



Universidad de Valparaíso

Facultad de Ciencias

Programa de Licenciatura en Ciencias mención Biología

Microbiota y vitamina B12 modulan la resiliencia del dauer y la fertilidad post-estrés térmico en *Caenorhabditis elegans*.

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN II, PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO/A
EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

KARINA SOLEDAD CABEZAS FERNÁNDEZ

BLGO, DRA. ANDREA CALIXTO M.

CO-TUTOR BLGO, DR. RAMÓN LATORRE

Valparaíso – Chile

2025



Universidad de Valparaíso

Facultad de Ciencias

Programa de Licenciatura en Ciencias mención Biología

Microbiota y vitamina B12 modulan la resiliencia del dauer y la fertilidad post-estrés térmico en *Caenorhabditis elegans*.

**SEMINARIO DE GRADUACIÓN II, PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO/A
EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA**

KARINA SOLEDAD CABEZAS FERNÁNDEZ

BLGO, DRA. ANDREA CALIXTO M.

CO-TUTOR BLGO, DR. RAMÓN LATORRE

Valparaíso – Chile

2025

AGRADECIMIENTOS

Ante esta tesis, agradezco profundamente a todas las personas que estuvieran detrás de mí para poder presentarla. Agradezco especialmente a la gente del "lab gusanos", que gracias a sus conocimientos pude aprender más acerca de *C. elegans* como un modelo pionero que nos sirve para evaluar a nivel de ecología y más interno, como lo es su fisiología y su interesante sistema nervioso. Además, de su paciencia y apoyo que siempre tuvieron conmigo, ¡¡muchas gracias y espero que les vaya súper bien en todo!!

Por otra parte, agradezco a mi familia y a mi pololo por darme el apoyo y su amor incondicional de siempre de siempre estar conmigo en momento de estrés, llantos, enojos y lo más importante felicidad. De estar conmigo en todo lo que me propongo como de venir a Valparaíso y por seguir motivándome a estudiar en lo que me gusta. También les agradezco de corazón.

Por último, agradecer los años de experiencia en la carrera, ya que existen buenos Drs. y Dras. que les encanta hacer y enseñar lo que les apasiona, y a los amigxs que hice durante el camino, que también son una fuente de inspiración. Espero colaborar con algunos de ustedes futuros colegas.

Fue una bonita experiencia.

ABSTRACT

Dauer larva in *Caenorhabditis elegans* is an adaptive strategy that enables survival under adverse environmental conditions, particularly during resource scarcity and extreme temperatures. During this state, nematodes reorganize their physiology and reduce metabolic activity, allowing long-term survival. Dauer viability largely depends on energy reserves, especially lipid storage, and food availability directly influences metabolism, lifespan, and cellular protection, including the maintenance and regeneration of the nervous system.

In this study, we evaluated the physiological limits of the dauer stage induced by starvation and subsequently exposed to thermal stress under both cold and warm conditions. Stress responses were analyzed after 24 hours and 7 days of exposure, revealing that dauer larvae remain viable at temperatures such as 4 °C, 27 °C, and 30 °C. However, prolonged exposure to 30 °C resulted in an approximately 50% reduction in dauer survival after one week, indicating a limit to long-term thermal stress tolerance.

Notably, dauer formation was also observed under sustained cold conditions even in the presence of food, suggesting that prolonged low temperatures act as a relevant stressor capable of triggering this alternative developmental program. In addition, given previous evidence supporting vitamin B12 as a beneficial metabolite for *C. elegans*, its effect on dauer resilience under thermal stress at 30 °C was assessed. Vitamin B12 supplementation promoted early dauer entry and supported survival after one week of thermal stress.

Finally, the neuroprotective role of vitamin B12 was evaluated using the *mec-4(d)* mutant, which exhibits progressive non-apoptotic neuronal degeneration. Dauer larvae fed with vitamin B12 showed significantly increased neuronal protection compared to those fed with *E. coli* OP50, and this protective effect persisted after prolonged thermal stress. Overall, this study demonstrates that dauer resilience under prolonged stress depends on the interaction between environmental conditions and metabolic state, highlighting the modulatory role of nutrition and bacterial-derived metabolites in survival and cellular protection.

RESUMEN

La diapausa en *Caenorhabditis elegans* representa una estrategia adaptativa que permite a los organismos sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, particularmente frente a la escasez de recursos y a temperaturas extremas. Durante este estado, el nematodo reorganiza su fisiología y reduce su actividad metabólica, lo que le permite conservar energía y mantenerse viable por períodos prolongados. La sobrevivencia en dauer depende en gran medida de sus reservas energéticas, especialmente de lípidos, por lo que la disponibilidad de alimento influye directamente en el metabolismo, la expectativa de vida y procesos de protección celular, incluyendo la mantención y regeneración del sistema nervioso.

En este estudio se evaluaron los límites fisiológicos del estado dauer inducido por inanición, seguido de la exposición a condiciones de estrés térmico tanto frías como cálidas. Para ello, se analizaron las respuestas al estrés combinado de inanición y temperatura durante períodos de 24 horas y 7 días, lo que permitió determinar la capacidad de sobrevivencia del dauer bajo distintas condiciones ambientales. Los resultados muestran que el estado dauer permanece viable a temperaturas como 4 °C, 27 °C y 30 °C. Sin embargo, a 30 °C se observó una disminución aproximada del 50% de la población tras una semana de exposición, evidenciando un límite en la resistencia a estrés térmico prolongado.

Adicionalmente, se observó que, aun en presencia de alimento, la exposición sostenida a bajas temperaturas puede inducir la formación del estado dauer, lo que sugiere que el frío prolongado constituye un estresor relevante capaz de activar este programa de desarrollo alternativo. Por otra parte, considerando estudios previos que describen a la vitamina B12 como un metabolito beneficioso para *C. elegans*, tanto a nivel metabólico como neuroprotector, se evaluó su efecto sobre la resiliencia del estado dauer bajo estrés térmico a 30 °C. La suplementación con vitamina B12 favoreció la entrada inicial al estado dauer y permitió mantener una mayor sobrevivencia tras una semana de exposición.

Finalmente, se analizó el efecto neuroprotector de la vitamina B12 en el mutante *mec-4(d)*, caracterizado por una degeneración neuronal progresiva. Los resultados mostraron un aumento significativo en la protección neuronal en nematodos en estado dauer alimentados con vitamina B12 en comparación con aquellos alimentados con *E. coli* OP50, manteniéndose este efecto tras una semana de estrés térmico. En conjunto, este estudio demuestra que la resiliencia del estado dauer frente a estrés prolongado depende de un delicado equilibrio entre condiciones ambientales y estado metabólico, destacando el rol modulador de la nutrición y de metabolitos bacterianos en la sobrevivencia y protección celular.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	13
1. Hibernación como una estrategia frente a condiciones desfavorables del ambiente	13
2. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo pionero	14
3. Diapausa en el nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	16
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	21
1. Metodología experimental utilizada en esta tesis	21
1.1 Preparación de placas con comida <i>E. coli</i> OP50 y <i>E. coli</i> OP50 + vitamina B12	21
1.2 Entrada en estado dauer por inanición en las distintas cepas <i>N2</i> (<i>Cepa Silvestre</i>) y <i>TU2773</i> (<i>mec-4d</i> (<i>e1611</i>)); <i>uls31</i> (<i>mec-17::GFP</i>) del nematodo <i>C. elegans</i>	21
1.3 Metodología empleada para observar y contabilizar nematodos totales y en estado dauer en placas con <i>E. coli</i> OP50 durante 24 horas y 7 días en cepa <i>N2</i> (<i>Cepa Silvestre</i>)	22
1.4 Contabilización de nematodos totales y en estado dauer en placas con <i>E. coli</i> OP50 + vitamina B12 a 30 °C durante 7 días en cepa <i>N2</i> (<i>Cepa Silvestre</i>)	23
1.5 Contabilización de la neurona AVM para observar y cuantificar la neuroprotección de nematodos en estado dauer en placas con comida <i>E. coli</i> OP50 y <i>E. coli</i> OP50 + vitamina B12 a 30 °C durante 7 días en cepa mutante <i>TU2773</i> (<i>mec-4d</i> (<i>e1611</i>)); <i>uls31</i> (<i>mec-17::GFP</i>)	24
1.6 Metodología empleada para observar y contabilizar nematodos totales y no dauer para el control de las temperaturas durante 7 días en placas con comida.....	24
1.7 Contabilización de nematodos totales y en estado dauer con los mutantes de la vitamina B12, <i>RB1434</i> (<i>mmcm-1</i>) y <i>RB755</i> (<i>metr-1</i>) durante 7 días a 30 °C	25
1.8 Análisis de datos y criterios estadísticos	25
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	26
1. Respuesta del estado dauer al estrés térmico para la determinación de límites de tolerancia	26
2. La suplementación con vitamina B12 aumenta la sobrevivencia del nematodo en estado dauer a 30 °C	27
3. El dauer mantiene la regeneración axonal en la cepa mutante <i>mec-4(d)</i> durante estrés térmico prolongado	28

