



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Caenorhabditis elegans como organismo modelo para el estudio de la influencia de la dieta en el envejecimiento

Autor/es

MARINA CAMPOS BALLESTEROS

Director/es

EVA GOMEZ ORTE y JUAN CABELLO PARDOS

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

QUÍMICA

Curso académico

2020-21



Caenorhabditis elegans como organismo modelo para el estudio de la influencia de la dieta en el envejecimiento, de MARINA CAMPOS BALLESTEROS

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



Trabajo de Fin de Máster

Caenorhabditis elegans como
organismo modelo para el estudio de
la influencia de la dieta en el
envejecimiento

Autora: Marina Campos Ballesteros

Tutor: Juan Cabello Pardos

Cotutora: Eva María Gómez Orte

Máster en Química y Biotecnología
Escuela de Máster y Doctorado



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Año académico: 2020 / 2021

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1. Introducción al organismo modelo <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
3.2. Uso de <i>C. elegans</i> para el estudio del envejecimiento y la influencia de la dieta	11
3.3. Introducción al cruce para generar una cepa <i>daf-2(e1370)</i> que tiene marcadas las mitocondrias con GFP	15
4. OBJETIVOS DEL TRABAJO	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1. Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
5.2. Técnicas de manipulación y conservación de <i>C. elegans</i>	21
5.2.1. Observación de <i>C. elegans</i>	22
5.2.2. Crecimiento de <i>C. elegans</i> en placas	22
5.2.3. Preparación de placas NGM agar con <i>Escherichia coli</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	23
5.2.4. Replicación de gusanos de una placa NGM agar a otra	25
5.2.5. Transferencia de gusanos de forma individual	26
5.2.6. Descontaminación (Bleaching) y sincronización de <i>C. elegans</i>	26
5.2.7. Recogida de <i>C. elegans</i>	27

5.3. Trabajo experimental	28
<i>5.3.1. Ensayo de longevidad</i>	28
<i>5.3.2. Ensayo de fertilidad</i>	30
<i>5.3.3. Análisis descriptivo de las mitocondrias</i>	31
<i>5.3.4. Cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa <i>daf-2(e1370)</i> que tienen marcadas las mitocondrias con GFP</i>	33
6. RESULTADOS	37
6.1. Resultados del ensayo de longevidad	37
6.2. Resultados del ensayo de fertilidad	40
6.3. Análisis descriptivo de las mitocondrias	45
6.4. Resultados del cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa <i>daf-2(e1370)</i> que tienen marcadas las mitocondrias con GFP	50
7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	55
7.1. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de longevidad	55
7.2. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de fertilidad	57
7.3. Discusión de los resultados obtenidos en el análisis descriptivo de las mitocondrias	59
7.4. Discusión de los resultados obtenidos en el cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa <i>daf-2(e1370)</i> que tienen marcadas las mitocondrias con GFP	60
8. CONCLUSIONES	63
9. BIBLIOGRAFÍA	65

1. RESUMEN

Caenorhabditis elegans es un organismo modelo utilizado en biología para el estudio de diversas patologías humanas. Este organismo tiene varias características que resultan ser ventajosas a la hora de utilizarlo como organismo modelo. Por ejemplo, se conoce la disposición anatómica de todas sus células y su linaje celular. Además, tiene un ciclo de vida corto y su genoma completo está secuenciado. Por último, es fácil de manipular y mantener en el laboratorio.

Fue en el año 1977 cuando se publicó la primera investigación en la cual se destacaba que *C. elegans* era un buen sistema para el estudio del envejecimiento. Desde entonces, las investigaciones sobre este campo se han multiplicado. Así, se ha conocido que la dieta influye en la longevidad del organismo modelo *C. elegans*.

También se han identificado diferentes mutantes asociados con a la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS). La vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS) es una vía universalmente conservada presente en *C. elegans* y en los seres humanos, entre otros organismo vivos. Principalmente, regula la acumulación de DAF-16/FoxO en el núcleo, un factor de transcripción que regula la expresión de diferentes genes, entre los cuales algunos influyen en el control del envejecimiento.

En el trabajo presente, se realizan una serie de ensayos por los cuales se analiza el impacto que la dieta tiene en el envejecimiento del organismo modelo *C. elegans*. De manera adicional, se crea un modelo para poder estudiar el estado mitocondrial en gusanos mutantes para el receptor de la insulina *daf-2*.

2. ABSTRACT

Caenorhabditis elegans is a model organism used in biology for the study of various human pathologies. This organism has several characteristics that are advantageous when used as a model organism. For example, the anatomical arrangement of all its cells and its cell lineage are known. In addition, it has a short life cycle and its complete genome is sequenced. Finally, is easy to manipulate and maintain in the laboratory.

It was in 1977 when the first research was published highlighting that *C. elegans* was a good system for the study of aging. Since then, research in this field has multiplied. Thus, it has been known that diet influences the longevity of model organism *C. elegans*.

Different mutants associated with the insulin/IGF-1 signaling pathway (ISS) have also been identified. The insulin/IGF-1 signaling pathway (ISS) is a universally conserved pathway present in *C. elegans* and humans, among other living organisms. It mainly regulates the accumulation of DAF-16/FoxO in the nucleus, a transcription factor that regulates the expression of different genes, among which some influence the control of aging.

In the present work, a series of assays are performed to analyze the impact that diet has on the aging of the *C. elegans* model organism. Additionally, a model is created to study the mitochondrial state in mutant worms for the insulin receptor *daf-2*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Introducción al organismo modelo *Caenorhabditis elegans*

El organismo modelo *Caenorhabditis elegans* o *C. elegans* es un nematodo no parasitario que vive generalmente en el suelo. Se alimenta de microbios, principalmente bacterias.

Este organismo tiene varias características que resultan ser ventajosas a la hora de utilizarlo como organismo modelo. Para empezar, su anatomía es bastante simple. Un gusano adulto está formado por 959 células somáticas, y se conoce la disposición exacta de cada una de ellas. También se conoce cómo funciona su sistema nervioso y su linaje celular está completamente definido. (Altun, Hall, 2009)

Los organismos *C. elegans* pueden ser de dos sexos diferentes, hermafroditas o machos, como se muestra en la Figura 1. Los machos suelen aparecer en una frecuencia mucho más baja que los hermafroditas, 0,1 %, pero su frecuencia se puede aumentar hasta el 50 % mediante apareamiento. (Chasnov, Chow, 2002)

Los hermafroditas producen el esperma y los ovocitos, y pueden reproducirse por auto fecundación, obteniendo descendientes hermafroditas. Los machos solo producen esperma y para poder reproducirse tienen que aparearse con los hermafroditas. Una vez apareados, el esperma de los hermafroditas compite con el del macho por fecundar el ovocito y la mayoría de la descendencia es resultado de la fecundación cruzada. La descendencia de la fecundación cruzada es 50 % machos y 50 % hermafroditas. Precisamente, esta característica hace que el organismo se preste con facilidad a los cruces genéticos, que pueden utilizarse para realizar diversos ensayos genéticos. (Palikaras, Tavernarakis, 2013)

Respecto a su anatomía, los machos y los hermafroditas tienen un tamaño similar, siendo los machos un poco más pequeños. En comparación con la cola del hermafrodita, que es bastante simple, la cola de los machos es una estructura con una musculatura compleja con nervios asociados que son necesarios para el apareamiento. Precisamente, la diferencia de la cola es una característica que se utiliza rutinariamente para distinguirlos. (Altun, Hall, 2009)

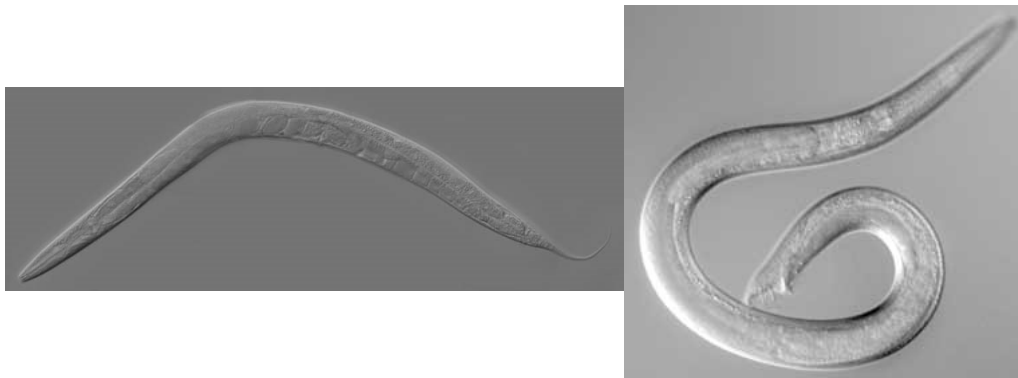


Figura 1 Imágenes del organismo modelo *C. elegans*. A la izquierda un hermafrodita y a la derecha un macho. (www.wormatlas.org)

El gusano, de 1 mm de longitud aproximada, tiene una boca en la punta de la cabeza y un ano al final del cuerpo (Figura 2). También tienen un sistema digestivo, desde la cabeza hasta la cola, que está formado por una faringe y un intestino. (Altun, Hall, 2009)

La faringe está compuesta por 20 células musculares, 20 células nerviosas y 18 células epiteliales dispuestas dentro de una membrana basal. La faringe realiza la ingestión del alimento, mediante una contracción muscular coordinada. (Dimov, Maduro, 2019)

El intestino es un tubo grueso compuesto por 20 células organizadas en nueve anillos. La pared del cuerpo está separada del intestino por el pseudocoeloma y está formada mayoritariamente por la hipodermis, que es bastante gruesa. Bajo la hipodermis, están las células musculares unicelulares que forman la pared del cuerpo. Están organizadas en cuatro bandas longitudinales y recorren la longitud del gusano en posición subdorsal o subventral. Gracias a la contracción coordinada entre los bloques musculares subventrales frente a los subdorsales se generan las ondas en la forma del cuerpo que impulsan al gusano para moverse. (McGhee, 2007)

El sistema nervioso, que coordina la respuesta a los diferentes estímulos exteriores, es bastante simple y conocido. Es otra razón por la cual resulta ser un buen organismo modelo. En los hermafroditas hay 302 células nerviosas que se concentran en el anillo nervioso circunfaríngeo, en el cordón nervioso ventral y en la cola. En el caso de los machos, tienen 79 células nerviosas más que los hermafroditas. (Pilon, Mörck, 2005)

La gónada es una estructura tubular simple y dentro ocurre la replicación de la línea germinal por división nuclear. En los machos, la gónada es un tubo único que se abre cerca de la cola. La gónada hermafrodita, en cambio, tiene dos lóbulos simétricos con una abertura del útero situada en el centro de la vulva. Además, tienen una serie de células uterinas y vulvares para realizar la puesta de huevos. La fecundación se produce en la espermateca, entre el oviducto y el útero. (Kimble, Hirsh, 1979)

El sistema excretor es el responsable de la osmoregulación. Está compuesto por una célula del conducto excretor, una célula del poro excretor, una célula de la glándula excretora y una célula excretora, todas ellas conectadas entre sí. (Sundaram, Buechner, 2016)

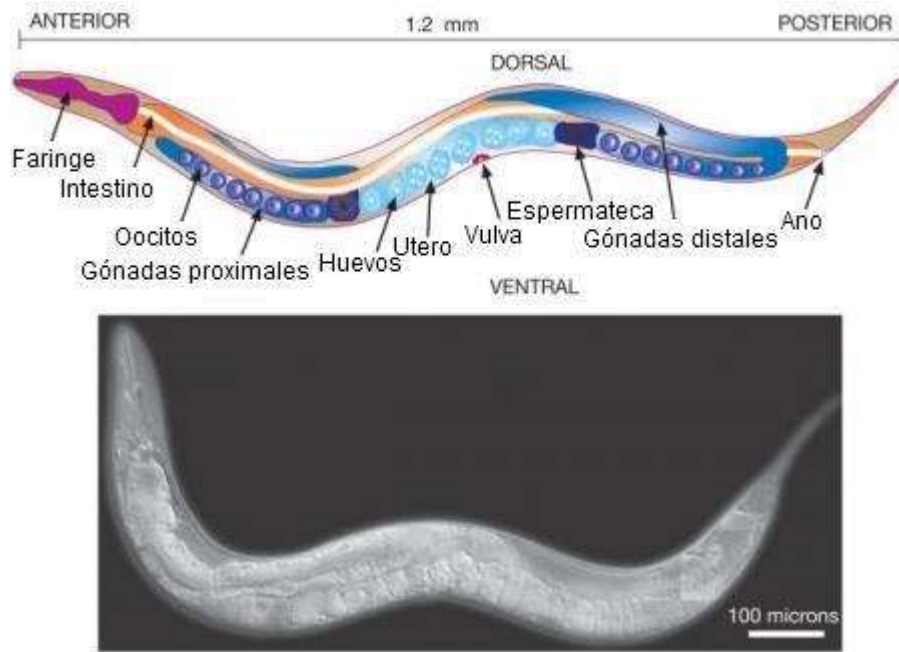


Figura 2. Ilustración de la anatomía del organismo modelo *C. elegans* hermafrodita (arriba) frente a una imagen real (abajo) (Varki et al., 2009)

Otra característica que hace que *C. elegans* resulte ser adecuado como organismo modelo es su ciclo de vida (Figura 3), que es relativamente corto. A una temperatura de 20 °C, se necesitan 3 días y medio para que a partir de huevo se desarrolle un adulto. El ciclo se puede dividir en dos estadios: un estadio embrionario, y cuatro estadios larvarios de L1 a L4. Al cambiar de estadio, se sintetiza una nueva cutícula específica y se desprende la anterior. (Byerly et al., 1976)

El estadio embrionario tiene una duración de 14 horas y se divide en dos etapas: la proliferación y la organogénesis. Durante las primeras 6 horas ocurre la proliferación. En esta etapa ocurren varias divisiones de las células mitóticas que formarán la larva L1; 558 en caso de los hermafroditas y 560 en los machos. Las primeras células que se forman durante el desarrollo, también conocidas como células fundadoras, tienen un tamaño desigual y están totalmente establecidas: AB, E (formará las células intestinales), MS, C, D (formará las células de los músculos de la pared) y la línea germinal P4. (Sulston et al., 1983)

Una vez formadas estas células ocurre la gastrulación. La línea celular E se traslada al interior del embrión. A esta le siguen la línea P₄ y los descendientes de MS, D y C. (Maduro, 2010)

La segunda etapa del estadio embrionario, la organogénesis, ocurre desde las 5,5 – 6 horas hasta que la eclosión (12 – 14 horas). En esta etapa, se produce la diferenciación terminal de las células y el embrión se alarga en tres ocasiones hasta que las células toman la forma de larva L1. Al final de esta fase, el gusano tiene la capacidad de moverse dentro del huevo de forma coordinada alrededor de su eje longitudinal. El embrión inicia el bombeo de la faringe a los 760 minutos de la primera escisión celular y eclosiona a los 800 minutos. (Hald et al., 2017)

Una vez ocurrida la eclosión, se da el desarrollo post-embrionario en el cual el organismo crece de manera continua. Pasan por cuatro estadios larvarios L1, L2, L3 y L4; a las 29, 38, 47 y 50 horas después de la fecundación, hasta llegar a la edad adulta. (Corsi, 2006)

Si hay falta de alimento o demasiada población, los organismo pueden entrar en una fase estacionaria o fase Dauer, en vez de a la fase L3. En esta fase su supervivencia puede aumentar hasta cuatro u ocho veces más que en condiciones normales. Si se vuelven a alimentar los animales se recuperan y pasan al estadio L4. (Cassada, Russell, 1975)

