriormente, es verdad que no podemos afirmar su origen, es decir si realmente es un nematodo argentino o si este llegó a nuestro territorio en alguna embarcación o algún otro transporte. Para esto deberíamos realizar análisis evolutivos que no son el punto de enfoque de nuestra investigación. Esperamos en un futuro próximo poder contar con la secuencia genética de la cepa de *C. elegans* aislada para comparar, mediante análisis bioinformáticos, la secuencia de genes con la de otros nematodos salvajes aislados en distintos sectores del mundo. Conocemos, e incluso ya aceptaron nuestro ejemplar, un centro que recolecta nematodos salvajes de *C. elegans*, se encarga de secuenciar sus genomas, y dispensa cepas a los investigadores que las requieran (Centro *Caenorhabditis elegans* Natural Diversity Resource (CeNDR), <https://www.elegansvariation.org/>). De esta manera se podrán detectar la función de genes de fenotipo enmascarado en el nematodo de rutina N2.

Caracterización fenotípica del aislamiento.

En nuestro estudio fenotípico utilizamos como controles a la cepa canónica N2 y a CB4856 (Hawái), cepa salvaje considerada una de las más divergentes de la cepa estándar de laboratorio N2 (71). La utilización de la cepa hawaiana, que ya fue evaluada en algunos fenotipos por otros laboratorios, junto con N2 como controles, nos permite corroborar los resultados de nuestros ensayos con la bibliografía existente, para asegurarnos que los experimentos fueron correctamente desarrollados. Este doble control aumenta significativamente la validez de los hallazgos en nuestra cepa incógnita OAR137. Cómo es de esperar, la cepa OAR137 presenta fenotipos mucho más cercanos a la cepa silvestre CB4856 que a la cepa de uso corriente N2, remarcando la ya mencionada adaptación al laboratorio de esta última.

Ensayos de reproducción.

Nuestro estudio de las puestas de huevo en 1 hora mostró, en primer lugar, que la cepa canónica N2 utilizada en nuestro laboratorio deposita un promedio de 5 huevos por hora, concordando con la

bibliografía existente (72). Encontramos, a su vez, que no existen diferencias significativas en la velocidad de puesta de huevos entre las 3 cepas testeadas.

También evaluamos la progenie total de cada cepa. Debido a que, bajo condiciones normales, *C. elegans* se reproduce por autofecundación, el número de huevos puestos por individuo a lo largo de su vida depende directamente del número de espermatozoides que estos poseen, que actúa de esta manera como limitante. Típicamente un hermafrodita de N2 (no fecundado por un macho) deja una descendencia aproximada de 250-300 individuos (2; 13). Si bien el número de huevos de las cepas testeadas ronda entre los valores presentados en la bibliografía, nuestro ensayo de cantidad de progenie probó que los hermafroditas de N2 producen consistentemente un mayor número de progenie que las demás cepas testeadas. Mientras que N2 presenta un promedio de progenie viable de $292,75 \pm 35,704$, CB4856 y OAR137 depositan en promedio $213,50 \pm 29,689$ y $254,50 \pm 41,421$ huevos viables respectivamente (S.P., $n = 8$). Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Hodgkin (1991), quien ve posible que el “brood size” de especies salvajes es considerablemente diferente al de la cepa N2. Como mencionamos, la cepa de Bristol estuvo en cultivo de laboratorio por décadas antes de ser utilizada como la cepa salvaje de referencia de los genetistas, y puede, por lo tanto, no ser representativa de las poblaciones naturales. El cultivo continuo de poblaciones puede llevar a la fijación de mutaciones espontáneas, especialmente cuando éstas no suponen una desventaja selectiva en condiciones de laboratorio (73). En este caso, es posible que las condiciones favorables del laboratorio (disponibilidad constante de alimento, ausencia de estresantes abióticos, ausencia de predadores y competidores) haya ejercido una presión selectiva sobre genes que aumentan la capacidad reproductiva (ver más adelante). Dado que el número de crías de la autoprogenie viene determinado por el número de espermatozoides, y que, por lo tanto, la mayoría de los ovocitos permanecen sin fecundar, podría parecer selectivamente ventajoso aumentar el número de espermatozoides y en consecuencia de la progenie. Sin embargo, varios autores probaron la desventaja de este proceso. Un aumento de espermatozoides está asociado a un retraso en el inicio de la ovogénesis y consecuentemente, a un incremento en el tiempo de generación entre huevos dando como resultado un crecimiento lento de la población. Un aumento en el tamaño de puesta es por lo tanto un carácter que puede ser seleccionado en contra (74; 51; 73). En este sentido, diversos autores concuerdan en la existencia para varias especies, desde invertebrados a vertebrados superiores, de un número óptimo de cría (75; 76; 77).