4. <i>RB755 (metr-1)</i> sugiere una mayor sobrevivencia en estado dauer sometido a estrés térmico	29
5. Las placas con comidas al cabo de una semana forman dauer y sobreviven bajo estrés térmico.....	30
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	32
1. Límites térmicos del estado dauer en <i>Caenorhabditis elegans</i>	32
2. Vitamina B12 como modulador metabólico del mantenimiento del estado dauer a 30 °C.....	33
3. La vitamina B12 modula la regeneración axonal en el estado dauer por inanición.....	35
4. Hallazgo de 4 °C como posible inductor de diapausa en <i>Caenorhabditis elegans</i>	36
5. Efecto de mutantes de la vitamina B12 en la sobrevivencia del estado dauer bajo estrés térmico.....	37
CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN.....	39
BIBLIOGRAFÍA	40

INTRODUCCIÓN

Desde hace millones de años, los organismos han estado expuestos a condiciones ambientales desfavorables, tales como la escasez de alimento, y cambios abruptos de temperatura, como periodos de frío extremo. Frente a estos escenarios, los organismos han desarrollado diversas estrategias y mecanismos de adaptación que les permiten mantener su fitness y sobrevivir durante períodos prolongados mediante modificaciones en su fisiología, metabolismo y, en algunos casos, en su desarrollo (Carey et al., 2003).

Una de las estrategias corresponde a la entrada en estados caracterizados por una disminución de la actividad fisiológica y metabólica, conocidos como estados de latencia o hipometabolismo. Estos estados reversibles permiten reducir el gasto energético y aumentar la probabilidad de supervivencia hasta que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables (Guppy & Withers, 1999; Marshall & McQuaid, 2020). Dentro de este contexto, la hibernación ha sido un tema de gran interés en la biología moderna debido a su potencial como modelo para el estudio de mecanismos asociados al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, metabólicas y a los procesos de envejecimiento.

Solo ciertos grupos de organismos, como algunos mamíferos, han desarrollado la hibernación como una estrategia de supervivencia en condiciones ambientales extremas. A nivel fisiológico, estos organismos dependen principalmente de sus reservas lipídicas, lo que se asocia a una reorganización metabólica que favorece la preservación funcional de tejidos, como el sistema nervioso y el tejido muscular (Christian., 2014; Carey et al., 2003). Un ejemplo a esta adaptación corresponde a la ardilla terrestre ártica (*Urocitellus parryii*), una especie capaz de sobrevivir prolongados períodos de hibernación en ambientes de bajas temperaturas, lo que la ha convertido en un modelo relevante para el estudio de las adaptaciones metabólicas asociadas a la hibernación (Christian., 2014).

De forma similar, algunos invertebrados también han desarrollado mecanismos de latencia, como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual es capaz de entrar en un estado de diapausa denominado dauer. La formación de la larva dauer ocurre bajo condiciones ambientales desfavorables distintas a las de un mamífero. Estas condiciones son la escasez de alimento, las altas temperaturas, la presencia de patógenos o aumento de feromonas/densidad de la población (Ailion, 2000; Hu, 2007; Palominos, 2017; Caneo 2019). En condiciones favorables, el desarrollo progresa normalmente a través de los estadios larvales L1, L2, L3 y L4 hasta alcanzar la etapa adulta. Sin embargo, en situación de estrés ambiental, este desarrollo se desvía durante el estadio larval L2 hacia la formación de una larva especializada (Figura 1) (Golden & Riddle, 1982).

El estado de dauer se caracteriza por un metabolismo hipometabólico que permite a *C. elegans* sobrevivir durante largos períodos sin alimentarse, aumentando su resistencia al estrés ambiental y preservando su fitness. Este estado se acompaña de cambios morfológicos y fisiológicos, tales como una cutícula impermeable, un intestino no funcional y supresión de la actividad reproductiva (Cassada & Russell, 1975). Debido a esta características, *C. elegans* en estado dauer se ha considerado como un modelo

experimental relevante para el estudio de la adaptación al estrés y su relación con procesos metabólicos y neuronales.

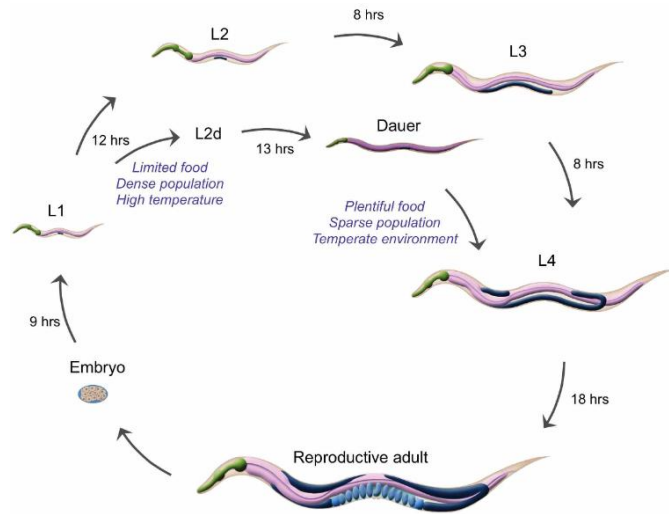


Figura 1. Esquema de cómo se forma el nematodo en estado dauer comparándolo con el desarrollo normal de *C. elegans*, que va del embrión, pasando por los estadios larvales L1, L2, L3 y L4 hasta llegar a la etapa adulta. En cambio, el nematodo en estado dauer se desvía en el estadio L2 y cuando las condiciones del ambiente cambian, vuelve a la etapa normal desde el estadio L4.

Considerando que el estado dauer implica que haya cambios metabólicos y morfológicos, surge la interrogante de cómo estas adaptaciones afectan o no en la integridad del sistema nervioso. Diversos estudios han demostrado que, durante la diapausa, pueden activarse mecanismos de neuroprotección y regeneración axonal en modelos de neurodegeneración en *C. elegans*, particularmente en el mutante *mec-4(d)* (Caneo, 2019), ampliamente utilizado como modelo de degeneración neuronal no apoptótica.

En este contexto, la presente tesis busca comprender los límites fisiológicos y neuronales que determinan la capacidad de *C. elegans* para sobrevivir a temperaturas extremas durante la diapausa. En ella, se evalúa cómo los factores ambientales y metabólicos modulan la resiliencia del organismo frente al estrés térmico, considerando el estado dauer como una estrategia adaptativa.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Caenorhabditis elegans es un organismo modelo pionero ampliamente utilizado para el estudio de la microbiota, la fisiología y el sistema nervioso. Frente a condiciones ambientales desfavorables, como la escasez de alimento y altas temperaturas, este nematodo puede ingresar al estado dauer, que es una forma de diapausa que le permite sobrevivir por un reajuste en su fisiología y metabolismo (Cassada & Russell, 1975).

Si bien la diapausa otorga mayor resistencia al estrés y efectos beneficiosos acerca de su sistema nervioso, aún se desconoce los límites fisiológicos y neuronales cuando la diapausa es inducida por inanición y es enfrentada a otros estresores ambientales, como el estrés térmico extremo.

Por otra parte, la resiliencia frente al estrés en *C. elegans* depende de su estado metabólico, que esta mediada por la microbiota. En este contexto, metabolitos bacterianos como la vitamina B12 ha sido asociada a una mejor respuesta a condiciones desfavorables. Aunque, no está claro si estos compuestos pueden modular la capacidad de entrada, mantención o ser efectivo en el estado dauer bajo estrés térmico.