Durante esta fase de desarrollo post-embrionario, las divisiones que ocurren dan lugar a un número fijo de células que tienen destino determinado. El número de células somáticas incrementa hasta 959 en los hermafroditas y 1031 en los machos. El origen de estas células son células blásticas. Respecto a la musculatura específica para cada sexo, se forma a partir de una célula blástica M. (Wood, 1988)

Una vez adulto, puede vivir hasta unas 3 semanas y produce huevos durante 4 días, con una media de 300 huevos por cada gusano. (Riddle, 1987)

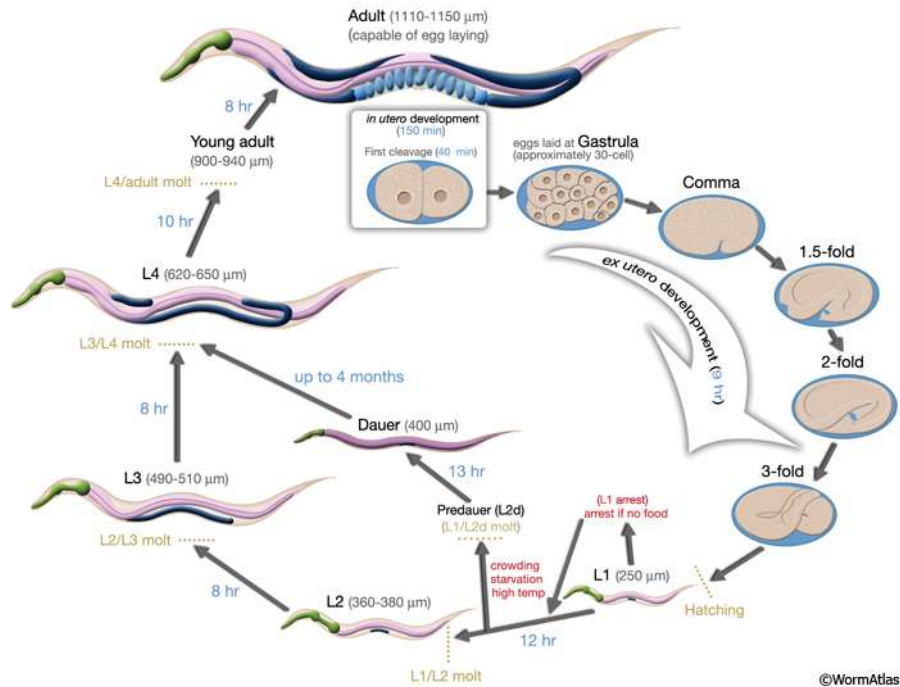


Figura 3. Ilustración del ciclo de vida el organismo modelo *C. elegans* (Altun, Hall, 2009)

Respecto al manejo rutinario del organismo, *C. elegans* resulta ser un organismo muy fácil de manipular y mantener en el laboratorio. Se puede cultivar de manera muy sencilla en placas de agar o medio líquido. El medio común de alimento suele ser la bacteria *E. coli* OP550. Para conservarlo, se puede hacer uso de un simple incubador, ya que en la mayoría de las cepas la temperatura óptima de crecimiento es de 20 °C. (Corsi, 2006)

Otra característica llamativa de estos organismos es que son completamente transparentes. Por ello, utilizando los instrumentos adecuados, como por ejemplo microscopios de disección, se puede observar la evolución del organismo a lo largo de todas las etapas de su ciclo de vida. También esto permite que se puedan utilizar marcadores fluorescentes o cualquier otra técnica para realizar exámenes ópticos y obtener información. (Corsi et al., 2015)

Respecto a los comienzos del uso de *C. elegans* como organismo modelo, fue durante la década de 1960 cuando Sydney Brenner y su grupo de investigación lo utilizaron por primera vez. La cepa original utilizada fue la N2 aislada en Bristol (Reino Unido) durante la década de 1950. Esta cepa de Brenner fue establecida como tipo salvaje o wild type y es la que se utiliza como referencia en todas las investigaciones. A partir de esta cepa, también se podido obtener muchos mutantes. (Félix, Braendle, 2010)

En cuanto a su genoma, fue completamente secuenciado en el año 1998. Su tamaño es de 97 Mb, relativamente pequeño. Lo más importante es que se han encontrado entre un 60 % y un 80 % de genes que son homólogos en humanos. (Nigon, Félix, 2017)

Esta homología con el ser humano ha permitido investigar sobre los diferentes mecanismos que causan diversas patologías humanas, como las relacionadas con la degeneración por el envejecimiento. (Corsi et al., 2015) (Markaki, Tavernarakis, 2020)

3.2. Uso de *C. elegans* para el estudio del envejecimiento y la influencia de la dieta

El envejecimiento de un organismo, está definido como una serie de cambios graduales que afectan negativamente a su función e incrementan la tasa de mortalidad en función del tiempo (Finch, 1990).

Se han propuesto 9 características presentes durante envejecimiento: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, perdida de proteostasis, perdida de sensibilidad a nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular, agotamiento de las células madre y alteración de la comunicación intercelular. A pesar de ser causantes del envejecimiento, no se conoce realmente el modo de acción. (López-Otín, 2013).

C. elegans es un modelo muy útil para el estudio del envejecimiento, por su ciclo de vida relativamente corto, su genética y por la posibilidad de sincronizar poblaciones de individuos (Riddle et al., 1997) (Corsi et al., 2015). Hace más de 30 años que se inició la investigación sobre envejecimiento mediante la generación de mutantes longevos de *C. elegans* (Klass, 1983). Desde entonces, se han descrito numerosos mutantes que aumentan la tasa de vida del gusano. Los genes mejor caracterizados son *daf-2* y *age-1* que pertenecen a la ruta de la insulina y modifican la actividad del factor de transcripción *daf-16* (Kenyon et al., 1993) (Lin et al., 2001) (Ogg et al., 1997). *C. elegans* se ha convertido en estos últimos años en el organismo modelo elegido por muchos laboratorios para investigar las bases genéticas de la longevidad y el envejecimiento. (Mack, Heimbucher, Murphy, 2018)

Daf-16/FOXO es inactivado vía su transporte fuera del núcleo por un camino de señalización conservado evolutivamente. Daf-16 promueve la longevidad activando genes específicos de longevidad y regula cientos de genes incluyendo los de respuesta a estrés, actividad antimicrobiana, metabolismo, etc (Martins et al., 2015). Estas rutas han sido descritas en nemátodos crecidos con una dieta específica (*E. coli* OP50). En los últimos años, diversos estudios han mostrado el efecto patógeno que tiene esta bacteria en el gusano (Sanchez-Blanco et al. 2016).

En 1978 se publicaron otros ensayos que consistían en medir la vida útil de los gusanos utilizando el compuesto esterilizante 5-Fluoro-2'-deoxiuridina (FUDR). (Tissenbaum, 2015). Partiendo de estas primeras investigaciones, gracias a la clonación molecular se han ido identificando diferentes mutantes alteradores de la vida útil que están asociados con la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS). Esto resulta ser importante, ya que se ha demostrado que la vía ISS se conserva a lo largo de la evolución. (Lemieux, Ashrafi, 2016)

Como ya se ha mencionado, las investigaciones realizadas han confirmado la influencia de la dieta en la longevidad de los organismos modelo *C. elegans*. La dieta es uno de los aspectos más variables de la vida, ya que hay una gran diversidad entre los tipos y cantidad de alimentos que cada individuo ingiere. (Yen, Curran, 2016)

A corto plazo, la dieta puede afectar al metabolismo y a los niveles de energía. Pero, a la larga, esto puede influir en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad. A pesar de la falta de una dieta definida, las diferentes investigaciones realizadas con *C. elegans* han demostrado el papel que desempeña la dieta en diferentes aspectos de la vida del organismo. (Zhou et al., 2019)

Cabe destacar, que como en el caso de otros organismos modelo, la composición de la dieta de un gusano en la naturaleza es muy diferente a la del laboratorio. Como se ha mencionado anteriormente, en el laboratorio, su dieta suele ser una cepa bacteriana seleccionada. En la naturaleza, en cambio, puede ser una mezcla de muchas especies bacterianas diferentes. Aun y todo, diferentes trabajos han demostrado que incluso en el laboratorio, diversas dietas microbianas tienen efectos variables en la tasa de desarrollo y reproducción cuando se comparan con la dieta estándar *E. coli* OP50. (Zečić et al., 2019)

Algunos de los estudios realizados se han centrado en investigar el impacto que las calorías de las diferentes bacterias podrían tener. Así, se ha podido ver que los gusanos alimentados con *E. coli* OP50 muestran un almacenamiento calórico diferente en comparación con gusanos alimentados con dietas como *E. coli* HB101 y *E. coli* HT115. Pero, la alimentación con estas dietas no tiene un impacto significativo en la vida útil. Esto muestra la capacidad de los organismos para adaptarse a las diversas dietas y mantener la homeostasis. (Brooks et al., 2009)

El impacto en la vida útil sí que se ha podido demostrar si se estudia el impacto de la dieta desde otro punto de vista. La alimentación mediante bacterias de los organismos *C. elegans* implica un aumento de microbios que ayudan a aumentar la protección frente a diversas situaciones de estrés, como los cambios ambientales. De hecho, hay diversos estudios en los cuales se ha utilizado a este organismo modelo para estudiar las asociaciones huésped-microbio y los beneficios que se pueden obtener de esta interacción. (Zhang et al., 2017)

Como ya se ha explicado anteriormente, los gusanos utilizan la región de la faringe para consumir los alimentos. Pero, hay que tener en cuenta que algunos de los microbios consumidos no se descomponen y por lo tanto son capaces de colonizar el intestino del nematodo. De todos estos microbios, algunos pueden ser patógenos, pero, otros resultan ser beneficiosos. Los beneficios encontrados se han relacionado con el aumento de la vida útil de los gusanos. (Portal-Celhay et al., 2012)

En línea con esta idea, se descubrió que la bacteria *Bacillus subtilis* era capaz de aumentar la supervivencia de *C. elegans* tras un choque térmico en comparación con la dieta de *E. coli* OP50 habitual. Analizando con más profundidad estos efectos, se encontró que *B. subtilis* promueve la producción de óxido nítrico y la formación de biopelículas en el intestino del huésped. (Hoang et al., 2019)

Estos estudios han demostrado que *C. elegans* resulta ser un organismo modelo óptimo para entender cómo la dieta puede afectar en aspectos más complejos como el desarrollo, el metabolismo o el envejecimiento de los diferentes organismos. (Johson, 2003)

Precisamente, el trabajo presente se basa en una investigación anterior realizada en el laboratorio, la cual se sigue extendiendo a día de hoy. En esta investigación se analizó el efecto que la dieta y la temperatura tienen en el transcriptoma de *C. elegans*. Toda la información sobre este trabajo se puede encontrar en la respectiva publicación (Gómez-Orte et al., 2017).

3.3. Introducción al cruce para generar una cepa *daf-2(e1370)* que tiene marcadas las mitocondrias con GFP

En la anterior sección ya se ha mencionado que la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS) tiene funciones importantes en los seres humanos y que alteraciones en esta vía están relacionadas con la longevidad. Por ello, muchos investigadores se han centrado en el estudio de los componentes y funcionamiento de esta vía. (Kaletsky, Murphy, 2010)

La vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS) es una vía que conecta los niveles de nutrientes con el metabolismo, afectando al crecimiento, al desarrollo, a la longevidad y al comportamiento. La vía se regula principalmente mediante ligandos que se unen al receptor transmembrana de la insulina/IGF-1: IGFR (receptor del factor de crecimiento 1 de unión a la insulina). Este receptor controla la actividad de la cascada de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt.. Esta cascada, a su vez, regula un factor de transcripción FoxO, quien a su vez regula la mayoría de los genes que participan en la regulación de las funciones de esta vía. (Laviola et al. 2007)

En los estudios realizados sobre esta vía utilizando al organismo modelo *C. elegans* se ha conocido que la vía influye en la regulación del desarrollo y envejecimiento de los organismos, entre otras cosas. También se ha conocido que las funciones de esta vía están universalmente conservadas. Por ello, el estudio de esta vía resulta ser clave para llegar a entender su funcionamiento en seres superiores como los seres humanos. (Pinero et al., 2009)

En cuanto a la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS) en *C. elegans*, se conocen sus componentes y el funcionamiento como se muestra en la Figura 4. (Murphy, Hu, 2013)

En primer lugar, respecto a los componentes, en *C. elegans*:

- El receptor homólogo de IGFR es DAF-2
- El homólogo de esta cascada de fosfoinositol 3-quinasa PI3K, es AGE-1
- El factor de transcripción homólogo de FOXO es DAF-16

Los péptidos de unión a la insulina (ILP) se unen al receptor transmembrana DAF-2/IGFR. Esto hace que el receptor se fosforile y se active. El receptor activo es capaz de fosforilar la fosfoinositol 3-quinasa AGE-1/PI3K activándolo. Una vez activo, activa la PDK-1 (Serina/Treonina kinasa), activando este último a AKT-1 y AKT-2. AKT-1 provoca la fosforilación del factor de transcripción DAF-16/FoxO. Este factor regula las interacciones con las proteínas PAR-5 y FTT-2 controlando a su vez la acumulación de DAF-16/FoxO en el núcleo. Además de DAF-16/FoxO, la vía también puede activar otros factores de transcripción: SKN-1/Nrf y HSF-1 regulando también su presencia en el núcleo. (Murphy, Hu, 2013)

Respecto a las funciones que tiene el factor de transcripción DAF-16, se conoce que regula genes implicados en muchos procesos, desde la resistencia a situaciones de estrés hasta la regulación de formación de gusanos dauer. Entre algunos de estos genes regulados, alguno influye en el control del envejecimiento. (Tullet, 2015)

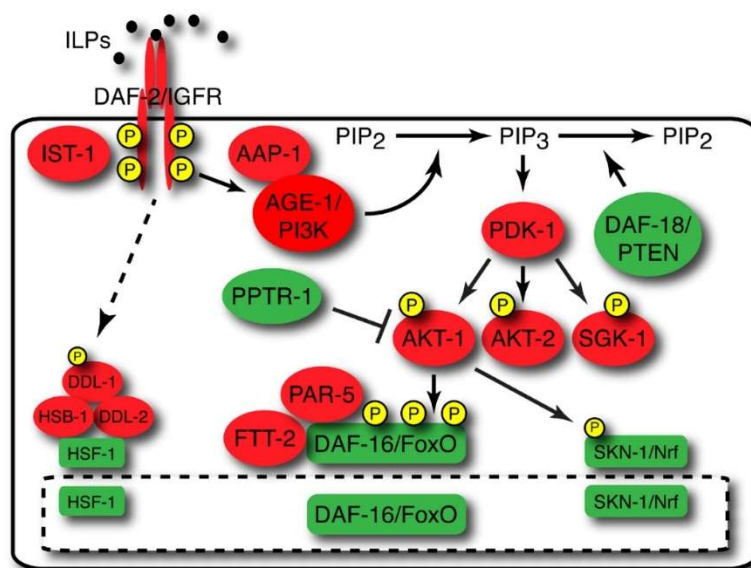


Figura 4. Esquema de la vía de señalización de la insulina/IGF-1 (ISS) en *C. elegans*. Los componentes que activan la vía (en rojo) y los que desactivan la vía (en verde). (Murphy, Hu, 2013)

Se conoce que una mutación en los genes *daf-2* o *age-1* implica que la longevidad de los gusanos aumente. La vía de señalización IIS no se puede activar y por lo tanto, al no poder fosforilado, el factor de transcripción DAF-16 se acumula en el núcleo. (Denzel et al., 2019)

Dada la importancia que el factor de transcripción *daf-16* tiene en la regulación de diferentes genes, el reto actual trata de entender cómo funciona este factor. También se está trabajando en comprender los procesos y mecanismos que hacen que los gusanos mutantes *daf-2* activen esta ruta. Hoy en día, los análisis de genómica funcional que permiten obtener gran cantidad de información sobre la expresión de genes de los organismos. Aun y todo, todavía no se han podido identificar los genes que son funcionalmente importantes para la vida de los gusanos mutantes *daf-2*. (Saul et al., 2021)

Los cruces son métodos genéticos clásicos que permiten generar cepas que contengan múltiples mutaciones o marcadores visibles para realizar un análisis genético y fenotípico. (Fay, 2013)

4. OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los objetivos del trabajo presente son los siguientes:

- Observar si hay diferencias en la longevidad de *C. elegans* en las condiciones del laboratorio, dependiendo de si su alimentación es una dieta basada en *E. coli* o en *B. subtilis*.
- Estudiar si la dieta basada en *E. coli* o *B. subtilis* influye en la puesta de huevos, en las condiciones del laboratorio de trabajo.
- Observar si la dieta influye en la evolución de la estructura de las mitocondrias a lo largo del envejecimiento, dependiendo de si su alimentación es una dieta basada en *E. coli* o en *B. subtilis*.
- Crear un modelo para investigar la morfología de las mitocondrias cuando el receptor de la insulina *daf-2* no es funcional. Para ello, realizar un cruce para generar una cepa *daf-2(e1370)* que tiene marcadas las mitocondrias con GFP.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Cepas de *Caenorhabditis elegans*

En la Tabla 1 se muestran las cepas de *C. elegans* utilizadas para realizar el trabajo. En concreto, se muestra el nombre que a cada cepa se le ha asignado al introducirla a la colección del laboratorio, su nombre original y el genotipo.