El hecho de no encontrar diferencias en la velocidad de puestas de huevos por hora durante el primer día de fertilidad, pero si en la cantidad promedio de progenie total por individuo hermafrodita, nos llevó a hipotetizar que el tiempo fértil de la cepa N2 es más largo que en las cepas silvestres. Para ello evaluamos la progresión de la deposición a lo largo de los días testeados. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los grupos para los primeros días (coincidiendo con el ensayo de huevos en 1 hora en el primer día de puesta), a partir del tercer día, se empiezan a visualizar diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de huevos. Las cepas salvajes dejan de oviponer alrededor del cuarto día, mientras que la cepa de laboratorio continúa por algunos días más, confirmando nuestra hipótesis. La deposición más prolongada en N2 ha sido observada también por otros autores

quienes además encontraron, al igual que lo observado por nosotros, que los hermafroditas de la cepa de laboratorio alcanzan un pico de producción de progenie en el día 2 de la edad adulta luego del cual muestran un declive (78). Independientemente del número promedio, todas las cepas de *C. elegans* depositan la mayor cantidad de huevos los primeros días, lo sugiere de alguna forma que en la naturaleza prevalece la estrategia reproductiva R-selected para *C. elegans*, y, por lo tanto, es de esperar la compensación a favor de crías tempranas, en lugar de más grandes (79). Esta observación es similar a lo registrado por otros autores (51). En conclusión, N2, adaptado al laboratorio, presenta un periodo fértil más amplio en relación a las dos cepas salvajes, y es esta la posible causa del mayor número de progenie promedio observado.

Resistencia a estrés.

Dado que hallamos diferencias significativas entre la cantidad de crías de las cepas salvajes (CB4856 y OAR137) y la cepa estándar de laboratorio N2, decidimos evaluar si estas se asocian a un fenómeno de compensación o “trade-off” con la resistencia de los individuos a diferentes condiciones de estrés. En algún nivel, todos los organismos experimentan limitaciones sean energéticas, genéticas, fisiológicas, de desarrollo y ecológicas. Para tener éxito en entornos dinámicos (comunes en condiciones naturales), los organismos deben contar con diferentes herramientas para amortiguar los efectos de estos cambios. Como argumentan Aprison y Ruvinzky (81), una estrategia reproductiva que se limite a maximizar la producción de crías es probablemente desventajosa porque podría conducir a una pérdida catastrófica de viabilidad en condiciones desfavorables. Como ya hemos mencionado a lo largo de esta tesina, una estrategia muy bien documentada para hacer frente a condiciones extremas es la formación de larvas dauer en *Caenorhabditis elegans*. Sin embargo, dado que los gusanos sólo pueden entrar en la fase dauer durante una ventana de tiempo limitada (al final del periodo larvario L1) se espera que los demás estadios de desarrollo tengan también diferentes estrategias para hacer frente a entornos adversos. Dado que, en muchos organismos (*C. elegans*, *Drosophila*, algunos vertebrados e incluso plantas) se ha reportado que la capacidad reproductiva sigue una relación inversamente proporcional a la capacidad de estos seres vivos para resistir estrés (81) (82) (83), decidimos evaluar la resistencia a concentraciones altas de un agente oxidante, FeSo4 (12). Con nuestros ensayos probamos que ambas cepas salvajes son más resistentes al estrés oxidativo en relación a la cepa de laboratorio N2, que deja un mayor número de crías. La compensación entre la resistencia al estrés y la aptitud reproductiva ya ha sido reportada para esta especie por otros autores (82). Este fenómeno de aumento de resistencia a condiciones desfavorables y disminución de la fertilidad es típico de organismos sujetos a restricción dietaria (65; 61; 62; 63). La restricción dietaria produce una regulación en baja de la vía de la insulina /IGF-1 y un consecuente aumento de la activación de factores de transcripción relacionados con la resistencia a estrés tales como DAF-16/FOXO, SKN-1 y HSF-1 (12; 83). Nuestra evaluación de la ingesta de alimentos no arrojó diferencias significativas entre las 3 cepas. Sin embargo, esto no implica que los animales silvestres no exhiban algunas características típicas de animales restringidos en su dieta, como por