Es por ello, que surge la necesidad de comprender cómo es la relación entre la diapausa inducida por inanición, el estrés térmico extremo y factores metabólicos asociados a la microbiota, del cual si influyen en la resiliencia fisiológica y neuronal de *C. elegans*.

En esta línea, nuestro grupo se ha planteado las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuáles son los límites fisiológicos del estado dauer frente a condiciones de estrés térmico extremo en *C. elegans*?

¿La vitamina B12 modula la resiliencia del estado dauer frente a estrés térmico en *C. elegans*?

¿Qué sucede con los mutantes de la vitamina B12 estando en dauer y sometido a estrés térmico?

¿El estado dauer confiere protección neuronal frente al estrés térmico en *C. elegans*?

¿La vitamina B12 influye en la protección neuronal asociada al estado dauer frente al estrés térmico?

¿Hay supervivencia de nematodos no dauer por estrés térmico?

Objetivo general

Evaluar los límites a través del efecto de la temperatura y de la vitamina B12, mediada por la microbiota, sobre la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* durante la diapausa inducida por inanición.

Objetivos específicos

1. Determinar el rango de temperatura en el cual *Caenorhabditis elegans* presenta mayor sobrevivencia tras entrar en diapausa inducido por inanición.
2. Determinar el efecto de la vitamina B12, mediado por la microbiota, sobre la sobrevivencia de *Caenorhabditis elegans* durante la diapausa inducida por inanición.
3. Determinar si el efecto de los mutantes de la vitamina B12, nos proporciona sobrevivencia de nematodos dauer a estrés térmico.
4. Analizar las diferencias en la capacidad de regeneración axonal del mutante *mec-4(d)* según la condición térmica a la que fue expuesto durante la diapausa.
5. Descubrir si los nematodos no dauer estando en comida sobreviven a las condiciones de temperaturas extremas.

Hipótesis

La diapausa inducida por inanición aumenta la resistencia de *Caenorhabditis elegans* frente al estrés térmico, y este efecto se ve potenciado por la suplementación con vitamina B12 mediada por la microbiota.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

1. Hibernación como una estrategia frente a condiciones desfavorables del ambiente

La hibernación es una estrategia adaptativa presente en algunos mamíferos, como roedores, murciélagos, marsupiales, y entre otros organismos, que les permite enfrentar períodos prolongados en los que las condiciones ambientales son desfavorables, ya sea por escasez de alimento o por la presencia de fríos extremos. Este estado corresponde a un proceso programado y reversible, en el cual el organismo reorganiza su metabolismo y su fisiología con el fin de conservar energía. Durante la hibernación como se produce una disminución general del metabolismo, acompañada por cambios fisiológicos, estos cambios fisiológicos significan tener una reducción en la frecuencia respiratoria, en el consumo de oxígeno, en la temperatura corporal y en la frecuencia cardíaca (Carey et al., 2003).

Los organismos hibernantes son capaces de censar cambios en el ambiente, como el aumento de la temperatura o la mayor disponibilidad de oxígeno, lo que les permite salir de la hibernación cuando las condiciones del ambiente vuelven a ser favorables (Carey et al., 2003). Asimismo, la salida de este estado puede estar implicada por los límites fisiológicos del organismo, el agotamiento de las reservas energéticas, como los lípidos, que impide la mantención prolongada del metabolismo reducido.

La capacidad de entrar y salir del estado de hibernación se encuentra asociada a programas genéticos conservados, heredados a través de generaciones. Sin embargo, estos genes no determinan el momento exacto en el que el organismo debe iniciar o finalizar la hibernación, sino que codifican la capacidad de responder a señales ambientales. En este contexto, la regulación epigénética estacional cumple un rol clave, permitiendo una respuesta flexible frente a las condiciones ambientales (Carey et al., 2003).

Durante la hibernación, la principal fuente de energía corresponde a los ácidos grasos almacenados en forma de triacilglicéridos en el tejido adiposo. Estos lípidos son movilizados y oxidados mediante la β -oxidación mitocondrial (Figura 2), proceso que permite la producción de ATP durante largos períodos de ayuno, manteniendo funciones vitales.

Un ejemplo destacado de esta adaptación es la ardilla terrestre ártica (*Urocitellus parryii*), especie que habita regiones del Ártico, donde las temperaturas ambientales pueden descender entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta especie es capaz de entrar en un estado de hibernación prolongada que puede extenderse entre 7 y 9 meses. Durante este periodo, reduce su tasa metabólica y disminuye su temperatura corporal llegando a valores como los $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ o incluso inferiores a este, sin generar daño irreversible tejidos sensibles (Calixto, 2015).

Una de las características más notables de esta especie es su capacidad de neuroprotección durante la hibernación. A pesar de la reducción de la actividad neuronal

y sináptica, este estado no conduce a neurodegeneración ni a muerte celular. Por el contrario, se ha descrito una retracción sináptica y dendrítica reversible, que se revierte tras el recalentamiento y la salida de la hibernación, permitiendo la recuperación funcional de los circuitos neuronales (Calixto, 2015). Esta resiliencia neuronal se asocia a mecanismos celulares como la disminución de la excitabilidad neuronal, una regulación estricta del flujo iónico y la activación de vías antioxidantes que limitan el daño por estrés oxidativo.

Además de la hibernación, existen otros estados extremos de latencia, como la criostasis o criptobiosis, en los cuales los organismos entran en una animación suspendida. En estos estados, el metabolismo se reduce a niveles indetectables, permitiendo la supervivencia a temperaturas extremadamente bajas, incluso cercanas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estudios realizados en el Permafrost Siberiano han demostrado que nematodos recuperados tras permanecer congelados durante aproximadamente 46.000 años fueron capaces de reanudar su ciclo de vida tras la reanimación, evidenciando la extraordinaria capacidad de ciertos organismos para preservar la viabilidad celular bajo condiciones extremas (Shatilovich et al., 2023). Estos hallazgos posicionan al Permafrost como un ecosistema único y capaz de conservar formas de vida a temperaturas bajo cero durante miles de años.

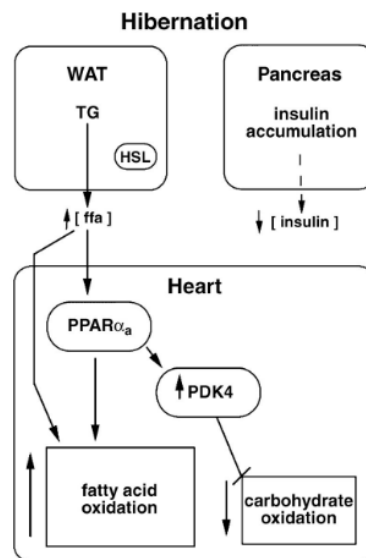


Figura 2. Diagrama de las vías de regulación molecular implicadas para obtener energía a través de los ácidos grasos durante en la hibernación de mamíferos. Figura adaptada de Carey et al., (2003).

2. *Caenorhabditis elegans* como modelo pionero

Caenorhabditis elegans es un nematodo ampliamente utilizado como modelo pionero en biología, ya que se utiliza en estudios de desarrollo, genética, fisiología y neurobiología, debido a su estructura simple y de fácil manejo (Brenner, 1974; Kaletta & Hengartner,

2006). Este organismo posee un cuerpo cilíndrico y transparente, con un tamaño aproximado de 1 mm, lo que permite la observación directa de células y tejidos mediante microscopía (Wood, 1988).

El ciclo de vida de *C. elegans* es corto, de aproximadamente tres días en condiciones óptimas a 20 °C, y presenta dos sexos, hermafrodita y macho, siendo el hermafrodita capaz de autofecundarse, lo que facilita el mantenimiento de líneas genéticas homogéneas y el análisis experimental reproducible (Brenner, 1974). En cuanto a su genética, *C. elegans* posee un genoma completamente secuenciado, con una alta proporción de genes involucrados en procesos como el metabolismo, la respuesta al estrés y la función neuronal (Kaletta & Hengartner, 2006).