Tabla 1. Cepas de *Caenorhabditis elegans*. Se muestra el nombre asignado a la cepa, el nombre original y el genotipo correspondiente. (Creación propia con información de www.cgsc.umn.edu)

Nombre en la colección del laboratorio	Nombre original	Genotipo
JCP 270	N2	<i>wild type</i>
JCP 555	SD1347	<i>myo-3p::GFP::LacZ::NLS + (pSAK4) myo-3p::mitochondrial GFP + dpy-20(+)] I</i>
JCP 210	JK194	<i>daf-2(e1370 ts) III</i>

5.2. Técnicas de manipulación y conservación de *C. elegans*

En esta sección, se detallan las técnicas básicas de manipulación y conservación del organismo modelo *C. elegans* que se han utilizado durante todo el trabajo experimental.

El aprendizaje de estas técnicas ha resultado ser clave, ya que estas técnicas han sido constantemente aplicadas para preparar los materiales necesarios para llevar a cabo los diferentes experimentos y poder mantener a los organismos durante todo el tiempo del experimento.

5.2.1. Observación de *C. elegans*

La observación continúa de los organismos *C. elegans* es necesaria para poder controlar el estado en que se encuentran y poder llevar a cabo los diferentes experimentos.

Dado el pequeño tamaño de los gusanos, es necesario utilizar un microscopio de disección o lupa binocular. En el caso del trabajo realizado, se ha utilizado el microscopio Leica MZ16 FA de Leica Microsystems mostrado en la Figura 5.



Figura 5. Leica MZ16 FA fabricado por Leica Microsystems (www.leica-microsystems.com)

5.2.2. Crecimiento de *C. elegans* en placas

Los organismos *C. elegans* se crecen y mantienen comúnmente en placas Petri con NGM agar, en las cuales el alimento deseado ha sido previamente sembrado.

En el caso concreto de este trabajo, se han utilizado dos alimentos diferentes: la cepa OP50 de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

Las placas se han conservado a 20 °C en incubadores, excepto en casos concretos que por requerimiento del experimento se han introducido a 15 °C. Antes de introducirlas, las placas han sido selladas con papel Parafilm para que no haya riesgo de deshidratación y metidas en diferentes cajas de cartón para evitar la contaminación entre las diferentes placas.

5.2.3. Preparación de placas NGM agar con *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*

El proceso de preparación se divide en dos pasos. En primer lugar, se realiza la preparación de las placas de NGM agar. En segundo lugar, se prepara y se siembra el cultivo con el alimento correspondientes en las placas NGM agar.

La preparación de las placas de NGM agar es la siguiente:

- En una botella de cristal de 1 L añadir los siguientes compuestos:
 - 3 g de NaCl
 - 17 g de Agar
 - 2,5 g de Peptona
 - 975 mL de H₂O destilada.
- Mezclar todo el contenido bien e introducir la botella en el autoclave durante 1 hora y 30 minutos.
- Atemperar la botella a 54 °C en un baño de H₂O.
- Rellenado de placas. Esta parte del experimento se realiza en una campana de extracción. Antes y después de la utilización de la campana hay que encender los rayos UV durante 20 minutos, para asegurar las condiciones de esterilidad.
 - Añadir a la botella los siguientes compuestos:
 - 1 mL de CaCl₂ 1M
 - 1 mL de MgSO₄ 1M
 - 25 mL de KPO₄ 1M
 - 1 mL de Colesterol en etanol (5 mg/mL) (Conservado a 4 °C)
 - 333 µL de FUDR (compuesto esterilizante) (En las placas preparadas para el ensayo de longevidad y análisis de las mitocondrias) (Conservado a 4 °C)
 - Mezclar todo el contenido con movimientos suaves y circulares,
 - Rellenar las placas vacías, cada una más o menos hasta la mitad. Las placas preparadas para el trabajo realizado han sido las siguientes: grandes (150 mm), medianas (100 mm) y pequeñas (35 mm)
 - Dejar secar las placas durante 10 - 15 minutos

- Recoger las placas y dejar incubar durante 24 horas dadas la vuelta.

La preparación del cultivo de alimento para sembrar las placas de NGM agar es la siguiente:

- En un tubo Falcon de 15 mL preparar el precultivo del alimento. Añadir los siguientes compuestos:
 - 3 mL de LB
 - Una colonia de la bacteria que se vaya utilizar como alimento. Para los experimentos realizados se han utilizado dos bacterias diferentes: *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.
- Incubar el tubo Falcon a 37 °C y 2000 rpm 4-5 horas.
- En un Erlenmeyer preparar el cultivo de alimento.
 - Dependiendo del alimento los compuestos a añadir son diferentes.
 - Cultivo de *E. coli*:
 - 100 mL de LB
 - 100 µL del precultivo de *E. coli*
 - 50 µL de Ampicilina (antibiótico)
 - Cultivo de *B. subtilis*:
 - 100 mL de LB
 - Todo el contenido del precultivo de *B. subtilis*
 - Tapar el Erlenmeyer con papel de Aluminio e incubar a 37 °C y 2000 rpm 24 horas.
- Sembrar el cultivo de alimento en las placas NGM agar. Esta parte del experimento se realiza en una campana de flujo laminar.
 - Concentrar el cultivo de alimento. Dependiendo del tamaño de placa en la que se realiza la siembra este paso varía:
 - Siembra en placas NGM agar grandes (150 mm):
 - Dividir todo el contenido del cultivo de alimento en 2 tubos Falcon de 50 mL.
 - Centrifugar los 2 tubos Falcon a 20 °C y 4000 rpm durante 15 minutos.
 - Dividir los tubos en dos grupos:
 - Grupo A (1 tubo Falcon): eliminar todo el sobrenadante.

- Grupo B (1 tubo Falcon): eliminar el sobrenadante hasta 10 mL.
- Resuspender y mezclar el contenido de un tubo del Grupo A con un tubo del Grupo B. Repetir para los otros 2 tubos.
- Siembra en placas NGM agar medianas (100 mm) y pequeñas (35 mm):
 - Seguir el mismo procedimiento que en la siembra en placas NGM agar grandes (150 mm).
- Sembrar en las placas NGM agar. Dependiendo del tamaño de placa en la que se realiza la siembra este paso varía:
 - Siembra en placas NGM agar grandes (150 mm):
 - Por placa se siembran 500 μ L del tubo Falcon.
 - Extender el contenido con la ayuda de del asa Diglasky (esterilizar previamente con alcohol y fuego)
 - Siembra en placas NGM agar medianas (100 mm) y pequeñas (35 mm):
 - Por placa se siembran 300 μ L del tubo Falcon.
 - No extender el contenido por la placa
- Dejar secar las placas durante 15 - 20 minutos
- Recoger las placas y dejar incubar durante 24 horas.
- Conservar las placas a 4 °C en el incubador.

5.2.4. Replicación de gusanos de una placa NGM agar a otra

La replicación se ha realizado cuando los gusanos de una placa se han quedado sin alimento.

El procedimiento es el siguiente:

- Atemperar y rotular la nueva placa NGM agar
- Con un bisturí o cuchilla quirúrgica, cortar el trozo de agar deseado. (Esterilizar el instrumento con el fuego en cada uso)

- Trasladar el trozo de agar a la nueva placa. Asegurar el contacto arrastrando el trozo de agar por la superficie.
- Sellar la placa con Parafilm y conservarla a 20 °C en el incubador

5.2.5. Transferencia de gusanos de forma individual

La transferencia se ha realizado cuando ha sido necesario escoger los gusanos uno a uno para pasarlos a placas NGM agar nuevas o preparar portas para el microscopio.

Se ha utilizado un “picker” formado a partir de una pipeta Pasteur y un filamento de platino. El procedimiento es el siguiente:

- Esterilizar el instrumento con el fuego antes y después de cada uso
- Escoger y recoger un gusano para depositarlo en el sitio deseado.

5.2.6. Descontaminación (Bleaching) y sincronización de C. elegans

Esta técnica permite recoger y sincronizar gusanos de placas NGM agar. Además, permite limpiar y eliminar toda la contaminación existente en las placas.

Para poder aplicar la técnica, es necesario que en la placa NGM agar haya gran cantidad de gusanos hermafroditas adultos poniendo huevos.

El procedimiento es el siguiente:

- Añadir 1 – 2 mL de H₂O destilada a la placa NGM.
- Mover la placa con movimientos giratorios para limpiar y recoger el contenido.
- Pipetear el contenido en un tubo Falcon de 15 mL. Rellenar el contenido restante del tubo con H₂O destilada.
- Reposar el tubo 5 – 10 minutos hasta que los gusanos precipiten al fondo.
- Eliminar el líquido sobrenadante con ayuda de un aspirador vacío.

- Rellenar otra vez el tubo Falcon con H₂O destilada y dejar precipitar otros 5 – 10 minutos. Eliminar el líquido sobrenadante. Repetir estos pasos hasta que se eliminen las bacterias.
- Añadir 3 – 3,5 mL de solución Bleaching. La solución está formada por H₂O dd y lejía al 12 % y se conserva a 4 °C.
- Agitar el tubo durante 2 minutos y luego reposar hasta 10 minutos.
- Rellenar el tubo con H₂O destilada y centrifugar 1 minuto a 20 °C y 2000 rpm.
- Eliminar el líquido sobrenadante con ayuda de un aspirador vacío.
- Realizar tres lavados. Cada lavado consta de los siguientes pasos:
 - Añadir H₂O destilada hasta rellenar el tubo Falcon.
 - Centrifugar 1 minuto a 20 °C y 2000 rpm
 - Eliminar el líquido sobrenadante con la ayuda de un aspirador vacío.
- Tras realizar los tres lavados, añadir 200 µL de la solución M9 (solución salina que no contiene nutrientes)
- Incubar 24 horas en un agitador de tubos dentro del incubador a 20 °C. La incubación hace eclosionar los huevos.

5.2.7. Recogida de *C. elegans*

Esta técnica permite transferir una elevada cantidad de gusanos de una placa NGM agar a otra.

El procedimiento es el siguiente:

- Añadir 1 – 2 mL de H₂O destilada a la placa NGM.
- Mover la placa con movimientos giratorios para limpiar y recoger el contenido.
- Pipetear el contenido en un tubo Falcon de 15 mL. Rellenar el contenido restante del tubo con H₂O destilada.
- Reposar el tubo 5 – 10 minutos hasta que los gusanos precipiten al fondo.
- Eliminar el líquido sobrenadante con ayuda de un aspirador vacío.

- Rellenar otra vez el tubo Falcon con H₂O destilada y dejar precipitar otros 5 – 10 minutos. Eliminar el líquido sobrenadante. Repetir estos pasos hasta que se elimine toda la contaminación.
- Sembrar los gusanos en las placas de interés.
 - Resuspender el contenido del tubo
 - Depositar unas gotas en la placa nueva.
- Dejar secar la placa, sellar con Parafilm y mantener a 20 °C en un incubador.

5.3. Trabajo experimental

A continuación, se muestran los diferentes experimentos llevados a cabo, los cuales conforman el trabajo experimental realizado.

5.3.1. Ensayo de longevidad

El ensayo de longevidad realizado tiene como objetivo el conocer la supervivencia de los organismos *C. elegans* cuando son alimentados con *E. coli* o con *B. subtilis*.

Para analizar la supervivencia, se ha realizado el recuento diario del número de *C. elegans* vivos en distintas placas.

El material utilizado para el experimento es el siguiente:

- La cepa N2
- Placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Placas NGM agar grandes con alimento *B. subtilis*
- 4 placas NGM medianas con FUDR y alimento *E. coli*
- 4 placas NGM medianas con FUDR y alimento *B. subtilis*

La fluorodeoxyuridina (FUDR) es un compuesto que esteriliza a los gusanos. Al añadir este compuesto a las placas, los huevos que los gusanos pongan no estarán vivos, evitando la confusión entre gusanos de distintas generaciones y facilitando el ensayo.

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Crecer la cepa N2 durante al menos tres generaciones en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli* o *B. subtilis*.
- Realizar Bleaching para sincronizar los gusanos.
- Sembrar los gusanos sincronizados en placas NGM agar grandes con *E. coli* o *B. subtilis*.
- Controlar el crecimiento hasta que los gusanos lleguen a fase L3 o L4.
- Realizar la recogida de los gusanos de cada placa
- Sembrar los gusanos recogidos en placas NGM agar medianas con FUDR. Así, se inhibe su desarrollo. Estas son las placas preparadas:
 - o 4 placas NGM agar medianas con FUDR y *E. coli*
 - o 4 placas NGM agar medianas con FUDR y *B. subtilis*.
- Contar el número de gusanos sembrados en cada placa
- Mantener los gusanos a 20 °C en el incubador.

Una vez seguido este proceso, se realiza el recuento diario de los gusanos vivos que hay en las ocho placas preparadas.

Estos son los aspectos más relevantes del recuento:

- El recuento se ha realizado a la misma hora todos los días.
- Se han contado:
 - o Los gusanos vivos. Considerando como gusano vivo:
 - El gusano que se movía por sí mismo
 - El gusano que no se movía por sí mismo, pero que al tocarlo con una pestaña se movía
 - o Los gusanos muertos. Considerando como gusano muerto:
 - El gusano que no se movía por sí mismo y al tocarlo con una pestaña tampoco se movía

5.3.2. Ensayo de fertilidad

El ensayo de fertilidad realizado tiene como objetivo el conocer la descendencia de los organismos *C. elegans* cuando son alimentados con *E. coli* o con *B. subtilis*. Se comparan los resultados para ver si hay diferencias.

Para analizar la descendencia, se ha realizado el recuento diario del número de huevos que un individuo de *C. elegans* pone en una placa.