ejemplo una menor activación del receptor de insulina, aun cuando la ingesta de comida es normal. Se conoce largamente que mutantes nulas en este receptor de insulina (DAF-2) en la cepa N2, por ejemplo, son extremadamente longevos y resistentes a estrés, dejan poca progenie y tienen ingesta de alimentos normales (11; 84; 85). Sería interesante, entonces, evaluar la vía de la insulina en estos animales aislados de la naturaleza para determinar si, en condiciones basales, existen diferencias en su nivel de activación que puedan explicar su resistencia a estrés oxidativo.

Locomoción.

Uno de los resultados que más nos sorprendió en este trabajo, surgió al comparar la velocidad de nado de los animales en medio líquido como parámetro de movilidad.

Las cepas silvestres presentan una velocidad de nado mucho mayor que la cepa N2. Según nuestra búsqueda, estas diferencias en la locomoción entre cepas silvestres y la cepa de laboratorio no había sido reportada previamente. Si bien es necesario corroborar estas diferencias con otros tests (por ejemplo, velocidad de locomoción en medio sólido), podemos especular las razones ecológicas que median estas diferencias. Es muy posible que la velocidad de movimiento sea crucial en la naturaleza, ya sea para escapar de predadores o para llegar antes a fuentes de alimento. Estos estímulos estuvieron ausentes por más de 300 generaciones en la cepa N2, con lo cual esa presión de selección hacia animales más veloces posiblemente haya desaparecido dando como resultados animales levemente más lentos. Mas allá de esta especulación, es evidente que existen mecanismos moleculares que expliquen esta diferencia en la locomoción. Si bien la locomoción es dependiente de diversos factores neuronales (percepción de un estímulo, actividad de neuronas comando e interneuronas, etc.) y no neuronales (estado metabólico y disponibilidad de energía del organismo), la unión neuromuscular es clave en el movimiento. Teniendo en cuenta que en *C. elegans* se puede realizar una evaluación farmacológica sencilla de la funcionalidad de esta señalización, nos centramos en este aspecto.

Nuestro estudio de parálisis inducida por levamisol, agonista de los receptores nicotínicos musculares de nematodos, mostró una mayor resistencia de ambas cepas salvajes en relación a N2. Estos datos pueden estar indicando la existencia de diferencias importantes a nivel de la transmisión neuromuscular, específicamente en la postsinapsis. Las razones de esta resistencia parcial a levamisol podrían ser, entre otros: i) menor expresión de los receptores de AChR musculares, ii) menor funcionalidad de estos receptores, iii) diferencias en los mecanismos que acoplan la entrada de calcio con la contracción muscular. Si bien al enumerar estas opciones, se piensa en diferencias puramente postsinápticas, las mismas pueden darse como compensación en respuesta a una elevada liberación del neurotransmisor acetilcolina, es decir a un fenómeno presináptico. En este sentido, se ha observado que mutantes (en N2) relacionadas con una mayor liberación del neurotransmisor ACh se mueven más velozmente y son ligeramente más resistentes a levamisol que la cepa control (86), algo similar a lo que observamos en las cepas silvestres. Para dilucidar el nivel de la alteración neuronal, presináptica o postsináptica deberíamos ensayar, además, con la droga aldicarb (no disponible en nuestro laboratorio en el momento