En relación con su sistema nervioso, *C. elegans* presenta un sistema nervioso simple y completamente mapeado, compuesto por 302 neuronas en el hermafrodita adulto, lo que permite analizar cambios estructurales y funcionales a nivel celular (White et al., 1986). El uso de mutantes y de herramientas transgénicas, como la expresión de proteínas fluorescentes específicas, han permitido estudiar distintos procesos neuronales de manera directa.

De lo anterior, se tiene al mutante *mec-4(d)*, el cual es uno de los modelos más utilizados para estudiar neurodegeneración en *C. elegans*. Este es un mutante que porta una versión hiperactiva del canal mecanosensorial MEC-4, que forma parte de la familia DEG/ENaC. En condiciones normales, estos canales participan en la mecanotransducción en las neuronas mecanosensoriales del tacto suave, conocidas como Touch Receptor Neurons (TRN). Sin embargo, en el mutante *mec-4(d)*, el canal permanece abierto, permitiendo una entrada tóxica de iones, principalmente Na^+ y Ca^{2+} . Esto causa la muerte progresiva de seis neuronas de tacto suave (AVM, ALML/R, PLML/R y PVM), de manera estereotipada y reproducible, lo que lo convierte en un modelo ideal para estudiar degeneración neuronal no apoptótica (Driscoll & Chalfie, 1991; Calixto, 2012) (Figura 3).

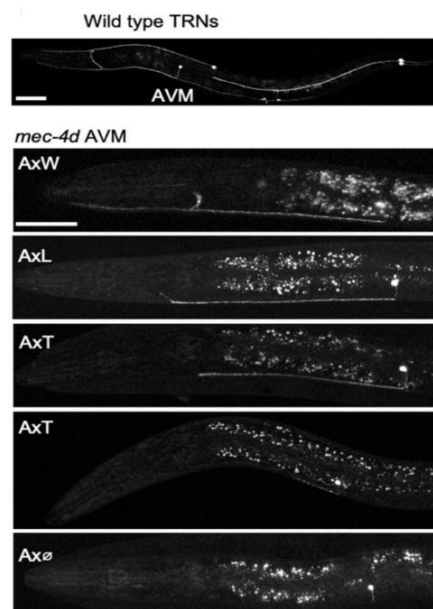


Figura 3. Categorías morfológicas de la neurona AVM. Se muestra una progresión estereotipada de la degeneración axonal en el mutante *mec-4(d)* que permite definir categorías morfológicas del axón, como AxW, AxL, AxT, AxS y AxO. Figura adaptada de Urrutia et al., (2020).

Por otro lado, *C. elegans* se alimenta exclusivamente de bacterias vivas, por lo que su dieta representa directamente su microbiota. Esta característica permite manipular de manera controlada la composición bacteriana y evaluar el efecto de metabolitos derivados de bacterias sobre la fisiología del hospedero. En este contexto, la vitamina B12, así como metabolitos asociados a su metabolismo bacteriano, ha sido descrita como un modulador clave de procesos metabólicos, del desarrollo y de la respuesta frente a condiciones de estrés ambiental (Watson et al., 2014; Urquiza et al., 2023).

La vitamina B12 cumple un rol central en el metabolismo de *C. elegans* al participar en dos rutas metabólicas principales. Por una parte, actúa como cofactor en la conversión del propionato a succinil-CoA, proceso mediado por la enzima MMCM-1, permitiendo la detoxificación de este metabolito, el cual resulta altamente tóxico cuando se acumula a nivel celular. Por otra parte, la vitamina B12 participa en la conversión de homocisteína a metionina a través de la enzima METR-1, ruta fundamental para la síntesis de S-adenosilmetionina (SAM), molécula clave en procesos de metilación y regulación epigenética (MacNeil et al., 2013; Urquiza et al., 2023).

Sin embargo, estas rutas metabólicas pueden verse alteradas en mutantes asociados al metabolismo de la vitamina B12. En este estudio se utilizaron los mutantes RB1434, ausente del gen *mmcm-1*, y RB755, ausente del gen *metr-1*, los cuales presentan deficiencias específicas en la detoxificación del propionato y en el metabolismo de la metionina, respectivamente. Estas alteraciones metabólicas generan diferencias fisiológicas relevantes, permitiendo evaluar cómo la disrupción de rutas dependientes de vitamina B12 impacta la sobrevivencia y la respuesta al estrés en *C. elegans*.

3. Diapausa en el nematodo *Caenorhabditis elegans*

La diapausa en *C. elegans* corresponde a una estrategia adaptativa que permite al nematodo sobrevivir frente a condiciones ambientales desfavorables. En este organismo, la diapausa se conoce como estado dauer y se caracteriza por una reducción del metabolismo y por cambios fisiológicos que favorecen la conservación, producción de energía y la resistencia al estrés (Cassada & Russell, 1975; Riddle et al., 1981).

La decisión de entrar en diapausa ocurre en el desarrollo temprano del nematodo (etapa larvaria), entre final del estadio L1 cuando el nematodo reconoce estas señales del ambiente, puede continuar a través de un estadio intermedio denominado L2 pre-dauer (L2p) o bien desarrollarse directamente en el estadio L2. En condiciones ambientales favorables, las larvas continúan su desarrollo normal hacia la etapa adulta (Figura 4). Una vez que las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, los animales salen del estado dauer y retoman su desarrollo desde el estadio L4, continuando posteriormente hacia la adultez.

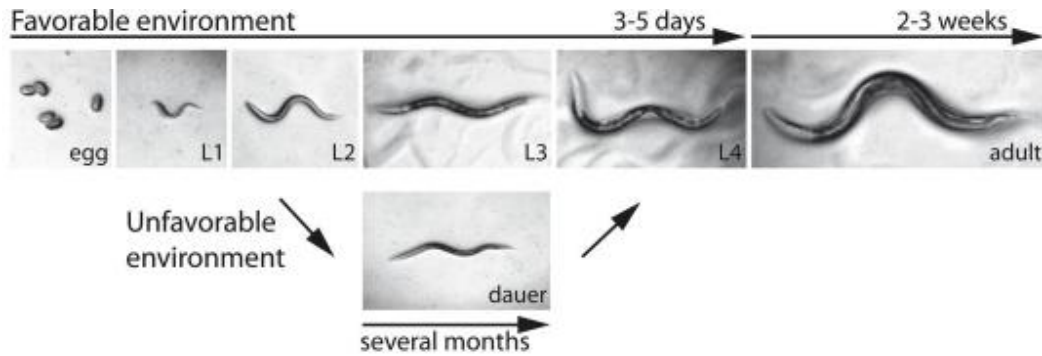


Figura 4. Desviación del dauer en condiciones desfavorables del ambiente vs. desarrollo normal del nematodo *C. elegans* en condiciones favorables del ambiente, que va de los embriones pasando por la etapas larvarias (L1, L2, L3 y L4) hasta la etapa adulta. En cambio, en la etapa L2 se entra en dauer y cuando las condiciones del ambiente vuelven a ser favorables salen del dauer y comienzan su vida reproductiva en la etapa L4.

El estado dauer puede mantenerse por períodos prolongados, de aproximadamente 3 a 4 meses. (Cassada & Russell, 1975; Caneo et al., 2019). A nivel morfológico, las larvas dauer presentan un cuerpo más delgado, alargado y uniforme, junto con una cutícula más gruesa e impermeable, que contribuye a una mayor protección frente al ambiente. Además, se observa una reducción de la actividad intestinal y una reorganización del metabolismo energético, permitiendo al organismo resistir la inanición, el estrés térmico y otros factores ambientales desfavorables. Además, durante la diapausa se produce una reorganización funcional del sistema nervioso que permite preservar su integridad estructural a largo plazo, posicionando al estado dauer como un modelo relevante para el estudio de adaptación al estrés y neuroprotección (Calixto, 2015).

Pero ¿bajo qué factores se produce la diapausa en *C. elegans*? Ocurre cuando hay estrés en el ambiente, como la escasez de alimento, altas temperaturas, alta densidad poblacional o presencia de patógenos, el desarrollo se desvía hacia la larva dauer especializada (Cassada & Russell, 1975; Riddle et al., 1981; Antebi et al., 2008).