El material utilizado para el experimento es el siguiente:

- La cepa N2
- Placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Placas NGM agar grandes con alimento *B. subtilis*
- Placas NGM medianas con alimento *E. coli*
- Placas NGM medianas con alimento *B. subtilis*

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Crecer la cepa N2 durante al menos tres generaciones en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli* o *B. subtilis*.
- Escoger 4 gusanos por cada dieta que estén en fase joven adulto y que vayan a empezar a poner huevos en las siguientes horas.
- Transferir cada gusano a una placa NGM agar mediana. Estas son las placas preparadas:
 - o 4 placas NGM agar medianas con *E. coli*
 - o 4 placas NGM agar medianas con *B. subtilis*.
- Mantener los gusanos a 20 °C en el incubador.

Una vez seguido este proceso, se realiza el recuento diario de los huevos y larvas que hay en las placas. El recuento de cada placa se realiza durante tres días, para asegurar los resultados.

Para facilitar el recuento, cada día el gusano es transferido a una nueva placa NGM agar mediana.

El ensayo se ha realizado 4 veces repitiendo el procedimiento descrito.

5.3.3. Análisis descriptivo de las mitocondrias

El análisis descriptivo de las mitocondrias tiene como objetivo el conocer si hay diferencias en la morfología de las mitocondrias de los organismos *C. elegans* a lo largo del tiempo cuando son alimentados con *E. coli* o con *B. subtilis*.

Para conocer la morfología se han realizado una serie de imágenes a las mitocondrias de los gusanos. Se ha necesitado un microscopio de fluorescencia acoplado a una cámara.

El material utilizado para el experimento es el siguiente:

- La cepa SD1347. Las mitocondrias son fluorescentes.
- Placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Placas NGM agar grandes con alimento *B. subtilis*
- 4 placas NGM medianas con FUDR y alimento *E. coli*
- 4 placas NGM medianas con FUDR y alimento *B. subtilis*
- Equipo para la obtención de imágenes:
 - o Microscopio: Leica DM 6000 B acoplado a Leica CTR 6000 de Leica Microsystems
 - o Cámara: Digital Camera C10600 ORCA – R² de Hamamatsu

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Crecer la cepa N2 durante al menos tres generaciones en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli* o *B. subtilis*.
- Escoger 10 – 20 gusanos por cada dieta que estén en fase adulta
- Transferir los gusanos a placas NGM agar medianas con FUDR. FUDR, como ya se ha mencionado anteriormente, es un compuesto que esteriliza a los gusanos. En este caso se usan este tipo de placas para evitar transferir los gusanos a más placas. Estas son las placas preparadas:
 - o 4 placas NGM agar medianas con FUDR y *E. coli*
 - o 4 placas NGM agar medianas con FUDR y *B. subtilis*.
- Mantener los gusanos a 20 °C en el incubador

- Tomar imágenes en los días 1, 3, 5 y 8 (empezar el siguiente día a la preparación) utilizando el microscopio de fluorescencia.

Para tomar las imágenes hay que preparar las muestras. El procedimiento seguido es el siguiente:

- Preparar un tubo de ensayo con agar sólido al 4,5 %
- Calentar el tubo de ensayo con agar en una placa a 80 °C
- Concentrar el agar al 5 %:
 - Fundir el agar acercando el tubo a una llama
 - Mantener el agar fundido a 80 °C
- Preparar el porta:
 - Depositar una gota de agar fundido en el porta con una pipeta capilar
 - Tapar el porta con otro porta y presionar para que el agar se solidifique
 - Retirar el porta superior obteniendo el porta inferior con la gota de agar solidificada
- Preparar la muestra (Figura 6):
 - Depositar una gota de H₂O destilada en el portaobjetos con el agar
 - Transferir 4 – 6 gusanos de la placa NGM mediana con FUDR correspondiente
 - Retirar el agua con una pestaña
 - Tapar el porta con un cubreobjetos
 - Sellar los bordes del cubreobjetos con vaselina:
 - Fundir la vaselina sólida a 80 °C
 - Depositar la vaselina fundida en los bordes del cubreobjetos con un pincel
 - Marcar con un rotulador los gusanos para facilitar el enfoque



Figura 6. Una muestra preparada (Creación propia)

Las imágenes se han realizado utilizando el objetivo de x 100 y a escala de 0,5. Respecto a las condiciones de exposición de las imágenes varían un poco. La razón es la siguiente: se ha buscado obtener la mayor resolución de las mitocondrias, por lo que se iban cambiando las condiciones con el objetivo de obtener la mejor imagen. Además, como el ensayo se ha realizado en diferentes días, cada día se ha tenido que preparar una muestra diferente y a pesar de seguir el mismo procedimiento, las condiciones han podido variar.

También cabe destacar que por cada muestra se han realizado en torno a 30 – 40 imágenes, pero, solo se ha elegido la mejor para presentarla. Junto con la imagen con la luz fluorescente también se ha obtenido la imagen del gusano con luz Nomarski, luz blanca.

*5.3.4. Cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa *daf-2(e1370)* que tienen marcadas las mitocondrias con GFP*

El objetivo de este experimento es conseguir cruzar la cepa SD1347 con la cepa JK194. El conseguirlo permitiría crear una nueva vía para conocer si el receptor de la insulina produce algún tipo de cambio en las mitocondrias.

El material utilizado para el experimento es el siguiente:

- La cepa SD1347
- La cepa JK194
- Placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Placas NGM agar grandes con alimento *B. subtilis*
- Placas NGM pequeñas con alimento *E. coli*
- Placas NGM pequeñas con FUDR y alimento *B. subtilis*

- Equipo para la visualización:
 - o Microscopio: Leica MZ16 FA de Leica Microsystems
 - o Fuente de luz: Leica EL6000 Light Source de Leica Microsystems

En primer lugar, se ha realizado un experimento previo con el objetivo de establecer el método de selección de los gusanos de interés. El experimento tenía como objetivo confirmar que los gusanos de la cepa JK194 entran en fase Dauer cuando se cultivan a 25 °C para poder utilizar esta característica como condición para la selección de los gusanos resultantes del cruce.

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Crecer la cepa JK194 durante en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli* a 15 °C en el incubador.
- Escoger 2 gusanos que estén en fase adulta y que vayan a empezar a poner huevos en las siguientes horas.
- Transferir cada gusano a una placa NGM agar pequeña con alimento *E. coli*.
- Conservar los gusanos a 15 °C en el incubador toda la noche
- Comprobar que el gusano ha puesto huevos y eliminar el gusano adulto
- Incubar las placas 48 horas a 25 °C en el incubador.
- Realizar los siguientes cambios en la conservación:
 - o Mantener una placa conservándose a 25 °C en el incubador
 - o Cambiar y conservar la otra placa a 15 °C en el incubador
- Comprobar que hay diferencias entre las dos placas

Para distinguir bien la morfología del gusano Dauer de la cepa *Daf-2*, el experimento piloto se ha hecho en paralelo con la cepa N2. Los gusanos N2 no entran en fase Dauer. Por ello, se ha podido realizar la comparación entre el tamaño y la morfología de los gusanos de las dos cepas.

Una vez comprobado que el experimento piloto ha salido como se esperaba, se ha procedido a realizar el cruce.

El procedimiento seguido es el siguiente:

- Crecer la cepa SD1347 durante en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Crecer la cepa JK194 durante en placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*
- Seleccionar machos de la cepa SD1347. Hay dos opciones:
 - o De las placas NGM agar grandes con alimento *E. coli*. Ha resultado ser complicado y se han encontrado pocos machos
 - o Inducir machos:
 - Transferir 10 – 20 gusanos en fase L4 de la cepa SD1347 a una placa pequeña de NGM con *E. coli*
 - Incubar la placa 6 horas a 30 °C en el incubador.
- Incubar la placa al menos 24 horas a 20 °C en el incubador
- Transferir a una placa NGM agar pequeña con alimento *E. coli* los machos (en L4, joven adulto) de la cepa SD1347 seleccionados (6 – 8) y 6 gusanos hermafroditas (L4) dela cepa JK194.
- Incubar las placas 24 horas a 15 °C en el incubador
- Escoger los hermafroditas y transferir cada gusano a una placa NGM agar pequeña con alimento *E. coli*
- Incubar las placas a 15 °C en el incubador hasta que pongan descendencia (F1)
- Escoger los hermafroditas que estén en fase larvaria (30 – 40) y transferir cada larva a una placa NGM agar pequeña con alimento *E. coli*
- Incubar las placas a 25 °C en el incubador 24 – 48 horas
- Seleccionar las placas cuyos gusanos han entrado en fase Dauer
- Incubar estas placas a 15 °C en el incubador hasta que pongan descendencia (F2)
- Observar la fluorescencia de los F1 candidatos y su descendencia (F2):
 - o Fluorescentes: candidatos de interés
 - o No fluorescentes: candidatos de no interés

6. RESULTADOS

En la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos en los diferentes experimentos llevados a cabo en el trabajo experimental.

6.1. Resultados del ensayo de longevidad

Con el objetivo de conocer si la dieta influye en la longevidad de *C. elegans*, se realizó un ensayo de longevidad. Para ello, se hizo el recuento diario del número de *C. elegans* vivos alimentados con *E. coli* o con *B. subtilis*.

Para poder visualizar e interpretar los datos obtenidos de la mejor manera posible, se han construido curvas de supervivencia.

En la Tabla 2 se muestran los datos de supervivencia contando desde día 1 de adulto obtenidos en el ensayo (n=1)

Tabla 2. Resultados del ensayo de longevidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* o *B. subtilis*. Los datos se presentan en valores de porcentaje de supervivencia (n=1). (Creación propia)

Día	Supervivencia (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
0	100	100
1	100	100
2	100	100
3	100	100
4	100	100
5	100	100
6	98	100
7	95	100
8	87	97
9	77	94
10	66	92
11	55	88
12	44	78

Día	Supervivencia (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
13	34	70
14	15	64
15	5	60
16	0	56
17	-	53
18	-	47
19	-	34
20	-	23
21	-	13
22	-	8
23	-	4
24	-	0

Con los resultados se han creado las diferentes curvas de supervivencia. En la Figura 7 se muestran las curvas supervivencia obtenidas para las dos dietas.

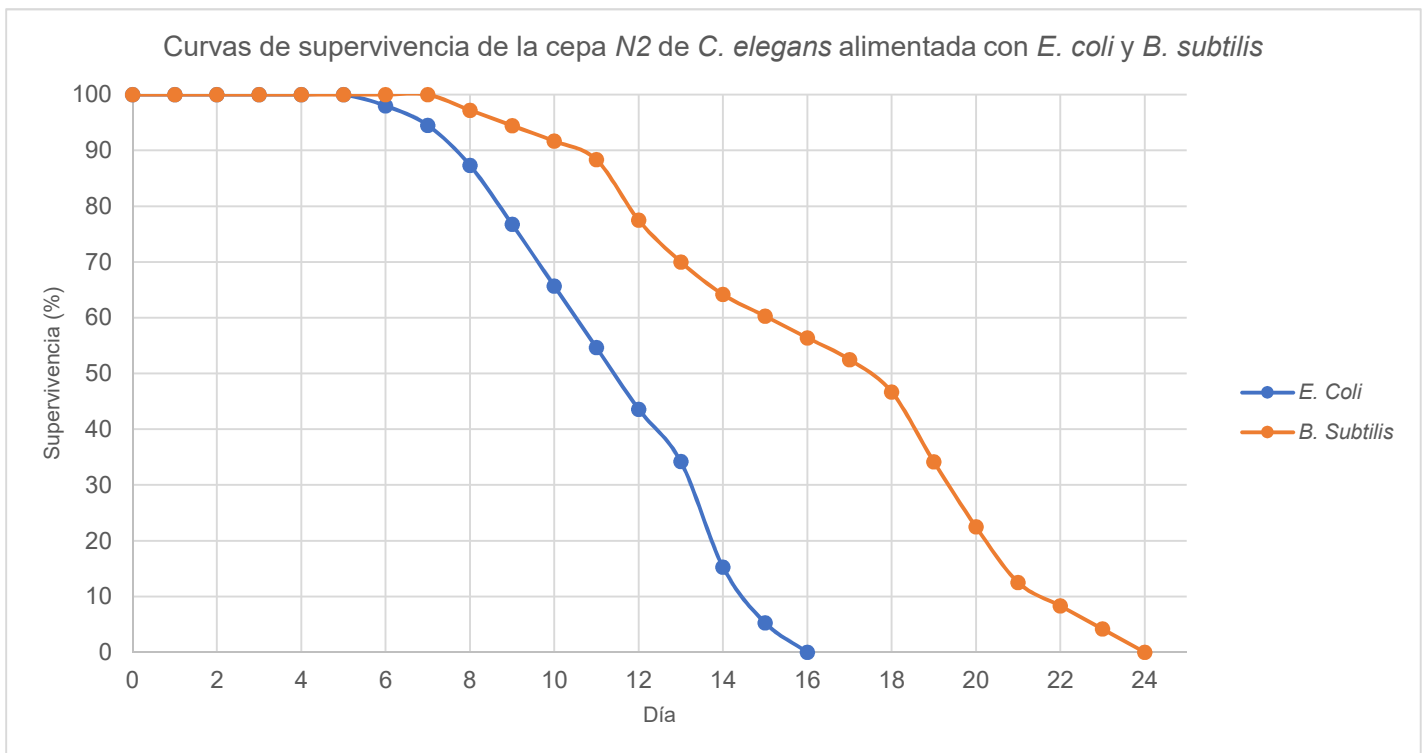


Figura 7. Curvas de supervivencia de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* (azul) y *B. subtilis* (naranja). (Creación propia)

Con estos datos, se puede calcular la vida media de los gusanos. Es el tiempo en el cual el 50 % de la población total está viva y el otro 50 % ha muerto. La vida media de *C. elegans* alimentado con dieta de *E. coli* (dieta habitual) es de 11,5 días y la vida media de los individuos alimentados con *B. subtilis* es de 17,5 días. Por lo tanto, los organismos *C. elegans* alimentados con *B. subtilis* han tenido una supervivencia del 66,7 % más en comparación con los alimentados con *E. coli*.

6.2. Resultados del ensayo de fertilidad

Con el objetivo de conocer la cantidad de descendencia de *C. elegans* dependiendo de su dieta se hizo un ensayo de fertilidad en el que se realizó el recuento diario del número de huevos y larvas.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se realizaron cuatro ensayos de fertilidad. Con los datos obtenidos se ha podido calcular la descendencia total de cada gusano analizado y se han construido las curvas de fertilidad para cada dieta. Los resultados de cada ensayo de manera conjunta, para poder compararlos.

En la Tabla 3 se muestran los datos de fertilidad diaria obtenidos en los cuatro ensayos realizados para cada tipo de dieta. Además, también se muestra el cálculo de la media y la desviación estándar de cada día.

Tabla 3. Resultados de los ensayos de fertilidad (n=4) de *C. elegans* alimentada con *E. coli* o *B. subtilis*. Los datos se presentan en valores de descendencia. También se muestra la media aritmética y la desviación estándar correspondiente a cada día. (Creación propia)

Dieta: <i>E. coli</i>						
Días	Descendencia				Media	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4		
0	0	0	0	0	0	0
1	91	98	89	90	92	4
2	94	83	89	84	88	5
3	55	54	72	76	64	11
4	27	22	26	40	29	8
5	13	7	6	12	10	4
Dieta: <i>B. subtilis</i>						
Días	Descendencia				Media	Desviación estándar
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 4		
0	0	0	0	0	0	0
1	79	88	80	87	84	5
2	64	71	79	77	73	7
3	32	47	54	52	46	10
4	19	22	22	21	21	1
5	11	8	2	1	6	5

Con la media de los datos diarios obtenidos en los cuatro ensayos realizados se han creado las curvas de fertilidad, Figura 8.