del desarrollo de esta tesina) (87). Los fármacos aldicarb y levamisol actúan sobre diferentes componentes de la unión neuromuscular (NMJ), y como mencionamos anteriormente su aplicación permite, por un lado, detectar diferencias en la transmisión sináptica neuromuscular y además, determinar la ubicación de dicha alteración. Aldicarb es un inhibidor de la acetilcolinesterasa (AChE) enzima presente en la hendidura sináptica que hidroliza ACh en acetato y colina, por lo que, en presencia de este compuesto, la ACh se acumula en la hendidura sináptica provocando una sobreactivación de los receptores colinérgicos, hipercontracción muscular, parálisis y finalmente la muerte. Si un gusano mutante es resistente al aldicarb, pero no al levamisol (quien activa uno de los dos tipos de receptores colinérgicos en los músculos de la pared corporal), es probable que el gen afectado funcione en la presinapsis. Por el contrario, si una cepa presenta resistencia a ambos fármacos, es probable que existan diferencias en la postsinapsis. Es importante considerar, además, que en casos en los que hay una elevada liberación de ACh, estos animales son hipersensibles a aldicarb (pero no a levamisol) (86). Esperamos en un futuro poder complementar nuestro ensayo con el uso de la droga aldicarb y conocer concretamente el nivel pre o postsináptico de estas diferencias observadas.

Recientemente, hemos obtenido del CeNDR 12 cepas genotípicamente diferentes que, a partir de medidas independientes repetidas de un fenotipo determinado combinado con análisis bioinformático de los genomas, permiten comenzar con el rastreo de posibles genes responsables de las diferencias observadas. En este caso, tenemos proyectado medir la locomoción y la resistencia a levamisol/aldicarb de estas cepas. Para ello hemos adquirido un sistema que permite cuantificar, de manera automática, el movimiento en líquido de varias cepas al mismo tiempo, denominado WMicrotacker (<https://www.phylumtech.com/home/es/wmicrotracker-one-esp/>), lo que permitirá acelerar la evaluación fenotípica.

CONCLUSIONES FINALES

A pesar del intenso trabajo de laboratorio sobre *C. elegans*, muchas características importantes de esta especie en la naturaleza siguen siendo un misterio. Los estudios biológicos que utilizan a *C. elegans* como modelo experimental están basados como única herramienta en la cepa estándar de laboratorio N2. Teniendo conocimiento de su adaptación al laboratorio, y aún más, confirmando bajo esta tesina las diferencias significativas existentes con cepas salvajes, se sugiere el uso adicional de cepas silvestres en estudios con nematodos, ya que de otra manera se está limitando la gama de información que la especie puede brindar e incluso, en algunos casos, se puede estar arribando a conclusiones erróneas o alejadas de la situación real.

Nuestros análisis fenotípicos revelan diferencias sustanciales con la cepa de laboratorio. En primer lugar, la velocidad de movimiento en líquido de la cepa aislada en Argentina (OAR137) es significativamente mayor que la cepa de laboratorio N2. Este resultado, sumado a que la cepa OAR137 es más resistente a la acción paralizante del agonista nicotínico levamisol, sugiere diferencias importantes en la transmisión neuromuscular de ambas cepas. Además de las diferencias motoras, encontramos que los individuos de OAR137 presentan un modelo poblacional de aglutinación, con agregación social de animales (en comparación al patrón solitario y disperso característico de N2) y que dejan un menor número de descendencia. Al mismo tiempo, encontramos que OAR137 (que deposita un menor número de huevos) es más resistentes al estrés oxidativo en relación a la cepa de laboratorio N2, que deja un mayor número de crías. Esto último puede estar sugiriendo la existencia en la naturaleza de un “trade-off” entre la reproducción y la resistencia a estresantes.

Aprovechando la disponibilidad de varias cepas aisladas en otras regiones del mundo, cuyo genoma está secuenciado, la factibilidad de realizar “Whole Genome Sequencing” en la cepa que aislamos y nuestra experiencia en el análisis de circuitos neuronales y de la unión neuromuscular de *C. elegans*, intentaremos identificar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas observadas en la locomoción. Dada la conservación de procesos fundamentales en todo el reino animal, este estudio podría contribuir al entendimiento universal de la transmisión nerviosa.

El aislamiento de una nueva cepa de este modelo ampliamente usado en la actualidad, deja abierto un campo de investigaciones sobre un nuevo fondo genético que puede aportar datos relevantes para la anotación funcional de genes y fenotipos que aún no fueron descritos. En conclusión, con nuestro estudio contribuimos a mejorar la comprensión de la historia natural de *C. elegans* lo que colabora a establecerlo como especie modelo para estudios evolutivos y ecológicos y además, ofrecemos un organismo con el que se podrán estudiar posibles genes enigmáticos, enmascarados en N2.