La escasez de alimento es el principal factor que induce la entrada en dauer en *C. elegans*. En condiciones naturales y/o del laboratorio, el nematodo tiene una dieta principalmente de bacterias, de las cuales obtiene proteínas y lípidos, y en menor cantidad carbohidratos (Erkut et al., 2016). Estos nutrientes son utilizados para el crecimiento somático, la reproducción y el metabolismo para obtener energía a través de rutas como la glucólisis y el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Cuando disminuye la cantidad de bacterias en el ambiente, las larvas perciben este déficit y activan programas de conservación energética que inhiben el crecimiento y la reproducción, favoreciendo la entrada en diapausa para la supervivencia.

Este cambio no implica solamente una reducción en la ingesta de nutrientes, sino una reprogramación metabólica. Al entrar en dauer, *C. elegans* deja de depender del alimento del ambiente y utiliza el de sus reservas, los cuales son lípidos almacenados en forma de triacilglicéridos (Erkut et al., 2016; Penkov et al., 2020).

Otro factor por el que *C. elegans* entra en diapausa, son las altas temperaturas, el desarrollo reproductivo normal de *C. elegans* ocurre entre temperaturas óptimas de 15 °C a 25 °C. Sin embargo, cuando se eleva la temperatura a números cercanos a 27 °C, la entrada en diapausa aumenta significativamente (Ailion et al., 2000; Antebi et al., 2008), ya que estas condiciones se encuentran fuera del rango del fitness térmico del nematodo. Por lo que, esto le confiere ser un buen sensor por altas temperaturas. En temperaturas más altas nos acercamos a puntos críticos en los que *C. elegans* es incapaz de sobrevivir incluso en diapausa (Gade et al., 2020).

La densidad poblacional es percibida a través de señales químicas, debido a una concentración de feromonas liberadas por individuos en la población. Estas feromonas, consisten en ascarósidos son liberadas por los mismos nematodos. Actúan como indicadores de alta densidad y competencia por recursos, informando a las larvas sobre una posible escasez de recursos (Golden & Riddle, 1984; Antebi et al., 2008).

Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de patógenos influye en la fisiología y el desarrollo de *C. elegans*. La exposición prolongada a bacterias patogénicas puede inducir la entrada en diapausa, incluso de manera transgeneracional, ya que esto puede servir como una estrategia de evasión (Palominos et al., 2017).

Es por ello, que la diapausa no solo representa una respuesta al estrés, ya sea por comida o temperatura, sino que también es una adaptación frente a condiciones ambientales limitantes.

Desde el punto de vista metabólico, el estado dauer suprime la vía del ácido tricarbóxico (TCA) y activa la vía del glioxilato (Figura 5). Esta ruta metabólica alterna permite convertir ácidos grasos en carbohidratos sin la pérdida de carbono que está asociada al TCA, lo que resulta ventajoso durante períodos de inanición prolongada (Wadsworth, 1989). De esta manera, el nematodo puede persistir utilizando sus reservas lipídicas sin depender del alimento del ambiente.

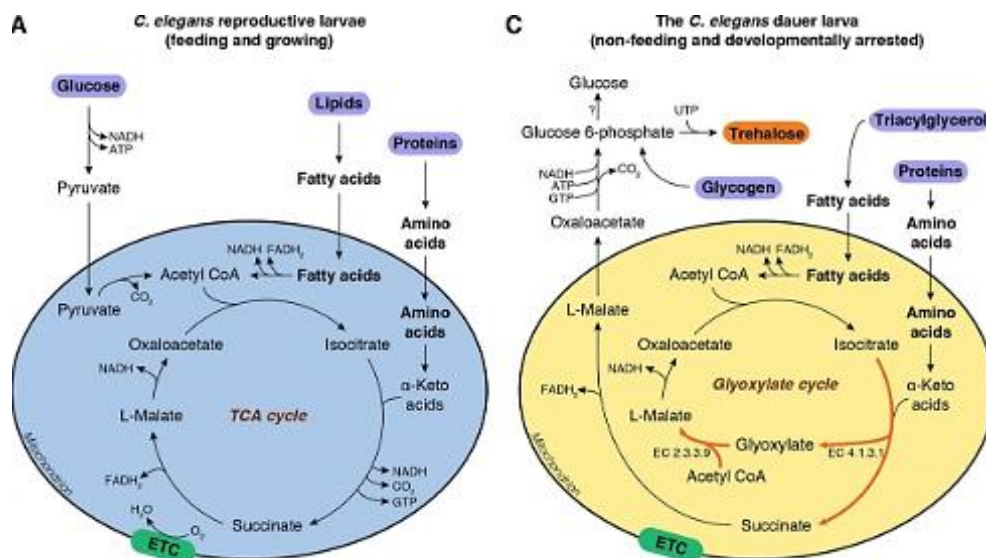


Figura 5. Esquema de la vía del glioxilato, una vía alternativa que permite degradar los ácidos grasos para obtener energía de estos durante la diapausa. En el esquema de la izquierda se observa el ciclo de un nematodo no dauer, y en la derecha de un nematodo dauer, del cual este no consume alimento del exterior, solo sobrevive gracias al almacenamiento de sus reservas lipídicas.

La entrada y mantención al estado dauer está regulada por vías de señalización complejas y conservadas. Entre ellas destacan la vía de la insulina/IGF-1, la vía tipo TGF- β y la vía de cGMP. Estas rutas permiten a *C. elegans* ser un modelo útil para estudiar mecanismos moleculares de la diapausa (Birnby, 2000; Kimura, 1997). Además, se activan otras rutas como la AMPK, que ayuda a conservar la energía. También se ha observado que el metabolismo de nematodos en estado dauer prioriza funciones vitales, mientras que procesos como la síntesis de proteínas, el transporte activos de iones y la contracción muscular se reducen notablemente (Calixto, 2015).

Dentro de este sistema regulador, los genes *daf* (dauer formation) cumplen un rol importante. Por ejemplo, el gen *daf-2*, homólogo del receptor de insulina/IGF-1, actúa como un sensor de los nutrientes en el ambiente. En condiciones de abundancia de nutrientes, la activación de DAF-2 promueve el desarrollo reproductivo normal (Kimura et al., 1997; Antebi et al., 2008). En cambio, cuando la señalización de DAF-2 disminuye debido a la escasez de alimento, se activa el factor de transcripción DAF-16/FOXO, el cual induce la expresión de genes asociados a la resistencia al estrés (Lin et al., 1997; Antebi et al., 2008).

Por consiguiente, la vía TGF- β , mediada por el ligando DAF-7, integra señales ambientales relacionadas con la densidad poblacional y el alimento (Ren et al., 1996; Birnby et al., 2000). La disminución de la señalización de DAF-7 favorece la entrada en dauer, llevando a la decisión hacia un estado de supervivencia. Estas vías convergen en la regulación del receptor nuclear DAF-12, el cual actúa como un integrador central de señales ambientales y metabólicas, coordinados con cambios morfológicos y fisiológicos que son característicos del estado dauer (Antebi et al., 2000; Antebi et al., 2008).

Ahora bien, sabemos que *C. elegans* en estado dauer reduce su actividad metabólica y cambia su morfología para sobrevivir durante más tiempo. Pero ¿qué ocurre a nivel del sistema nervioso? Al entrar en diapausa no se pierden funciones, y diversos estudios han demostrado esto en especial Caneo et al., (2019).

Durante la diapausa, el sistema nervioso de *C. elegans* no entra en un proceso de deterioro, sino que adopta un estado funcional alternativo que permite preservar su integridad a largo plazo. A pesar de la reducción de la actividad fisiológica y metabólica, las neuronas mantienen su identidad celular y no se observa una activación generalizada de programas de muerte celular. Este fenómeno ha posicionado al estado dauer para el estudio de neuroprotección, ya que demuestra que la disminución de la actividad neuronal no necesariamente conlleva daño estructural. Por el contrario, la reorganización funcional del sistema nervioso durante la diapausa parece favorecer la estabilidad neuronal frente a condiciones de estrés prolongado, como la inanición o el estrés térmico (Calixto, 2015).