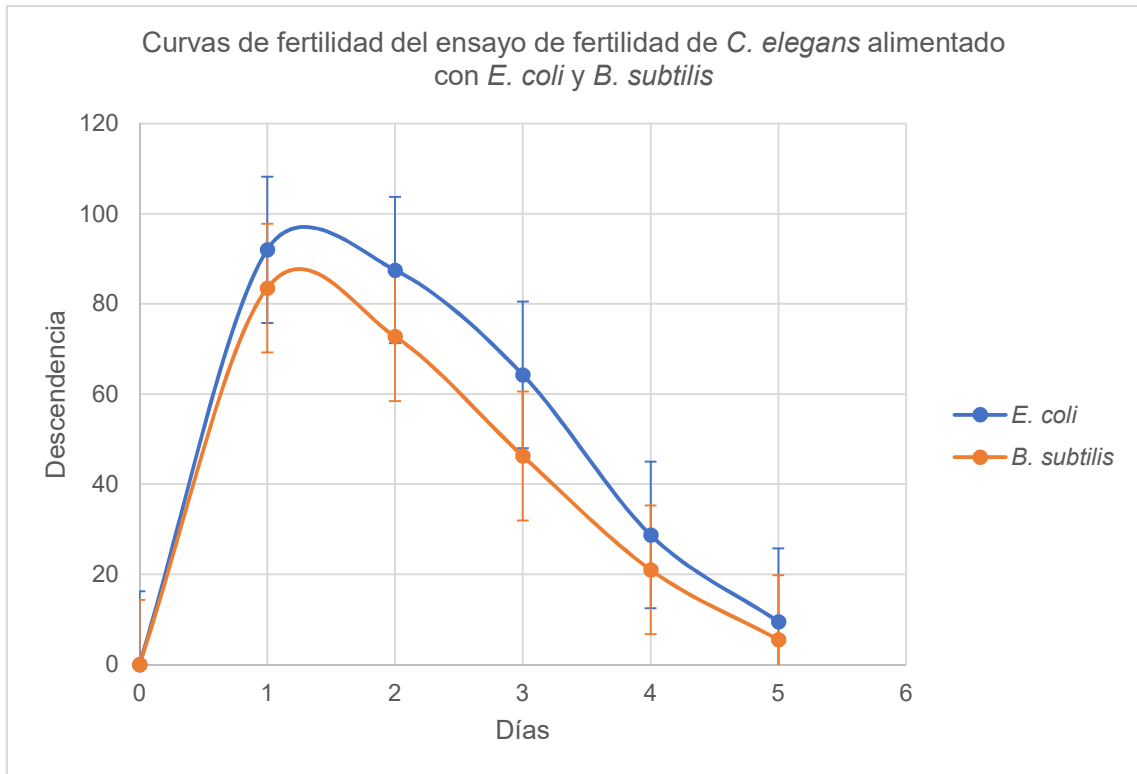


Figura 8. Curvas de fertilidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* (azul) y *B. subtilis* (naranja) (n=4). Cada punto representa la media de los datos obtenidos para cada día en los cuatro ensayos realizados. (Creación propia)

Una vez representadas las curvas de fertilidad se ha calculado la descendencia total. En la Tabla 4 se muestran los datos de descendencia total obtenidos en los cuatro ensayos realizados. Además, también se muestra el cálculo de la media y la desviación estándar para cada tipo de dieta.

Tabla 4. Resultados de los ensayos de fertilidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* o *B. subtilis*. Los datos se presentan en valores de descendencia total. También se muestra la media aritmética y la desviación estándar correspondiente a cada tipo de dieta. (Creación propia)

Ensayo de fertilidad	Descendencia total	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
1	281	206
2	265	236
3	282	238
4	301	238
Media	282	230
Desviación estándar	15	16

Por lo tanto, en el ensayo de fertilidad realizado (n=4), *C. elegans* alimentado con *E. coli* tiene una descendencia total de 282 ± 15 ; y *C. elegans* alimentado con *B. subtilis* tiene una descendencia total de 230 ± 16 .

En la Figura 9 se muestra la comparativa entre los cuatro ensayos de fertilidad realizados de *C. elegans* alimentado con *E. coli*.

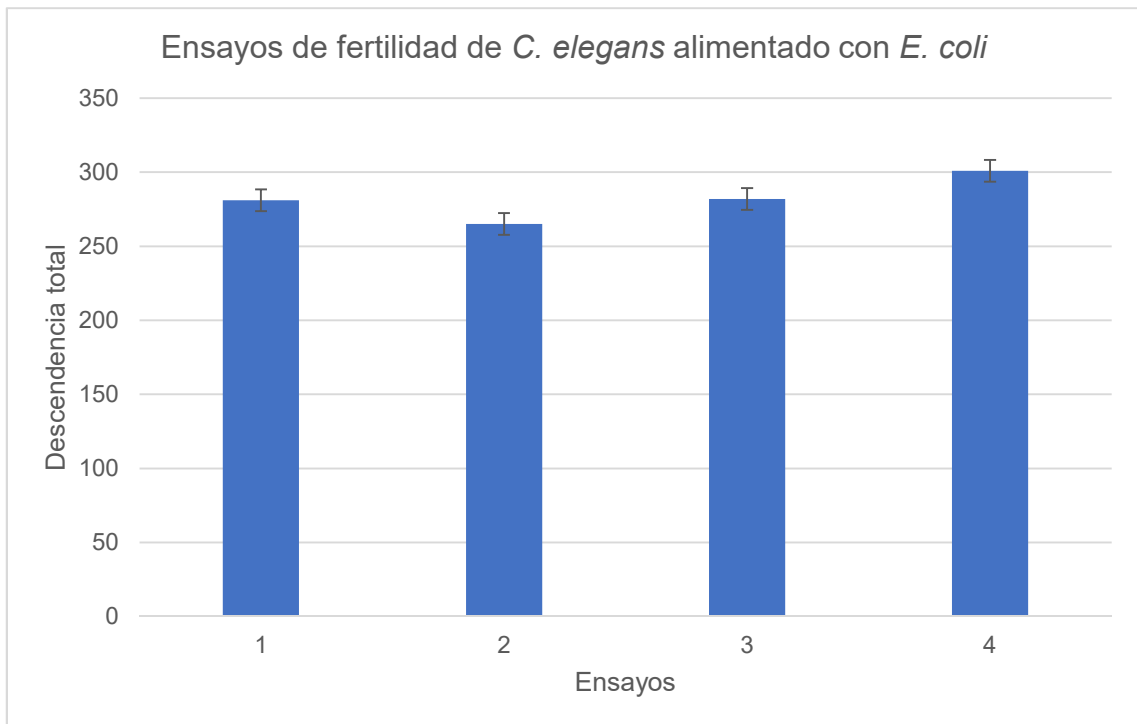


Figura 9. Comparativa de la descendencia total obtenida en los cuatro ensayos de fertilidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli*. (Creación propia)

En la Figura 10 se muestra la comparativa entre los cuatro ensayos de fertilidad realizados de *C. elegans* alimentado con *B. subtilis*.

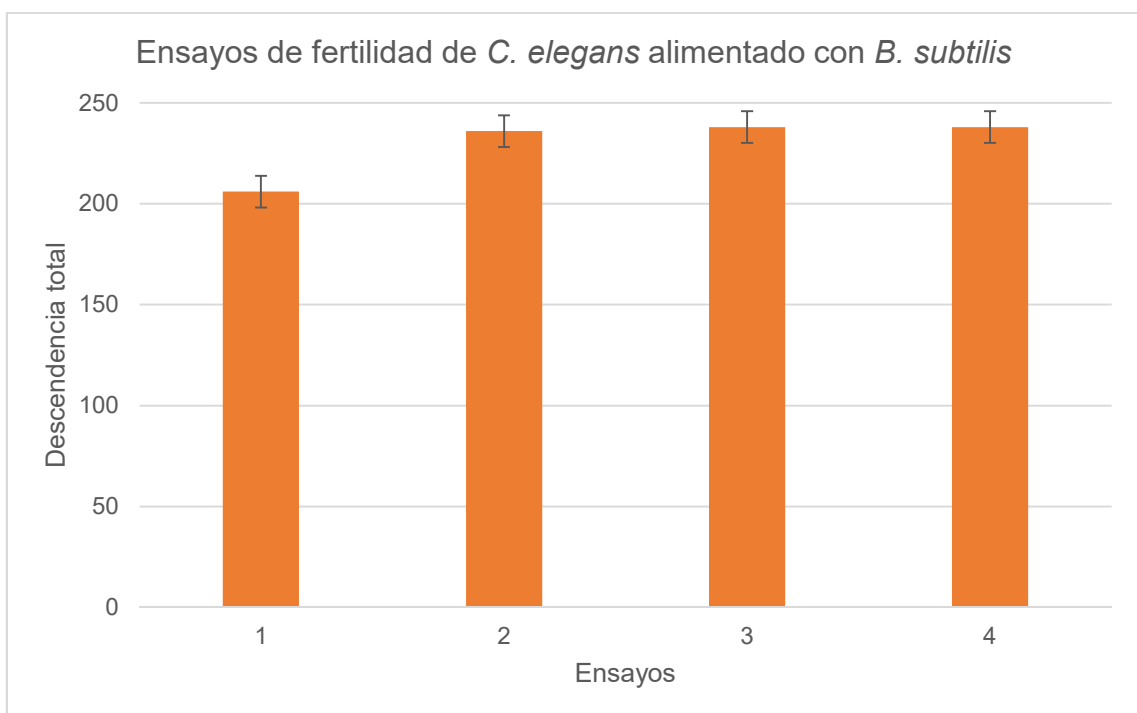


Figura 10. Comparativa de la descendencia total obtenida en los cuatro ensayos de fertilidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *B. subtilis*. (Creación propia)

En la Figura 11 se muestra la comparativa entre la descendencia total media obtenida en los ensayos fertilidad realizados de *C. elegans* alimentado con *E. coli* y *B. subtilis*

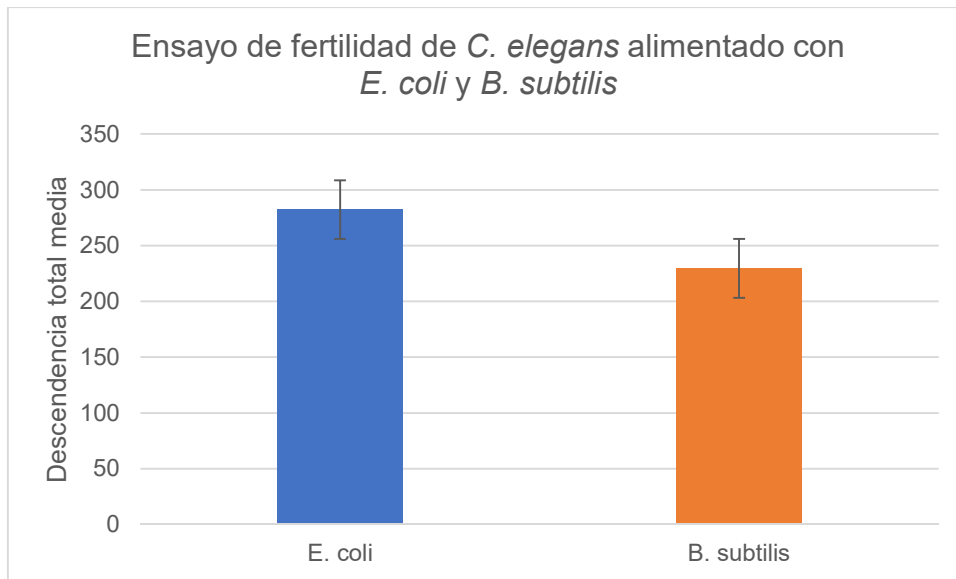


Figura 11. Comparativa de la descendencia total media obtenida en ensayos de fertilidad de la cepa N2 de *C. elegans* alimentada con *E. coli* (azul) y *B. subtilis* (naranja) (n=4). (Creación propia)

Para conocer si las diferencias obtenidas son significativas, se ha realizado un análisis de datos con la prueba t de Student para medias de dos muestras emparejadas. Los resultados obtenidos en dicha prueba son estos: $t[4] = 5,84$; $p = 0,014$.

El valor p obtenido es mayor que el valor alfa (0,01) utilizado para la prueba, por lo que estadísticamente las diferencias de los resultados no son significativos.

6.3. Análisis descriptivo de las mitocondrias

Para saber si la morfología de las mitocondrias es indicativa del estado de envejecimiento de *C. elegans*, y si varía con la dieta se tomaron imágenes de las mitocondrias de *C. elegans* adultos a diferentes tiempos y alimentados con *E. coli* y con *B. subtilis*.

Las imágenes se realizaron en los días 1, 3, 5 y 8 de fase adulta de los gusanos, con el objetivo de poder realizar una comparación de la morfología de las mitocondrias a lo largo del tiempo.

En la Figura 12 y la Figura 13 se muestran las imágenes obtenidas en el ensayo. Las mitocondrias están marcadas en un cuadrado rojo. Cabe destacar que las esferas de blancas son los núcleos. La Figura 12, muestra las mitocondrias de los *C. elegans* adultos alimentados con *E. coli* a lo largo de los días, y la Figura 13, muestra las mitocondrias de los *C. elegans* adultos alimentados con *B. subtilis* a lo largo de los días.