BIBLIOGRAFIA

1. *Maintenance of C. elegans*. **Stiernagle, T.** s.l. : ed. The C. elegans Research Community, 11 de Febrero de 2006, WormBook, págs. 1-11.
2. *A Transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans*. **Corsi, A. K., Wightman, B. y Chalfie, M.** 2, 3 de Junio de 2015, Genetics, Vol. 200, págs. 387-407.
3. *Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology*. **Consortium, T. C. e. S.** 5396, 1998, Science, Vol. 282, págs. 2012-2018.
4. *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. **Sulston, J. E., y otros.** 1983, Developmental biology, Vol. 100, págs. 64-119.
5. *The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in Caenorhabditis elegans*. **Kimble, J. y Hirsh, D.** 2, junio de 1979, Developmental biology, Vol. 70, págs. 396-417.
6. *The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans*. **White, J. G., y otros.** 1165, 12 de Noviembre de 1986, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Vol. 314, págs. 1-340.
7. *Whole-animal connectomes of both Caenorhabditis elegans sexes*. **Cook, S. J., y otros.** 2019, Nature, Vol. 571, págs. 63-71.
8. *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. **Fire, A, y otros.** 19 de febrero de 1998, Nature, Vol. 391, págs. 806-811.
9. *Programmed Cell Death During Caenorhabditis elegans Development*. **Conradt, B., Wu, Y. C. y Xue, D.** 2016, Genetics, Vol. 203, págs. 1533-1562.
10. *Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in C. elegans*. **Dillin, A., Crawford, D. K. y Kenyon, C.** 25 de octubre de 2002, Science, Vol. 298, págs. 830-834.
11. *A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type*. **Kenyon, C., y otros.** 2 de Diciembre de 1993, Nature, Vol. 366, págs. 461-464.
12. *The flight response impairs cytoprotective mechanisms by activating the insulin pathway*. **De Rosa, M. J., y otros.** 2019, Nature, Vol. 573, págs. 135-138.
13. *The laboratory domestication of Caenorhabditis elegans*. **Sterken, M. G, y otros.** 5, 21 de Marzo de 2015, Trends Genet, Vol. 31, págs. 224-231.
14. *The Natural History of Model Organisms: C. elegans outside the Petri dish*. **Frézal, L. y Félix, M. A.** 30 de Marzo de 2015, elife, Vol. 4.
15. *The natural history of Caenorhabditis elegans*. **Felix, M. A. y Braendle, C.** 22, 23 de Noviembre de 2010, Current biology, Vol. CB 20, págs. R965-969.
16. *Isolation of C. elegans and related nematodes*. **Barriere, A. y Felix, M. A.** s.l. : ed. The C. elegans Research Community, 2 de Mayo de 2014, WormBook, págs. 1-19.
17. *Chromosome-scale selective sweeps shape Caenorhabditis elegans genomic diversity*. **Andersen, E. C., y otros.** 29 de Enero de 2012, Nature genetics, Vol. 44, págs. 285-290.
18. *The genetic basis of natural variation in Caenorhabditis elegans telomere length*. **Cook, D.E, y otros.** 1, 2016, Genetics, Vol. 204, págs. 371-383.
19. *Ephemeral-habitat colonization and neotropical species richness of Caenorhabditis nematodes*. **Ferrari, C., y otros.** 43, 19 de Dicimebre de 2017, BMC ecology, Vol. 17, págs. 1-13.
20. *Extreme allelic heterogeneity at a Caenorhabditis elegans beta-tubulin locus explains natural resistance to benzimidazoles*. **Hahnel, S. R., y otros.** 10, 29 de Octubre de 2018, PLoS Pathogens, Vol. 14.
21. *Comparative genomics of 10 new Caenorhabditis species*. **Stevens, L., y otros.** 2, 2 de Abril de 2019, Evolution letters, Vol. 3, págs. 217-236.
22. *Rapid single nucleotide polymorphism mapping in C. elegans*. **Davis, M. W., y otros.** 118, 12 de Septiembre de 2005, BMC genomics, Vol. 6.