La neuroprotección observada durante el estado dauer se encuentra ligada a la reprogramación metabólica. Al reducirse el gasto energético y suprimirse rutas metabólicas asociadas al crecimiento y la reproducción, el sistema nervioso opera en un entorno de menor demanda energética y menor producción de especies reactivas de oxígeno. Este contexto metabólico favorece la preservación celular y limita el daño asociado al estrés metabólico e iónico. Por lo que, vías de señalización asociadas a genes *daf*, coordinan la respuesta al estrés ambiental con cambios metabólicos que impactan en la estabilidad del sistema nervioso. En particular, la activación de programas regulados por DAF-16/FOXO durante la diapausa contribuye a aumentar la resistencia al estrés y a mantener la homeostasis celular, creando un entorno permisivo para la supervivencia neuronal a largo plazo (Lin et al., 1997; Gade et al., 2020; Calixto, 2015).

Además de preservar la integridad neuronal, el estado dauer puede favorecer procesos de reparación del sistema nervioso. Estudios como de Caneo et al. (2019) realizados en nematodos con mutaciones neurodegenerativas, como *mec-4(d)*, han demostrado que la entrada en diapausa se asocia a una regeneración axonal significativa (Figura 6). Tras varios días en estado dauer, se ha observado un aumento en la proporción de axones que recuperan morfologías similares al tipo silvestre (AxW), incluso en animales que en un principio presentaban axones truncados (AxT) o degenerados (AxO) (Caneo et al., 2019). Este proceso regenerativo depende del estado metabólico y de la activación de vías de señalización conservadas, entre ellas la vía de insulina/IGF-1, que a través de la inhibición del receptor DAF-2 permite la activación de DAF-16.

Estos hallazgos posicionan al estado dauer no solo como una estrategia de supervivencia, sino también como un estado fisiológico que promueve la resiliencia y reparación del sistema nervioso bajo condiciones de estrés extremo.

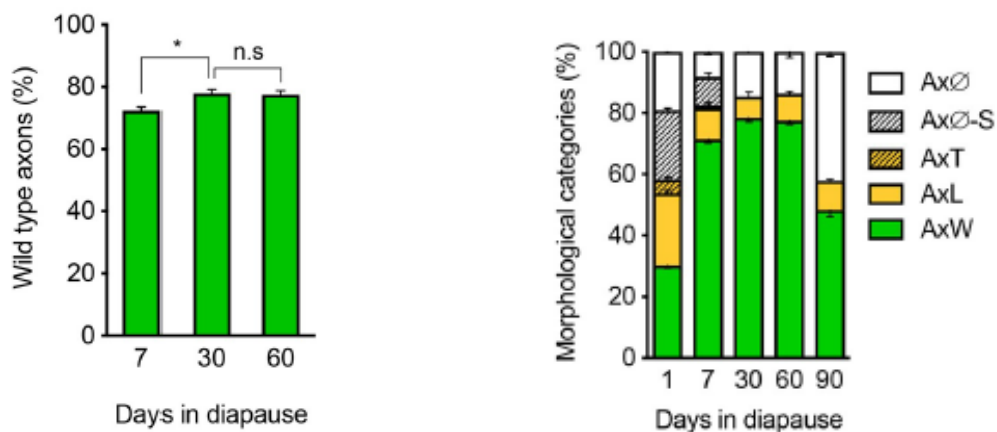


Figura 6. Demostración de la regeneración axonal del estudio de Caneo et al., (2019). En estos resultados observaron que la diapausa forma una mayor regeneración luego 7 días.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

1. Metodología experimental utilizada en esta tesis

Para el desarrollo de estas metodologías se utilizaron distintas cepas del nematodo *C. elegans*, seleccionadas según el objetivo específico de cada experimento. La cepa *N2* (*Cepa Silvestre*) se empleó como referencia, con el fin de evaluar el efecto del tipo de alimentación, *E. coli* *OP50* y *E. coli* *OP50* suplementada con vitamina B12, sobre la inducción al estado dauer por inanición, tras la exposición de estrés térmico.

Por otra parte, la cepa mutante *TU2773* (*mec-4d* (*e1611*)); *uls31* (*mec-17::GFP*) se utilizó como modelo para el estudio de la neuroprotección, debido a que este mutante presenta alteraciones neuronales que permite evaluar posibles efectos protectores de la vitamina B12.

Adicionalmente, se emplearon las cepas mutantes de la vitamina B12, *RB1434* (*mmcm-1*) y *RB755* (*metr-1*) descritos en la base de datos WormBase. Estas cepas se utilizaron debido a que presentan diferencias en las vías metabólicas dependiente de vitamina B12, lo que permitió evaluar cómo distintas rutas metabólicas influyen en la respuesta del nematodo frente al estrés térmico y en la entrada al estado dauer.

1.1 Preparación de placas con comida *E. coli* *OP50* y *E. coli* *OP50* + vitamina B12

Para la preparación de las placas con comida para los nematodos *C. elegans*, se utilizó la bacteria *E. coli* *OP50* como dieta estándar. La bacteria fue cultivada en medio Luria-Bertani (LB) líquido a 37 °C durante la noche.

Posteriormente, para las placas con comida de *E. coli* *OP50* suplementada con vitamina B12, se utilizó un cultivo de *E. coli* *OP50*, a la cual se le agregó vitamina B12 en solución. La vitamina B12 fue obtenida como stock de laboratorio, almacenado a -20 °C hasta su uso. A partir de esto, se realizó una proporción 1:1 en donde, por cada 1 mL de *E. coli* *OP50* utilizado, se mezcló con 1 µL de vitamina B12.

Con ambas suspensiones preparadas, en placas con NGM estériles (descrito por Brenner, 1973) se colocaron 150 µL de cada tipo de comida en el centro de la placa. Posteriormente, estas se dejaron secar aproximadamente un día, quedando listas para su utilización.

1.2 Entrada en estado dauer por inanición en las distintas cepas *N2* (*Cepa Silvestre*), *TU2773* (*mec-4d* (*e1611*)); *uls31* (*mec-17::GFP*), *RB1434* (*mmcm-1*) y *RB755* (*metr-1*) del nematodo *C. elegans*

Para inducir la entrada en estado dauer por inanición en *C. elegans*, primero se realizó un bleaching. El bleaching corresponde a una solución líquida compuesta por 500 µL de

Cloro tradicional, Clorinda, 750 μL de NaOH líquido y 3 mL de H_2O destilada, cuyo objetivo es extraer los huevos del interior de un nematodos adultos.

Para ello, la placa de origen que contenía nematodos adultos fue lavada con 1.5 mL de H_2O destilada, y la solución obtenida se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, este se llevó a centrifugar (Eppendorf Centrifuge 5424 R, ARQUIMED) durante 1 minuto a 2500 rpm y a 20 °C.

Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 500 μL de solución de bleaching. Esta mezcla se agitó durante 5 minutos, hasta observar que los nematodos ya no se encontraban íntegros. Luego, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, teniendo cuidado de no eliminar los huevos, y se añadieron 500 μL de H_2O destilada.

Posteriormente, se dejó una cantidad aproximada de 50 huevos en placas con comida *E. coli* OP50 y *E. coli* OP50 suplementada con vitamina B12. Estas placas se mantuvieron durante una a dos semanas, hasta que los nemátodos consumieran completamente el alimento. Una vez agotada la comida, los nemátodos entraron en estado dauer por inanición, siendo este el punto a partir del cual se comenzaron los demás experimentos.

1.3 Metodología empleada para observar y contabilizar nematodos totales y en estado dauer en placas con *E. coli* OP50 durante 24 horas y 7 días en cepa N2 (Cepa Silvestre)

Inicialmente, se seleccionaron las siguientes temperaturas para observar y contabilizar nemátodos en estado dauer: -80 °C, -40 °C, -20 °C, 4 °C, 27 °C, 30 °C y 37 °C. Estas temperaturas fueron seleccionadas debido al contexto en la introducción. Considerando $n=3$ para cada una de las siete temperaturas utilizadas.

Una vez que los nematodos entraron al estado dauer por inanición, la placa de origen se partió por la mitad. Una mitad se sometió a la temperatura seleccionada en una incubadora, mientras que la otra mitad se trabajó como día inicial. Esta fue lavada con 1.5 mL de Buffer M9 (3 gr de KH_2PO_4 , 6 gr de Na_2HPO_4 , 5 gr de NaCl y 1 mL de MgSO_4 1M), y la solución obtenida se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con el fin de extraer la mayor cantidad posible de nematodos. Posteriormente, se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5424 R, ARQUIMED) durante 1 minuto a 2500 rpm y a 20 °C.