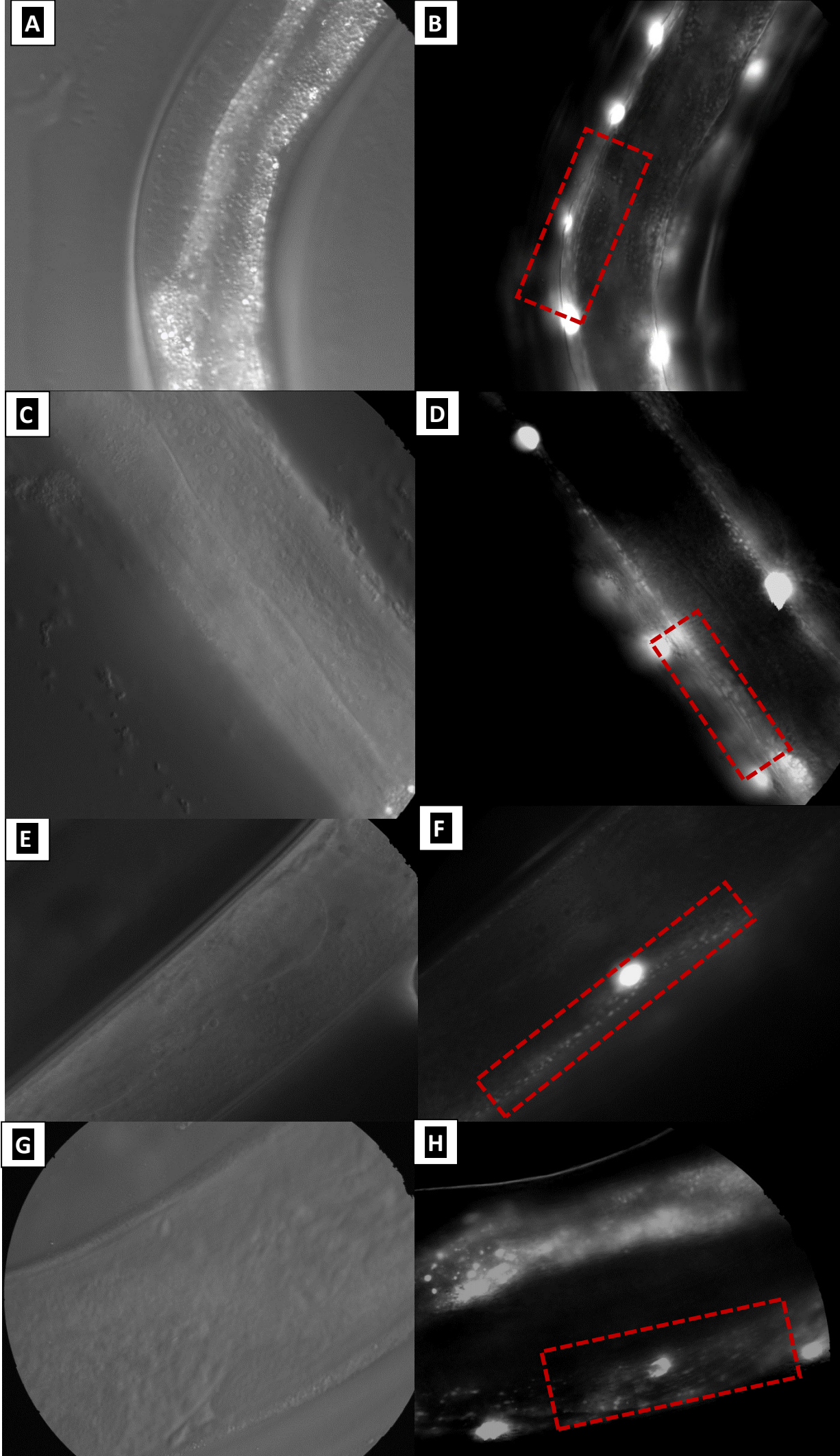


Figura 12. Imágenes de las mitocondrias de la cepa SD1347 de *C. elegans* alimentada con *E.coli*. **A:** Día 1 N; **B:** Día 1 FL; **C:** Día 3 N; **D:** Día 3 FL; **E:** Día 5 N; **F:** Día 5 FL; **G:** Día 8 N; **H:** Día 8 FL. FL = fluorescencia y N = Nomarski, con luz blanca. Las mitocondrias están marcadas con un cuadrado rojo (las esferas blancas son los núcleos). Imágenes tomadas con objetivo de x 100, a escala de 0,5 y con condiciones de exposición diferentes. (Creación propia)

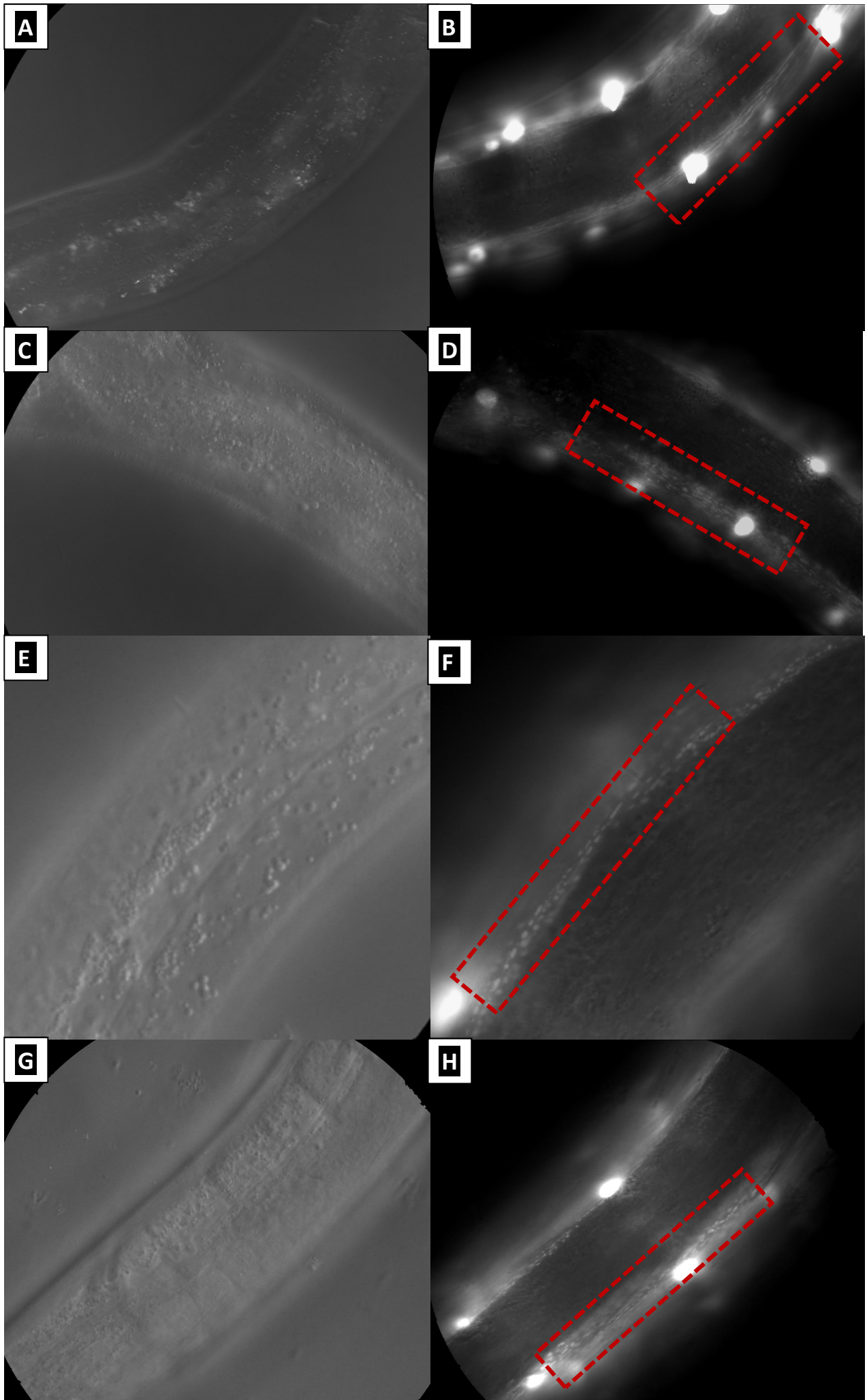


Figura 13. Imágenes de las mitocondrias de la cepa SD1347 de *C. elegans* alimentada con *B. subtilis*. **A:** Día 1 N; **B:** Día 1 FL; **C:** Día 3 N; **D:** Día 3 FL; **E:** Día 5 N; **F:** Día 5 FL; **G:** Día 8 N; **H:** Día 8 FL. FL = fluorescencia y N = Nomarski, con luz blanca. Las mitocondrias están marcadas con un cuadrado rojo (las esferas blancas son los núcleos). Imágenes tomadas con objetivo de x 100, a escala de 0,5 y con condiciones de exposición diferentes. (Creación propia)

Para poder realizar una mejor comparación entre las mitocondrias de ambas dietas en la Figura 14 se muestran las imágenes con las mitocondrias ampliadas. En esta figura se pueden observar las diferencias entre las mitocondrias de los gusanos alimentados con *E. coli* o con *B. subtilis*.

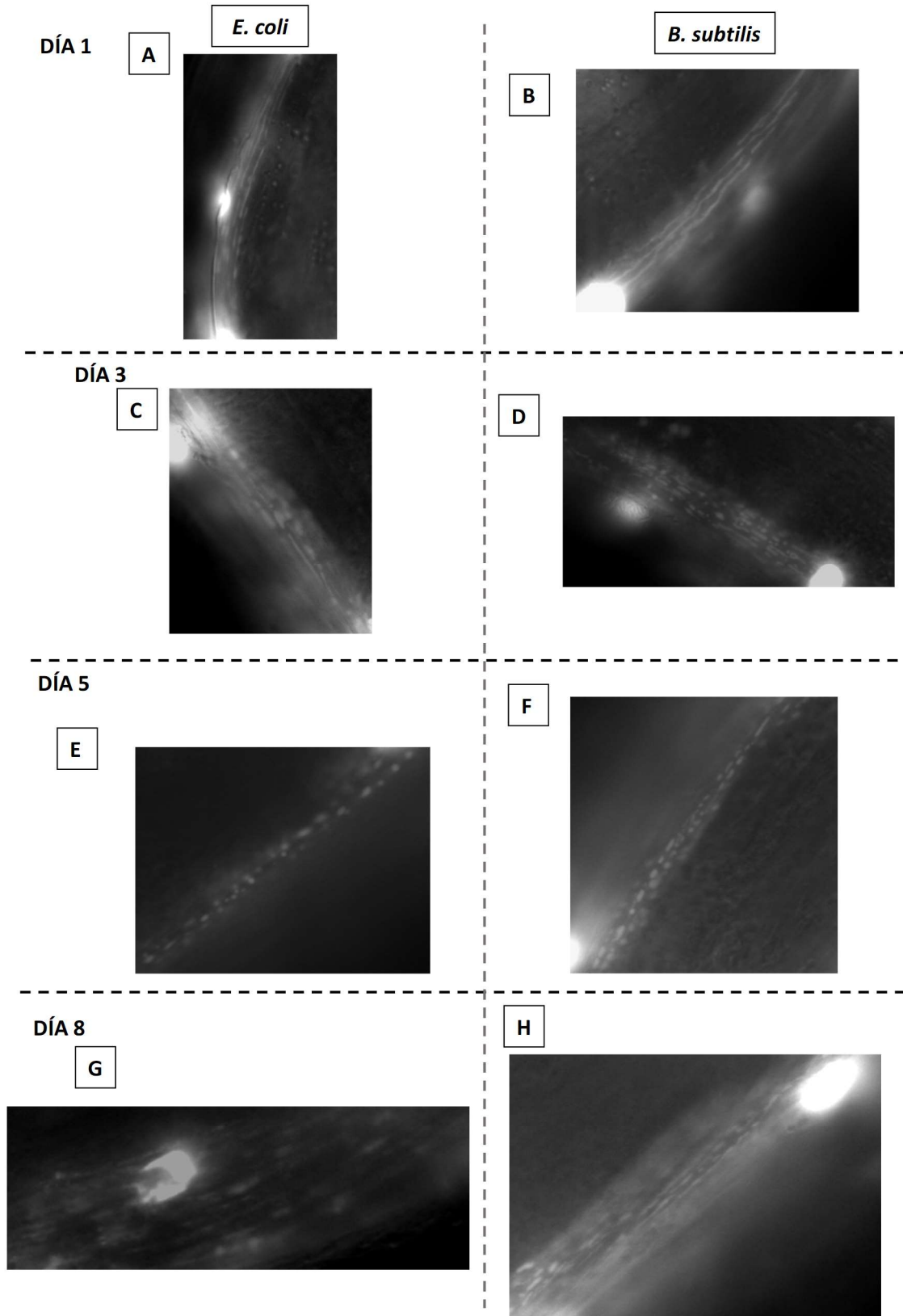


Figura 14. Imágenes de las mitocondrias de la cepa SD1347 de *C. elegans* alimentada con *E. coli*. A: Día 1 FL; C: 3 FL; E: Día 5 FL; G: Día 8 FL y con *B. subtilis* B: Día 1 FL; D: 3 FL; F: Día 5 FL; H: Día 8 FL FL = fluorescencia (las esferas blancas son los núcleos). Imágenes tomadas con objetivo de x 100, a escala de 0,5 y con condiciones de exposición diferentes. (Creación propia)

Para describir la morfología de las mitocondrias se utiliza la siguiente terminología:

- Estado tubular. Las mitocondrias están completamente fusionadas y tienen forma alargada.
- Estado intermedio. Las mitocondrias están fusionadas y mantienen la forma alargada.
- Estado fragmentado. Las mitocondrias están levemente fragmentadas y la forma alargada se mantiene aunque es menos visible.
- Estado muy fragmentado. Las están completamente fragmentadas y su forma es más bien esférica.

Las mitocondrias sufren la siguiente evolución: estado tubular, estado intermedio, estado fragmentado y estado muy fragmentado. En las imágenes obtenidas en el trabajo, esta evolución es visible, por lo que se demuestra que los gusanos sufren una fragmentación mitocondrial a lo largo del tiempo.

Esta fragmentación, en cambio, es diferente dependiendo del tipo de dieta utilizado. De hecho, si se comparan las imágenes de los gusanos alimentados con *E. coli* con los gusanos alimentados con *B. subtilis*, se puede observar como la fragmentación en el caso de los alimentados con *E. coli* es muchos más rápida y evidente que en el caso de los alimentados con *B. subtilis*. Además, en las imágenes tomadas de los gusanos alimentados con *B. subtilis* las mitocondrias se muestran con mayor facilidad que en las tomadas de los gusanos alimentados con *E. coli*.

6.4. Resultados del cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa *daf-2(e1370)* que tienen marcadas las mitocondrias con GFP

En el caso concreto del trabajo el cruce se va a realizar con las siguientes cepas de gusano:

- SD1347. Tiene una mutación en el cromosoma I que hace que sus núcleos y mitocondrias sean visibles con luz fluorescente.
- JK194. Tiene una mutación el cromosoma III hace que sea termo-sensible, entrando en fase dauer si se cultiva a temperatura de 25 °C.

A continuación, se muestra la estrategia que se va a seguir para realizar el cruce.

Para empezar, como se muestra en la Figura 13, se realiza la fecundación de los JK194, que son hermafroditas, con los machos de la cepa SD1347. Los hermafroditas tendrán el genotipo que se muestra.

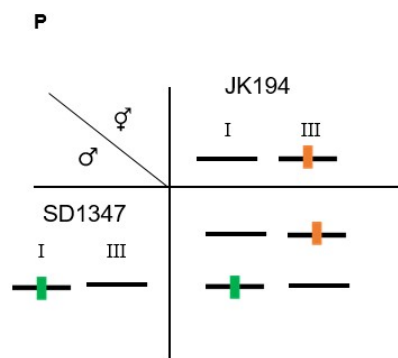


Figura 13. Esquema del cruce, paso 1. Un hermafrodita de la cepa JK194 con la mutación el cromosoma III (en naranja) se cruza con un macho de la cepa SD1347 con la mutación el cromosoma I (en verde). (Creación propia)

A continuación, los hermafroditas pondrán su descendencia (F1) como se muestra en la Figura 14. Como se muestra en la figura, en los descendientes, habrá 16 genotipos diferentes posibles, entre los cuales está el de interés (encuadrado con color rojo).

Para poder disminuir el número de posibilidades se realizará la selección de los candidatos de interés. Esta selección se hará en dos fases diferentes.

Primero, se seleccionan los gusanos con 4 genotipos específicos (los marcados en verde) de entre los 16. Como se puede ver en la imagen, estos 4 genotipos son homocigotos para la mutación en el cromosoma III, por lo que mostrarán el fenotipo correspondiente a JK194. Basándose en este fenotipo se podrán seleccionar.