23. *Next-Generation Sequencing-Based Approaches for Mutation Mapping and Identification in *Caenorhabditis elegans**. **Doitsidou, M., Jarriault, S. y Poole, R. J.** 2016, *Genetics*, Vol. 204, págs. 451-474.
24. *Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history: ecology of longevity*. **Caswell-Chen, E. P., y otros.** Noviembre de 2005, *Science of aging knowledge environment*.
25. *The Natural Biotic Environment of *Caenorhabditis elegans**. **Schulenburg, H. y Felix, M. A.** 1, 1 de Mayo de 2017, *Genetics*, Vol. 206, págs. 55-86.
26. *Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism*. **Kaletta, T. y Hengartner, M. O.** 21 de Abril de 2006, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 5, págs. 387–399.
27. *A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans**. **Rea, S., Wu, D., Cypser, J. et al.** 24 de Julio de 2005, *Nat Genet*, Vol. 37, págs. 894–898.
28. *Expression and imaging of fluorescent proteins in the *C. elegans* gonad and early embryo*. **Green, R. A., y otros.** 2008, *Methods in cell biology*, Vol. 85, págs. 179-218.
29. *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression*. **Chalfie, M., y otros.** 5148, 11 de Febrero de 1994, *Science*, Vol. 263, págs. 802-805.
30. *Time-lapse microscopy of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans**. **Boyd, L., Hajjar, C. y O'Connell, K.** 25 de Agosto de 2011, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*.
31. *Introduction to sex determination*. **Herman, R. K.** s.l. : ed. The *C. elegans* Research Community, 24 de Diciembre de 2005, *WormBook*.
32. *Somatic sexual differentiation in *Caenorhabditis elegans**. **Wolff, J. R. y Zarkower, D.** 2008, *Current topics in developmental biology*, Vol. 83, págs. 1-39.
33. *Male development*. **Emmons, S.W.** s.l. : ed. The *C. elegans* Research Community, 10 de Noviembre de 2005, *WormBook*.
34. *The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature*. **Golden, J. W. y Riddle, D. L.** 2, Abril de 1984, *Developmental biology*, Vol. 102, págs. 368-378.
35. *Introduction*. **Altun, Z.F. y Hall, D.H.** 2009, In *WormAtlas*.
36. *Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans**. **Hobert, O.** s.l. : ed. The *C. elegans* Research Community, 4 de Octubre de 2010, *WormBook*.
37. *OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs*. **Shaye, D. D. y Greenwald, I.** 5, 25 de Mayo de 2011, *PloS one*, Vol. 6.
38. *A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes*. **Culetto, E. y Sattelle, D. B.** 6, 12 de Abril de 2000, *Human molecular genetics*, Vol. 9, págs. 869-877.
39. *Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans**. **Hodgkin, J. y Doniach, T.** 1, 1 de Mayo de 1997, *Genetics*, Vol. 146, págs. 149-164.
40. *Whole Genome Sequencing Highlights Genetic Changes Associated with Laboratory Domestication of *C. elegans**. **Weber, K. P., y otros.** 11, 11 de Noviembre de 2010, *PloS one*, Vol. 5.
41. *Selection on a Subunit of the NURF Chromatin Remodeler Modifies Life History Traits in a Domesticated Strain of *Caenorhabditis elegans**. **Large, E. E., y otros.** 7, 28 de Julio de 2016, *PLoS Genet*, Vol. 12.
42. *Why we need more ecology for genetic models such as *C. elegans**. **Petersen, C., Dirksen, P. y Schulenburg, H.** 3, Marzo de 2015, *Trends in Genetics*, Vol. 31, págs. 120-127.
43. *Efficient high-resolution deletion discovery in *Caenorhabditis elegans* by array comparative genomic hybridization*. **Maydan, J. S., y otros.** 3, 2007, *Genome research*, Vol. 17, págs. 337-347.
44. *The million mutation project: a new approach to genetics in *Caenorhabditis elegans**. **Thompson, O., y otros.** 10, 2013, *Genome research*, Vol. 23, págs. 1749-1762.
45. *Role of pleiotropy in the evolution of a cryptic developmental variation in *Caenorhabditis elegans**. **Duveau, F. y Félix, M. A.** 1, 2012, *PLoS biology*, Vol. 10.
46. *Experience-dependent modulation of *C. elegans* behavior by ambient oxygen*. **Cheung, B. H., y otros.** 10, 2005, *Current Biology*, Vol. 15, págs. 905-917.
47. *Molecular basis of the copulatory plug polymorphism in *Caenorhabditis elegans**. **Palopoli, M. F., y otros.** 2008, *Nature*, Vol. 454, págs. 1019-1022.