Luego, se retiraron 500 μL del sobrenadante, se homogenizó la muestra y se extrajeron tres gotas de 10 μL , las cuales se depositaron en una placa de Petri. En estas gotas se contabilizaron los nematodos totales en un microscopio estereoscópico (SMZ745, Nikon) mediante un contador manual de 4 dígitos. Finalizado este conteo, la suspensión se centrifugó nuevamente.

Después de ello, se retiró el sobrenadante y se añadieron 1 mL de solución SDS 1% (p/v), la cual este se utilizó para observar y contabilizar los nematodos en estado dauer. Los tubos Eppendorf se dejaron acostados sobre el mesón durante 20 minutos, con el fin de que el SDS estuviera en contacto con toda la muestra.

Transcurrido este tiempo, la muestra se homogenizó nuevamente y se extrajeron tres gotas de 10 μ L. Los nematodos en estado dauer se identificaron según su morfología característica, correspondiente a nemátodos delgados, de apariencia más oscura, y que podían observarse en movimiento o con forma de bastón. Estos fueron contabilizados nuevamente en un microscopio estereoscópico (SMZ745, Nikon).

La otra mitad de las placas se mantuvo a las respectivas temperaturas (-80 °C, -40 °C, -20 °C, 4 °C, 27 °C, 30 °C y 37 °C), utilizando tres placas por temperatura durante 24 horas y otras tres placas durante 7 días. Finalizado el período de exposición, las placas se retiraron de la temperatura de estrés y se dejaron en recuperación post-estrés durante un día a temperatura ambiente. Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento descrito previamente para la contabilización de nematodos totales y en estado dauer.

1.4 Contabilización de nematodos totales y en estado dauer en placas con *E. coli* OP50 + vitamina B12 a 30 °C durante 7 días en cepa N2 (Cepa Silvestre)

A partir de la metodología empleada en el punto 1.3, se seleccionó una temperatura específica debido a los resultados obtenidos previamente en la observación de los límites del nematodo en estado dauer. Por esta razón, se utilizaron placas con comida *E. coli* OP50 + vitamina B12, con el objetivo de evaluar si los nematodos entraban en mayor proporción en estado dauer bajo estrés térmico a 30 °C.

Para ello, se aplicó la misma metodología de contabilización de nematodos totales y en estado dauer. La placa se partió por la mitad, dejando una a 30 °C, respectivamente, utilizando tres placas durante una semana. La otra mitad en el día inicial fue lavada con 1.5 mL de Buffer M9, depositada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y centrifugada durante 1 minuto a 2500 rpm y a 20 °C. Luego, se retiraron 500 μ L del sobrenadante, se homogenizó la muestra y se extrajeron tres gotas de 10 μ L para contabilizar los nematodos totales bajo un microscopio estereoscópico (SMZ745, Nikon).

Tras esto, la muestra se centrifugó nuevamente durante 1 minuto a 2500 rpm y a 20 °C, se retiró el sobrenadante y se añadieron 1 mL de solución SDS 1% (p/v) durante 1 minuto. Finalmente, la muestra se homogenizó nuevamente, se extrajeron tres gotas de 10 μ L y se contabilizaron los nematodos en estado dauer.

Para el día final, se sacaron las placas y se dejaron un día post-estrés. Luego se contabilizaron de la misma manera que en el día inicial.

1.5 Contabilización de la neurona AVM para observar y cuantificar la neuroprotección de nematodos en estado dauer en placas con comida *E. coli* OP50 y *E. coli* OP50 + vitamina B12 a 30 °C durante 7 días en cepa mutante TU2773 (*mec-4d* (*e1611*)); *uls31* (*mec-17::GFP*))

Para evaluar la neuroprotección de la neurona mecanosensorial AVM en nematodos *C. elegans* en estado dauer, se utilizó la cepa mutante *TU2773 (mec-4d (e1611); uIs31 (mec-17::GFP))*, la cual expresa GFP en neuronas mecanosensoriales, permitiendo la visualización del soma y el axón mediante microscopía de fluorescencia.

Para la contabilización de nemátodos totales y en estado dauer, se empleó la misma metodología descrita en las secciones anteriores. Una vez identificados los nematodos en estado dauer, la solución de nematodos en el tubo Eppendorf de 1.5 mL fue centrifugada nuevamente durante 1 minuto a 2500 rpm y a 20 °C. El pellet obtenido, aún en presencia de SDS 1% (p/v), se depositó en una placa de NGM sin comida, con el objetivo de permitir que los nematodos en estado dauer migraran fuera del centro del pellet. Los que no migraron, con la ayuda de una espátula se cortó esa parte, y los demás nematodos en estado dauer se lavaron con agua destilada y se centrifugaron nuevamente.

Para la observación neuronal, los nematodos en estado dauer fueron montados en pads de agarosa. Estos se prepararon depositando una gota de agarosa al 2% (p/v) sobre un portaobjetos y dejándola solidificar. Sobre el pad se añadieron 10 µL de levamisol 1 M como anestésico. El pellet que quedó del centrifugado se colocó en este pad.

Se colocó un cubreobjetos sobre el portaobjetos y las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia a 40X (ECLIPSE Ni-U, Nikon) el cual es un tipo de microscopio óptico que utiliza fluorescencia, esta fluorescencia es emitida por la luz que una sustancia absorbe a una cierta longitud de onda específica, permitiendo la visualización de la neurona AVM marcada con GFP. Para cada condición experimental, se realizó el scoring de un total de 30 nematodos, evaluando la integridad axonal y la presencia del soma neuronal, según el protocolo descrito por Urrutia, et al. 2020.

En el final, la contabilización ocurrió en el mismo instante que se sacaron las placas, y se repitió el mismo procedimiento para el día inicial.

1.6 Metodología empleada para observar y contabilizar nematodos totales y no dauer para el control de las temperaturas durante 7 días en placas con comida

Para este experimento de control se seleccionaron placas de *C. elegans* que contaban con alimento, en las que no había formación de dauer. Siguiendo con protocolos aplicados anteriormente, cada placa se dividió por la mitad y se lavó para recolectar los nematodos, para luego contabilizar nematodos totales y en estado dauer, descartando el criterio de exclusión definido, del cual se descartan placas que presenten menos del 5% de dauer.

Las otras mitades de las placas fueron sometidas a las distintas temperaturas experimentales (-80 °C, -40 °C, -20 °C, 4 °C, 27 °C, 30 °C y 37 °C) y durante una semana, con el fin de determinar si la temperatura por sí sola podía inducir la entrada en dauer, sin la influencia de la inanición ni de otros factores de estrés.

1.7 Contabilización de nematodos totales y en estado dauer con los mutantes de la vitamina B12, RB1434 (*mmcm-1*) y RB755 (*metr-1*) durante 7 días a 30 °C

En esta sección se empleo el mismo protocolo de secciones anteriores, del cual la placa inicialmente estuvo con bacteria *E. coli* OP50 hasta la inanición de estos nematodos. Luego, estas placas se partieron por la mitad, y en día inicial se lavan los nematodos para luego contabilizar nematodos totales y en estado dauer con SDS 1% en tres gotas de 10 µL. Mientras que la otra mitad de las placas se sometieron a 30 °C durante 7 días, y tras esto nuevamente lavar las placas y contabilizar de nematodos totales y en estado dauer con SDS 1%.

1.8 Análisis de datos y criterios estadísticos

Para el análisis de los datos se estableció un criterio de exclusión de placas con baja cantidad de nematodos en estado dauer. El porcentaje de dauer fue calculado a partir de tres gotas (alícuotas) de 10 µL obtenidas por cada mitad de la placa al ser lavadas con buffer M9 y luego aplicar SDS 1%. Por cada placa, se calculó el porcentaje de dauer en cada alícuota y posteriormente se obtuvo un promedio.

Las placas que contenían un porcentaje promedio de nematodos dauer en el día inicial inferior a 5% fueron excluidas del para su posterior análisis. Esto, con el fin de asegurar la robustez estadística de los datos utilizados para los análisis comparativos.