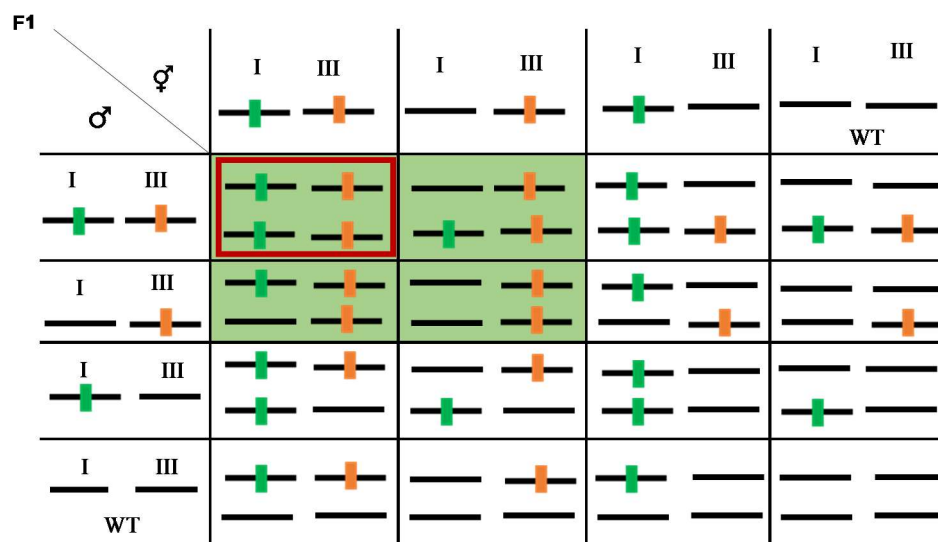


Figura 14. Esquema del cruce, paso 2. Los 16 genotipos posibles de la descendencia (F1) de los resultantes del paso 1. En verde, marcados los genotipos de interés para el primer paso de la selección. Encuadrado en rojo, el genotipo de interés, que se seleccionará en el paso 3. (Creación propia)

Una vez seleccionados los 4 genotipos de interés, se realizará la segunda selección (Figura 15). En concreto, se dejarán que pongan descendencia (F2) y se seleccionará el único gusano que sea homocigoto para la mutación en el cromosoma I, es decir, el que muestre el fenotipo correspondiente a SD1347.

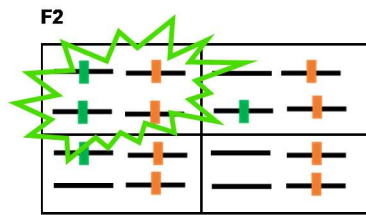


Figura 15. Esquema del cruce, paso 3. Los 4 genotipos posibles de la descendencia (F2) de los seleccionados del paso 2. En verde, marcado el genotipo de interés, que se selecciona en este paso. (Creación propia)

El objetivo de este experimento es tener un modelo con el que estudiar el estado de las mitocondrias cuando el receptor de la insulina *daf-2* no es funcional.

En el primer experimento previo realizado, estas son los resultados obtenidos:

- Los gusanos de la cepa JK194 han tardado 48 horas en entrar en fase Dauer cuando se han incubado a 25 °C.
- Una vez en fase Dauer, han tardado 48 – 72 horas en salir de la fase Dauer y seguir con su desarrollo normal tras pasarlos a 25 °C.
- El principal problema encontrado: una alta proporción de ellos han muerto debido a su tendencia de trasladarse a las esquinas de las placas cuando se incubaban a 25 °C.

Respecto segunda parte del experimento, estos son los resultados obtenidos:

- La selección de machos de la cepa SD1347 ha resultado ser bastante complicada. No se han podido encontrar gran cantidad de machos. Como solución, se ha realizado la inducción de machos por temperatura, como se ha descrito anteriormente.
- Se han realizado dos cruces. El segundo de ellos ha sido el más exitoso.
- Los siguientes pasos del cruce han seguido el procedimiento descrito anteriormente sin ninguna alteración.
- Respecto a la selección de los gusanos F1 para proceder a la selección mediante la temperatura, se han seleccionado 44 gusanos.

- Durante la selección mediante la temperatura se han presentado diferentes problemas:
 - Durante las 48 horas de incubación a 25 °C: en la mayoría de placas se han podido observar surcos que el gusano había dejado en la placa, pero no al propio gusano.
 - Debido a este problema, una vez transcurridas las 48 horas todas las placas han sido cambiadas a 15 °C, sin realizar ningún tipo de selección.
 - A partir de ese momento, las placas se han incubado a 15 °C. De las 44 placas se ha encontrado lo siguiente:
 - En 6 placas, la recuperación de los gusanos se ha dado antes del tiempo previsto. Por lo que estos gusanos han sido considerados como de no interés.
 - En las placas restantes. Lo ocurrido ha sido lo siguiente:
 - En 11 placas la recuperación de los gusanos ha sido la prevista. De los 11, 4 han resultado ser machos. Por lo que el resto de los gusanos (los hermafroditas) han sido considerado como de interés.
 - En 6 placas la recuperación de los gusanos ha tardado más tiempo de lo esperado pero se han conseguido desarrollar con normalidad. Por lo que estos gusanos han sido considerados como de interés.
 - En 21 placas restantes no se ha podido observar ningún gusano y cambio. Por lo que estos gusanos han sido considerados como de no interés.
- Los 13 gusanos candidatos han seguido el desarrollo como era previsto y han puesto descendencia (F2).
- La selección mediante fluorescencia también ha presentado ciertos problemas:
 - Los gusanos en los que se ha podido ver que tenían esta característica estaban en fase adulta
 - Se han tenido que esperar 3 – 4 días más de lo esperado para poder realizar esta prueba.

- De los 13 gusanos seleccionados se ha obtenido los siguiente:
 - 8 han mostrado poder observarse con luz fluorescente. Estos gusanos son de interés. Resultan ser los candidatos a cumplir los requisitos para ser los gusanos resultantes del cruce de interés. Por lo tanto, son los que se han mantenido.
 - 5 no han podido observarse con la luz fluorescente. Estos gusanos no son de interés.

7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En la siguiente sección se discuten los resultados obtenidos en los diferentes experimentos llevados a cabo en el trabajo experimental.

7.1. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de longevidad

Con los resultados obtenidos (Figura 7) estas son las principales conclusiones que se pueden sacar del ensayo de longevidad realizado.

La vida media de *C. elegans* alimentado con dieta de *E. coli* (dieta habitual) es de 11,5 días y la vida media de los individuos alimentados con *B. subtilis* es de 17,5 días. Por lo tanto, los organismos *C. elegans* alimentados con *B. subtilis* han tenido una supervivencia del 66,7 % más en comparación con los alimentados con *E. coli*. Todo ello lleva a la conclusión de que al alimentar los gusanos con *B. subtilis* su supervivencia ha aumentado.

Estos datos son preliminares, ya que el ensayo hay que repetirlo al menos tres veces, pero, concuerdan con los resultados obtenidos en otros laboratorios.

Respecto a las razones por las que *B. subtilis* aumenta la longevidad de *C. elegans* estas son las causas que respaldan los resultados obtenidos.

Una de las principales razones que respaldan los resultados es la producción del óxido nítrico. Se ha demostrado que el óxido nítrico es clave en *C. elegans*, ya que aumenta la longevidad y la resistencia frente al estrés. También es conocido que *C. elegans* no puede producir su propio óxido nítrico, por lo que lo adquiere por la alimentación. (Gusarov et al., 2013)

En cuanto a las dietas de estudio en este ensayo, se sabe que la bacteria *E. coli* no puede producir óxido nítrico. En cambio, *B. subtilis*, al igual que otras bacterias de su mismo género, sí que produce óxido nítrico. Por ello, podría ser que los gusanos alimentados con *B. subtilis* presentan una mayor supervivencia frente a los alimentados con *E. coli*. *B. subtilis* proporciona óxido nítrico a los gusanos promoviendo su longevidad y protegiéndolos frente al estrés. (Donato et al., 2017)

Algo parecido ocurre con el antioxidante coQ, que al contrario que el óxido nítrico, *C. elegans* sí que puede producirlo. *E. coli* también es capaz de producir coQ, pero, *B. subtilis* no. (Sánchez-Blanco et al., 2016)

Por ello, en los gusanos alimentados con *E. coli* la cantidad de coQ es mayor que en los alimentados con *B. subtilis*. Al tener más especies antioxidantes, sus niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) son menores. Esto produce un desequilibrio en la homeostasis REDOX celular, acortando la vida del gusano. (Walker et al., 2005)

Por último, también hay que tener en cuenta que la alimentación de los gusanos se basa en utilizar bacterias vivas. Si los gusanos no procesan adecuadamente las bacterias estas pueden entrar en el intestino del gusano y colonizarlo. (Yu et al., 2015)

Cabe destacar que se sabe que la colonización de *E. coli* en el intestino de *C. elegans* resulta ser perjudicial. Por ello, es una de las principales causas de muerte en los gusanos alimentados con *E. coli*. (Sánchez-Blanco et al., 2016). Esto también apoya la mayor longevidad de los gusanos alimentados con *B. subtilis* frente a los alimentados con *E. coli*.

7.2. Discusión de los resultados obtenidos en el ensayo de fertilidad

Con los resultados obtenidos (Figura 11) estas son las principales conclusiones que se pueden sacar del ensayo de fertilidad realizado.

En el ensayo de fertilidad realizado (n=4), los organismos *C. elegans* alimentados con *E. coli* (dieta habitual) han tenido una descendencia total de 282 ± 15 en las condiciones del laboratorio de trabajo. En cambio, los organismos *C. elegans* alimentados con *B. subtilis* han tenido una descendencia total de 230 ± 16 en las condiciones del laboratorio de trabajo. Todo ello lleva a la conclusión de que al alimentar los gusanos con *B. subtilis* su descendencia se ve disminuida.

Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios. Para empezar, el número medio de descendencia de un adulto *C. elegans* alimentado con *E. coli* es de entre 200 y 300. (Lee, Kang, 2017) (Hoang et al., 2019). Los resultados obtenidos en el ensayo realizado entran dentro de este rango.

Respecto a las diferencias entre el número de descendencia en los gusanos alimentados con *E. coli* y *B. subtilis*, en las publicaciones los autores consideran que no hay diferencias significativas (Hoang et al., 2019) (Sánchez-Blanco et al., 2016). Los resultados de estos estudios sí que muestran un leve aumento en la descendencia de los gusanos alimentados con *E. coli* en comparación con los alimentados con *B. subtilis*. Pero, los resultados de los autores de los citados estudios no consideran las diferencias como estadísticamente significativas.

La producción de huevos es un proceso metabólico que requiere mucha energía. Por ello, puede llegar a utilizarse como indicador el estado metabólico del gusano. Hay diferentes factores que pueden afectar al metabolismo de los organismos modelo *C. elegans*, por ejemplo, la restricción dietética. La restricción dietética implica una reducción de la ingesta calórica y está relacionada con el aumento de la vida útil y la reducción de la fertilidad. (Cabreiro, Gems, 2013)

En vista a esto, diferentes estudios han trabajado en la hipótesis de que *C. elegans* tenga un comportamiento alimentario diferente dependiendo del tipo de dieta con el que se alimenta. En concreto, se ha estudiado si en las mismas condiciones *C. elegans* no digiere tan bien las células de *B. subtilis* como las de *E. coli*. Esto supondría que los gusanos alimentados con *B. subtilis* no ingiriesen la misma cantidad de alimento que los alimentados con *E. coli*, implicando una restricción dietética. (Greer, Brunet, 2009)

Pero, los resultados de dichos estudios indican que en la realidad *C. elegans* no muestra grandes cambios de comportamiento alimentario al utilizar un tipo de dieta u otra. De hecho, se ha comprobado que en general, los gusanos digieran los dos tipos de bacterias eficazmente. (Laaberki, Dworkin, 2020)

Por ello, la diferencia en los datos de fertilidad no se puede relacionar con la restricción dietética y no es considerada significativa. En este punto, cabe destacar, que en el ensayo realizado en este trabajo, los resultados obtenidos tampoco han mostrado diferencias estadísticamente significativas. Por lo que, el ensayo de fertilidad realizado en el trabajo concuerda con las conclusiones obtenidas en publicaciones citadas.

Por último, mencionar que a día de hoy, más allá de esta teoría, no se ha conseguido explicar la razón por la que ocurre esta mínima diferencia en la fertilidad de los gusanos alimentados con *E. coli* frente a los alimentados con *B. subtilis*.

7.3. Discusión de los resultados obtenidos en el análisis descriptivo de las mitocondrias

Con estos resultados (Figura 14) estas son las principales conclusiones que se pueden sacar del análisis de las mitocondrias.

Las mitocondrias son un orgánulo formado por dos membranas. La función principal de las mitocondrias es generar ATP, la fuente de energía principal de las células eucariotas, mediante la fosforilación oxidativa. Este proceso es parte de la cadena respiratoria de las mitocondrias (MRC). (Tsang, Lemire, 2003)

Mediante el mencionado proceso, las mitocondrias producen especies reactivas del oxígeno (ROS). Como ya se ha mencionado anteriormente, la acumulación de estas especies implica un daño oxidativo, el cual se relaciona con la disminución en la vida útil de los organismos. De hecho, el aumento de la producción de ROS hace que ocurra una fragmentación de las mitocondrias, implicando un envejecimiento prematuro. (Chaudhari, Kipreos, 2017)

Las mitocondrias muestran una morfología dinámica que les permite adaptarse a la demanda energética y los recursos disponibles. (Weir et al., 2017)

Si las mitocondrias muestran una morfología alargada y fusionada significa que están produciendo grandes cantidades de ATP y por lo tanto los niveles de ROS son altos. En cambio, si muestran una morfología fragmentada significa que la producción de ATP es menor y las mitocondrias están desacopladas.

Por lo tanto, en un análisis descriptivo de las mitocondrias a lo largo del tiempo, se esperaría ver una evolución en la morfología. Presentado en los primeros momentos una morfología fusionada y pudiendo observar una fragmentación que vaya aumentando con el paso del tiempo. (Regmi et al., 2014)

Esta diferencia en la fragmentación mitocondrial concuerda con los resultados obtenidos en el ensayo de longevidad. En relación con las vías mencionadas anteriormente relacionadas con la longevidad, varios estudios han confirmado que estas vías muestran mayores niveles de mitocondrias con morfología tubular. Por lo que la morfología mitocondrial tubular es necesaria para el aumento de la longevidad de los gusanos.

Teniendo en cuenta esta información, se puede concluir que los resultados obtenidos concuerdan con lo esperado. Los gusanos alimentados con *B. subtilis* muestran mayor longevidad y sus mitocondrias están en mejores condiciones en comparación con los gusanos alimentados con *E. coli*, cuya longevidad es menor.

7.4. Discusión de los resultados obtenidos en el cruce de la cepa SD1347 con la cepa JK194 para generar una cepa *daf-2(e1370)* que tienen marcadas las mitocondrias con GFP

Con los resultados obtenidos, estas son las principales conclusiones que se pueden sacar del cruce realizado.

Para empezar, se puede confirmar que el experimento ha tenido éxito, y se ha conseguido realizar el cruce entre la cepa de *C. elegans* JK194 y SD1347. Además, se ha podido demostrar que se puede utilizar la termo-sensibilidad de la cepa JK194 como método de selección de gusanos.

Sin embargo, y como se ha podido ver durante la descripción de los resultados, durante el experimento se han presentado varios problemas que han afectado principalmente a la pequeña cantidad de gusanos candidatos que se han obtenido. Cabe destacar la importancia de aislar un elevado número de gusanos antes de realizar la selección mediante la temperatura, por el riesgo de que parte de ellos mueran.

Estas cuestiones hacen resaltar la importancia que pueden llegar a tener a la hora de realizar un mejor diseño del cruce. En efecto, este experimento ha demostrado que este cruce se puede realizar, pero, el experimento ha de diseñarse para poder obtener mejores resultados. Se debería de tener en cuenta que los problemas para encontrar machos y para que los gusanos reviertan de la fase dauer hacen que el experimento se alargue. Además, es necesario seleccionar mayor cantidad de gusanos antes de empezar con el proceso de selección, para poder llegar a conseguir más gusanos candidatos.

Finalmente, a partir de los 8 gusanos candidatos obtenidos, el siguiente paso sería observar si su descendencia (F3) produce gusanos fluorescentes. En ese caso, se tratarían de homocigotos para las dos mutaciones y serían los gusanos de interés.

8. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas del trabajo realizado son las siguientes:

- En nuestras condiciones de trabajo, la vida media de *C. elegans* alimentado con dieta de *E. coli* (dieta habitual) es de 11,5 días y la vida media de los individuos alimentados con *B. subtilis* es de 17,5 días. Aunque son resultados preliminares que debería confirmarse haciendo triplicados esto indicaría que la dieta influye en la longevidad de *C. elegans*. La dieta con *B. subtilis* aumenta la longevidad de *C. elegans* frente al alimentado con *E. coli*.
- En el ensayo de fertilidad del organismo modelo *C. elegans* alimentado con dieta de *E. coli* (dieta habitual) y *B. subtilis* realizado en las condiciones del laboratorio de trabajo se ha demostrado que la dieta no influye de manera estadísticamente significativa en la fertilidad de *C. elegans*. A pesar de ello, la dieta con *E. coli* muestra mayor fertilidad frente al *C. elegans* alimentado con *B. subtilis*.
- Las mitocondrias del organismo modelo *C. elegans* degeneran a lo largo del tiempo. Los individuos alimentados con *E. coli* muestran mayor fragmentación de las mitocondrias frente a los alimentados con *B. subtilis*.
- Se ha iniciado la creación de un modelo para estudiar el estado de las mitocondrias cuando el receptor de la insulina DAF-2 está mutado.
- *C. elegans* es un organismo modelo óptimo para la investigación del envejecimiento y la influencia de la dieta. Investigaciones en los próximos años ayudarán a conocer más aspectos sobre este campo con el objetivo de poder aplicarlos al ser humano.

9. BIBLIOGRAFÍA

Altun, Z. F.; Hall, D. H.; Introduction to *C. elegans* anatomy; WormAtlas; 2009; doi:10.3908/wormatlas.1.1

Brooks, K. K.; Liang, B.; Watts, J. L.; The influence of Bacterial Diet on Fat Storage in *C. elegans*; PLoS ONE; Vol. 4(10); e7545; 2009; doi: 10.1371/journal.pone.0007545

Byerly, L.; Cassada, R. C.; Russell, R. L.; The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*; Developmental Biology; Vol. 51(1); 23-33; 1976; doi: 10.1016/0012-1606(76)90119-6.

Cabreiro, F.; Gems, D.; Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*; EMBO Molecular Medicine; Vol. 5; 1300-1310; 2013; doi: 10.1002/emmm.201100972

Cassada, R.; Russell, R.; The Dauer-larva: A post-embryonic developmental variant of the nematode *C. elegans*; Developmental Biology; Vol. 46; 326-342; 1975; doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8

Chasnov, J. R.; Chow, K. L.; Why Are There Males in the Hermaphroditic Species *Caenorhabditis elegans*?; Genetics; Vol. 160(3); 983-994; 2002

Chaudhari, S. N.; Kipreos, E. T.; Increased mitochondrial fusion allows the survival of older animals in diverse *C. elegans* longevity pathways; Nature Communications; Vol.8(182); 2017; doi: 10.1038/s41467-017-00274-4

Corsi, A. K.; A Biochemist's Guide to *C. elegans*; Analytical Biochemistry; Vol. 359(1); 1-17; 2006; doi: 10.1016/j.ab.2006.07.033

Corsi, A. K.; Wightman, B.; Chalfie, M.; A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*; WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology; 18; 2015; doi: 10.1895/wormbook.1.177.1

Denzel, M. S.; Lapierre, L. R.; Mack, H. I. D.; Emerging topics in *C. elegans* aging research; Transcriptional regulation, stress response and epigenetics; Mechanism of Ageing and Development; Vol. 177; 4-21; 2019; doi.org/10.1016/j.mad.2018.08.001

Dimov, I.; Maduro, M. F.; The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology; *Cell and Tissue Research*; Vol. 377(3); 383-396; 2019; doi: 10.1007/s00441-019-03036-4

Donato, V.; Ayala, F. R.; Cogliati, S.; Bauman, C.; Costa, J. G.; Leíni, C.; Grau, R.; *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like pathway; *Nature Communications*; Vol. 8(14332); 2017; doi: 10.1038/ncomms14332

Fay, D. S.; Classical genetic methods; *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*; Vol. 2013; 1-58; 2013; doi: 10.1895/wormbook.1.165.1

Félix, M.; Braendle, C.; The natural history of *Caenorhabditis elegans*; *Current Biology*; Vol. 20(22); R965-R969; 2010; doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050

Finch, C.E.; Longevity, Senescence, and the Genome; The University of Chicago Press; 1990; ISBN: 0-226-24-888-7

Gómez-Orte, E.; Cornes, E.; Zheleva, A.; Sáenz-Narciso, B.; de Toro, M.; Iíguez, M.; López, R.; San-Juan, J. F.; Ezcurra, B.; Sacristán, B.; Sánchez-Blanco, A.; Cerón, J.; Cabello, J.; Effect of the diet type and temperature on the *C. elegans* transcriptome; *Oncotarget*; Vol. 9(11); 9556-9571; 2017; doi: 10.18632/oncotarget.23563.

Greer, E. L.; Brunet, A.; Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*; *Aging Cell*; Vol. 8(2); 113-127; 2009; doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00459.x

Gusarov, I.; Gautier, L.; Smolentseva, O.; Shamovsky, I.; Eremina, S.; Mironov, A.; Nudler, E.; Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*; *Cell*; Vol. 152(4); 818-830; 2013; doi: 10.1016/j.cell.2012.12.043.

Hald, D. H.; Herndon, L. A.; Altun, Z.; Introduction to *C. elegans* Embryo Anatomy; *WormAtlas*; 2017; doi: 10.3908/wormatlas.4.1

Hoang, K. L.; Gerardo, N. M.; Morran, L. T.; The effects of *Bacillus subtilis* on *Caenorhabditis elegans* fitness after heat stress; *Ecology and Evolution*; Vol. 2019; 1-9; 2019; doi: 10.1002/ece3.4983

Johson, T. E.; Advantages and disadvantages of *Caenorhabditis elegans* for aging research; *Experimental Gerontology*; Vol. 38; 1329-1332; 2003; doi: 10.1016/j.exger.2003.10.020

Kaletsky, R.; Murphy, C. T.; The role of insulin/IGF-like signaling in *C. elegans* longevity and aging; *Disease Models & Mechanisms*; Vol. 3; 415-419; 2010; doi: 10.1242/dmm.001040

Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R.; A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type; *Nature*; Vol. 366; 461-464; 1993; doi.org/10.1038/366461a0

Kimble, J. E.; Hirsh, D.; The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*; *Developmental Biology*; Vol. 70(2); 396-417; 1979; doi: 10.1016/0012-1606(79)90035-6.

Klass, M. R.; A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results; *Mechanisms of Ageing and Development*; Vol. 22(3-4); 279-286; 1983; doi: 10.1016/0047-6374(83)90082-9.

Laaberki, M.; Dworkin, J.; Role of Spore Coat Proteins in the Resistance of *Bacillus subtilis* Spores to *Caenorhabditis elegans* Predation; *Journal of Bacteriology*; Vol. 190(18); 2020; doi.org/10.1128/JB.00623-08

Laviola, L.; Natalicchio, A.; Giorgino, F.; The IGF-I signaling pathway; *Current Pharmaceutical Design*; Vol. 13(7); 663-669; 2007; doi: 10.2174/138161207780249146.

Lee, S. Y.; Kang, K.; Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*; *Journal of Visualized Experiments*; Vol. 128(59437); 2017; doi: 10.3791/56437

Lemieux, G. A.; Ashrafi, K.; Investigating Connections between Metabolism, Longevity, and Behaviour in *Caenorhabditis elegans*; *Trends in Endocrinology & Metabolism*; Vol. 27(8); 2016; doi.org/10.1016/j.tem.2016.05.004

Lin, K.; Hsin, H.; Libina, N.; Kenyon, C.; Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signalling; *Nature Genetics*; Vol. 28(2); 139-145; 2001; doi: 10.1038/88850.

López-Otín, C.; Blasco, ; M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G.; The hallmarks of aging; *Cell*; Vol. 153(6); 1194-1217; 2013; doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039.

McGhee, J. D.; The *C. elegans* intestine; *WormBook: the Online Review of C. Elegans Biology*; 1-36; 2007; doi: 10.1895/wormbook.1.1331

Mack; H. I. D.; Heimbucher, T.; Murphy, C. T.; The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research; *Drug Discovery Today: Disease Models*; Vol. 27; 2018; doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.11.001

Maduro, M. F.; Cell Fate Specification in the *C. elegans* Embryo; *Developmental Dynamics*; Vol. 239; 1315-1329; 2010; doi: 10.1002/dvdy.22233

Markaki, M.; Tavernarakis, N.; *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases; *Current Opinion in Biotechnology*; Vol. 63, 118-125; 2020; doi: 10.1016/j.copbio.2019.12.011

Martin, H.; Shales, M.; Fernandez-Piñar, P.; Wei, P.; Molina, M.; Fiedler, D.; Shokat, K. M.; Beltrao, P.; Lim, W.; Krogan, N. J.; Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways; *Molecular Systems Biology*; Vol. 11(4); 800; 2015; doi.org/10.15252/msb.20145606

Murphy, C. T.; Hu, P. J.; Insulin/insulin-like growth factor signalling in *C. elegans*; *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*; Vol. 2013; 1-43; 2013; doi: 10.1895/wormbook.1.164.1.

Nigon, V. M.; Félix, M.; History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms; *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology*; Vol. 2017; 1-84; 2017; doi: 10.1895/wormbook.1.181.1.

Ogg, S.; Paradis, S.; Gottlieb, S.; Patterson, G. I.; Lee, L. Tlissenbaum; H. A.; Ruvkun, G.; The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*; *Nature*; Vol. 389; 994-999; 1997; doi.org/10.1038/40194

Palikaras, K.; Tavernarakis, N.; *Caenorhabditis elegans* (Nematode); Brenner's Encyclopedia of Genetics; 2^a edición; Vol. 1; 404-408; 2013; doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.00186-8

Pilon, M.; Mörck, C.; Development of *Caenorhabditis elegans* pharynx, with emphasis on its nervous system; *Acta Pharmacologica Sinica*; Vol. 26; 396-404; 2005; doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00070.x

Piñero, J.; Carrillo, O.; Vasconcelos, A. T.; González, A.; Conservation of key members in the course of the evolution of the insulin signaling pathway; *Biosystems*; Vol. 95(1); 7-16; 2009; doi: 10.1016/j.biosystems.2008.06.003.

Portal-Celhay, C.; Bradley, E. R.; Blaser, M. J.; Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in *Caenorhabditis elegans*; *BMC Microbiology*; Vol. 12(49); 2012; doi.org/10.1186/1471-2180-12-49

Regmi, S. G.; Rolland, S. G.; Conratt, B.; Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan; *Aging*; Vol. 6(2); 118-130; 2014; doi: 10.18632/aging.100639

Riddle, D. L.; Post-embryonic development in *Caenorhabditis elegans*; *International Journal for Parasitology*; Vol. 17(1); 223-231; 1987; doi.org/10.1016/00207519(87)90045-2

Riddle, D. L.; Blumenthal, T.; Meyer, B. J.; Priess, J. R.; *C. elegans* II, 2nd edition; Cold Spring Harbor Monograph Series, Vol. 33; 1997; ISBN-10: 0-87969-532-3

Sánchez-Blanco, A.; Rodríguez-Matellán, A.; González-Paramás, A.; GonzálezManzano, S.; Kim, S. K.; Mollinedo, F.; Dietary and microbiome factors determine longevity in *Caenorhabditis elegans*; *Aging*; Vol. 8(7); 1513-1539; 2016; doi.org/10.18632/aging.101008

Saul, N.; Möller, S.; Cirulli, F.; Berry, A.; Luyten, W.; Fuellen, G.; Health and longevity studies in *C. elegans*: the “healthy worm database” reveals strengths, weaknesses and gaps of test compound-based studies; *Biogerontology*; Vol. 22; 215-26; 2021; doi.org/10.1007/s10522-021-09913-2

Sulston, J.E.; Schierenberg, E.; White J.G.; Thomson, J.N; The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*; *Developmental Biology*; Vol. 100; 64-119; 1983; doi: 10.1016/0012-1606(83)90201-4

Sundaram, M. V.; Buechner, M.; The *Caenorhabditis elegans* Excretory System: A Model for Tubulogenesis, Cell Fate Specification, and Plasticity; *Genetics*; Vol. 203(1); 35-63; 2016; doi.org/10.154/genetics.116189357

Tissenbaum, H. A.; Using *C. elegans* for aging research; *Invertebrate Reproduction & Development*; Vol. 59(S1); 59-63; 2015; doi.org/10.1080/07924259.2014.940470

Tsang, W. Y.; Lemire, B. D.; The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*; *Biochimica et Biophysica Acta*; Vol. 1638, 91-105; 2003; doi: 10.1016/S0925-4439(03)00079-6

Tullet, J. M. A.; DAF-16 target identification in *C. elegans*: past, present and future; *Biogerontology*; Vol. 16; 221-234; 2015; doi: 10.1007/s10522-014-9527-y

Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Hudson, H. F.; Bertozzi, C. R.; Gerald, W. H.; Etzler, M. E.; editors; *Essentials of Glycobiology*; 2^a edición, Cold Spring Harbour (NY); 2009; PMID: 20301239

Walker, G.; Houthoofd, K.; Vanfleteren, J. R.; Gems, D.; Dietary restriction in *C. elegans*: From rate-of-living effects to nutrient sensing pathways; *Mechanisms of Ageing and Development*; Vol. 126; 929-937; 2005; doi: 10.1016/j.mad.2005.03.014

Weir, H. J.; Yag, P.; Huynh, F. K.; Escoubas, C. C.; Goncalves, R. L.; Burkewitz, K.; Laboy, R.; Hirschey, M. D.; Mair, W. B.; Dietary Restriction and AMPK increase Lifespan via Mitochondrial Network and Peroxisome Remodeling; *Cell Metabolism*; Vol. 26(6); 884-896; 2017; doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.024

Wood, W. B.; *The Nematode Caenorhabditis elegans* (Cold Spring Harbor Monograph Series 17); Cold Spring Harbor Laboratory; p.1; 1988; ISBN: 978-087969433-3

Yen, C. A.; Curran, S. P.; Gene-diet interactions and aging in *C. elegans*; *Experimental Gerontology*; 86; 106-112; 2016; doi: 10.1016/j.exger.2016.02.012

Yu, L.; Yan, X.; Ye, C.; Zhao, H.; Chen, X.; Hu, F.; Li, H.; Bacterial Respiration and Growth Rates Affect the Feeding Preferences, Brood Size and Lifespan of *Caenorhabditis elegans*; PloS ONE; Vol. 10(7); 2015; doi.org/10.1371/journal.pone.0134401

Zečić, A.; Dhount, I.; Braeckman, B. P.; The nutritional requirements of *Caenorhabditis elegans*; Genes & Nutrition; Vol. 14(15); 2019; doi.org/10.1189/s12263-019-0637-7

Zhang, J.; Holdorf, A. D.; Walhout, A. J. M.; *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host-microbiota interactions; Current Opinion in Biotechnology; Vol. 46; 74-80; 2017; doi.org/10.1016/j.copbio.2017.01.008

Zhou, J.; Chun, L.; Liu, J.; A Comprehensive Understanding of Dietary Effects on *C. elegans* Physiology; Current Medical Science; Vol. 39(5); 679-684; 2019; doi: 10.1007/s11596-019-2091-6.

Páginas web:

www.cgc.umn.edu

www.leica-microsystems.com

www.wormbook.org

www.wormbase.org

www.wormatlas.org