48. *A phylogeny and molecular barcodes for Caenorhabditis, with numerous new species from rotting fruits.* **Kiontke, K., y otros.** 339, 2011, BMC Evol. Biol., Vol. 11.
49. *Outcrossing and the maintenance of males within C. elegans populations.* **Anderson, J. L., Morran, L. T. y Phillips, P. C.** 2010, Journal of heredity, págs. S62–S74.
50. *Basic Caenorhabditis elegans Methods: Synchronization and Observation.* **Porta-de-la-Riva, M., y otros.** 10 de Junio de 2012, Journal of visualized experiments: JoVE.
51. *More is not better: brood size and population growth in a self-fertilizing nematode.* **Hodgkin, J. y Barnes, T. M.** 1991, Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, Vol. 246, págs. 19-24.
52. **Sulston, J. y Hodgkin, J.** Methods. [ed.] Wood W. B. *The nematode C. elegans.* s.l. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, págs. 587-606.
53. *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.* **Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C.** . 2, Mayo- Agosto de 2013, Investigación en discapacidad, Vol. 2, págs. 70-78.
54. *A Cys-loop mutation in the Caenorhabditis elegans nicotinic receptor subunit UNC-63 impairs but does not abolish channel function.* **Jones, A. K., y otros.** 4, 2011, Journal of Biological Chemistry, Vol. 286, págs. 2550-2558.
55. *Diisopropylphenyl-imidazole (DII): A new compound that exerts anthelmintic activity through novel molecular mechanisms.* **Blanco, M. G., y otros.** 12, 17 de Diciembre de 2018, PLoS neglected tropical diseases, Vol. 12.
56. *Excitatory neurons sculpt GABAergic neuronal connectivity in the onal connectivity in the C. elegans motor circuit.* **Barbagallo, B., y otros.** 10, 15 de Mayo de 2017, Development, Vol. 144, págs. 1807–1819.
57. *Elección femenina y tapones copulatorios en Leucauge (Araneae, Tetragnathidae).* **Aisenberg, Anita, Barrantes, Gilbert y Eberhard, William G.** . 2013, Sociedad Colombiana de Entomología-SOCOLEN.
58. **Nuñez, M. V. y Drago, F. B.** Phylum Acanthocephala. [aut. libro] Fabiana Beatriz Drago. *Macroparásitos. Diversidad y biología.* s.l. : Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2017.
59. *Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in C. elegans.* **De Bono, M. y Bargmann, C. I.** 5, 4 de Septiembre de 1998, Cell, Vol. 94, págs. 679-689.
60. *Long-Range Regulatory Polymorphisms Affecting a GABA Receptor Constitute a Quantitative Trait Locus (QTL) for Social Behavior in Caenorhabditis elegans.* **Bendesky, A., y otros.** 12, 20 de Diciembre de 2012, PLoS Genet, Vol. 8.
61. *Dietary restriction in the nematode Caenorhabditis elegans.* **Houthoofd, K., Johnson, T. E. y Vanfleteren, J. R.** 9, 2005, The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, Vol. 60, págs. 1125-1131.
62. *An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast.* **Jiang, J. C., y otros.** 14, 8 de Septiembre de 2000, The FASEB Journal, Vol. 14, págs. 2135-2137.
63. **Masoro, E. J.** . Caloric restriction: a key to understanding and modulating aging. [ed.] Viig J. *Research Profiles in Aging.* The Netherlands : Elsevier, 2002, Vol. 1.
64. *The genetics of caloric restriction in Caenorhabditis elegans.* **Lakowski, B. y Hekimi, S.** 22, 1998, Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 95, págs. 13091-13096.
65. *Sex and death: what is the connection?* **Partridge, L., Gems, D. y Withers, D. J.** . 4, 2005, Cell, Vol. 120, págs. 461-472.
66. *The genetics of levamisole resistance in the nematode Caenorhabditis elegans.* **Lewis, J. A., y otros.** 4, 1 de Agosto de 1980, Genetics, Vol. 95, págs. 905-928.
67. *Activation of single nicotinic receptor channels from Caenorhabditis elegans muscle.* **Rayes, D., y otros.** 5, 2007, Molecular pharmacology, Vol. 71, págs. 1407-1415.
68. *Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and rhizobium bacteria.* **Horiuchi, J., y otros.** 5, 15 de Julio de 2005, Planta, Vol. 222, págs. 848–857.

69. *Nematode-enhanced microbial colonization of the wheat rhizosphere*. **Knox, O. G. G., y otros.** 2, Agosto de 2003, FEMS Microbiology Letters, Vol. 225, págs. 227-233.
70. *A streamlined system for species diagnosis in Caenorhabditis (Nematoda: Rhabditidae) with name designations for 15 distinct biological species*. **Félix, M.-A., Braendle, C. y Cutter, A. D.** 4, 11 de Abril de 2014, PLoS One, Vol. 9.
71. *Remarkably Divergent Regions Punctuate the Genome Assembly of the Caenorhabditis elegans Hawaiian Strain CB4856*. **Thompson, O. A., y otros.** 3, 1 de Julio de 2015, Genetics, Vol. 200, págs. 975–989.
72. *Reproductive system, egg-laying apparatus*. **Lints, R. y Hall, D.H.** 2009, In WormAtlas.
73. *Defining wild-type life span in Caenorhabditis elegans*. **Gems, D. y Riddle, D. L.** 5, 1 de Mayo de 2000, The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, Vol. 55, págs. B215-B219.
74. *Evolution of sperm shortage in a selfing hermaphrodite*. **Barker, D. M.** 6, 1992, Evolution, Vol. 46, págs. 1951–1955.
75. *The significance of clutch-size*. **Lack, D.** 2, Abril de 1947, Ibis, Vol. 89, págs. 302-352.
76. **Ricklefs, R. E.** A note on the evolution of clutch size in altricial birds. [ed.] B. Stonehouse y C. (eds) Perrins. *Evolutionary Ecology*. s.l. : Palgrave, London, 1977, págs. 193-214.
77. *The evolution of clutch size in parasitic wasps*. **Godfray, H. C. J.** 2, 1987, The American Naturalist, Vol. 129, págs. 221-233.
78. *Reproductive aging in C. elegans: from molecules to ecology*. **Scharf, A., y otros.** 16 de Septiembre de 2021, Frontiers in cell and developmental biology.
79. **MacArthur, R. H. y Wilson, E. O.** *The Theory of Island Biogeography*. s.l. : Princeton, N.J.: Princeton University Press, 1967.
80. **Alonzo, S. H. y Kindsvater, H. K.** Life-History Patterns. *Encyclopedia of Ecology*. s.l. : Elsevier Inc., 2008, Vols. Five-Volume Set, págs. 2175-2180.
81. *Balanced trade-offs between alternative strategies shape the response of C. elegans reproduction to chronic heat stress*. **Aprison, E. Z. y Ruvinsky, I.** 8, 28 de Agosto de 2014, PLoS one, Vol. 9.
82. *Fitness trade-offs and environmentally induced mutation buffering in isogenic C. elegans*. **Casanueva, M. O., Burga, A. y Lehner, B.** 6064, 2012, Science, Vol. 335, págs. 82-85.
83. *Converging pathways in lifespan regulation*. **Narasimhan, S. D., Yen, K. y Tissenbaum, H. A.** 15, 2009, Current Biology, Vol. 19.
84. *TDP-1/TDP-43 regulates stress signaling and age-dependent proteotoxicity in Caenorhabditis elegans*. **Vaccaro, A., y otros.** 7, 2012, PLoS genetics, Vol. 8.
85. *Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in Caenorhabditis elegans*. **Gems, D., y otros.** 1, 1998, Genetics, Vol. 150, págs. 129-155.
86. *Gain-of-function mutations in the UNC-2/CaV2 α channel lead to excitation-dominant synaptic transmission in Caenorhabditis elegans*. **Huang, Y. C., y otros.** 2019, Elife.
87. *Analysis of synaptic transmission in Caenorhabditis elegans using an aldicarb-sensitivity assay*. **Mahoney, T. R., Luo, S. y Nonet, M. L.** 4, 2006, Nature protocols, Vol. 1, págs. 1772-1777.
88. **Schroeder, K. D.** *Caenorhabditis elegans hermaphrodite adult* [Fotografía]. [En línea] 24 de Enero de 2014. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Caenorhabditis_elegans_hermaphrodite_adult-gl.svg.