A partir de las placas que cumplieron este criterio, se calculó el índice el cual corresponde a la relación entre el porcentaje de dauer del día final y el día inicial (ecuación 1).

$$\text{índice de dauer} = \frac{\%Dauer\ final}{\%Dauer\ inicial} \quad (\text{ec. 1})$$

La representación gráfica y el análisis de los datos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism. Los resultados se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Además, se realizó un test de ANOVA de una solo vía, y comparar si existe significancia en los grupos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

1. Respuesta del estado dauer al estrés térmico para la determinación de límites de tolerancia

Con el objetivo de determinar las respuestas del estado dauer frente a distintos estrés térmico, se sometieron placas con nematodos del tipo silvestre (N2) previamente inducidos a dauer mediante inanición con *E. coli* OP50 y sometidos a temperaturas extremas de: -80 °C, -40 °C, -20, °C 4 °C, 27 °C, 30 °C y 37 °C. Las exposiciones se realizaron por dos tiempos de, 24 horas y 7 días.

Para evaluar la sobrevivencia del dauer al estrés térmico, se calculó un índice (ecuación 1) que es la razón entre el porcentaje de nematodos en estado dauer al final del tratamiento y el número inicial de nematodos en estado dauer (Tabla 1). Este índice se refleja en la gráfica (Figura 7).

Tabla 1. Índice de supervivencia de nematodos en estado dauer.

Temperatura	Índice 24 horas			índice 7 días		
-80 °C	0.23	0.11	0.00	0.66	0.07	0.00
-40 °C	0.00	0.00	0.01	0.14	0.00	0.01
-20 °C	1.90	0.10	0.18	0.09	0.00	0.00
4 °C	1.00	1.80	0.50	2.18	0.48	0.23
27 °C	2.00	0.40	1.30	1.48	1.44	1.14
30 °C	0.50	1.20	2.00	0.27	0.38	0.58
37 °C	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Los resultados obtenidos muestran que las temperaturas extremas afectan la sobrevivencia del nematodo en estado dauer. En la condición de 37 °C, siendo la temperatura más alta no se observó sobrevivencia tanto a 24 horas como a los 7 días de exposición, indicando que esta temperatura excede el límite del dauer y los nematodos no se encontraron íntegros en su totalidad. En cambio, en una temperatura menor de -20 °C durante 7 días, no hubo sobrevivencia alguna, debido en parte en los equipos al que estuvieron sometidos, pero en 24 horas si se pudo observar esta sobrevivencia mantenida y no aumentada. En el caso de -40 °C, se detectó una sobrevivencia mínima, de 1.5% observada en una de los réplicas biológicas experimentales. Por otro lado, a la temperatura de -80 °C se observó una sobrevivencia mayor en comparación con -40 °C, con valores por debajo del 50%, lo que sugiere que el estado dauer presenta una tolerancia limitada pero detectable a temperaturas de congelación para el fenómeno de criptobiosis.

En la temperatura de 4 °C, se evidenció una inducción del estado dauer tras 24 horas de exposición. Sin embargo, tras 7 días no se observó un aumento en la entrada al estado dauer, sino un mantenimiento del estado inducido inicialmente. En contraste, a 27 °C se observó una inducción del estado dauer a las 24 horas, la cual aumentó evidentemente tras 7 días de exposición, indicando que esta temperatura actúa como

un factor de estrés capaz de promover y sostener la formación del estado dauer en el tiempo.

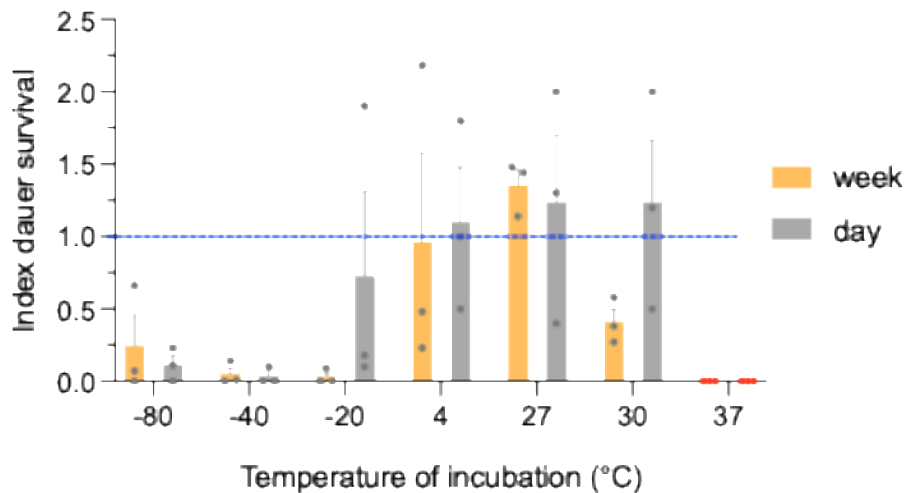


Figura 7. La sobrevivencia del dauer es variable dependiendo de la temperatura a la cual son expuestos. EL índice de sobrevivencia va desde 0 a 1, siendo 1 el 100% donde se muestra la línea azul punteada. Las barras grises representan el índice de nematodos en estado dauer durante 24 horas, y las barras de color amarillo representan el índice de nematodos en estado dauer durante 7 días. Cada barra contiene tres réplicas biológicas (n=3).

A 30 °C se observó algo similar a 4 °C, donde la exposición por 24 horas indujo la formación de dauer. Pero, tras 7 días de exposición se evidenció una disminución del 50% en el mantenimiento de este estado, lo que sugiere que esta temperatura representa una condición de estrés más que limita la persistencia del estado dauer a largo plazo.

En conjunto, estos resultados permiten definir un rango de temperaturas en el cual el estado dauer puede inducirse y mantenerse, identificando a -80 °C, 4 °C, 27 °C y 30 °C como condiciones de estrés térmico relevantes para estudios posteriores de resiliencia.

2. La suplementación con vitamina B12 aumenta la sobrevivencia del nematodo en estado dauer a 30 °C

Considerando los límites térmicos del estado dauer vistos previamente (Figura 7), se seleccionó la temperatura de 30 °C como una condición de estrés térmico intolerante, pero sin impedir con la sobrevivencia del estado dauer durante una semana, con el fin de evaluar el efecto de la suplementación con vitamina B12 sobre la resiliencia del nematodo.

Para ello, los nematodos fueron alimentados con *E. coli* OP50 suplementada con vitamina B12, inducidos posteriormente al estado dauer y sometidos a estrés térmico a 30 °C durante un de 7 días. Por último, se calculó el índice de sobrevivencia del estado dauer entre el día final versus el inicial (ecuación 1).

Los resultados (Figura 8) muestran que la suplementación con vitamina B12 aumentó la entrada del estado dauer en el día inicial, cuando se sometió al nematodo por inanición en comparación con la condición alimentada con *E. coli OP50* que fue menor, 50% menor. Por otra, cuando se sometieron estos nematodos a la temperatura de 30 °C durante una semana, en el día final las condiciones donde hay vitamina B12 el índice de sobrevivencia del estado dauer se mantuvo más a diferencia de *E. coli OP50*.

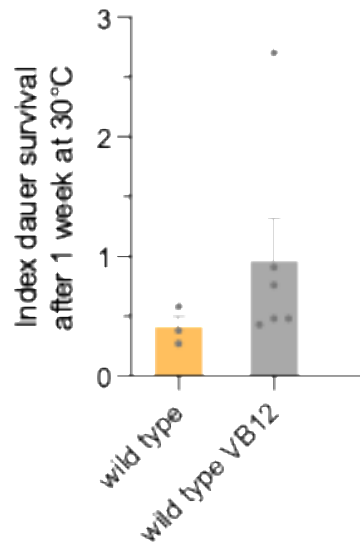


Figura 8. Dauer del tipo silvestres (N2) suplementados con B12 sobreviven más que los sin suplementar luego de 1 semana a 30°C. Índice de sobrevivencia del dauer a 30 °C en animales silvestre sin y con suplementación de B12 durante una semana a 30 °C.

Esto nos indica que la vitamina B12 mejora la capacidad del estado dauer para resistir un estrés térmico prolongado a 30 °C, en comparación con la dieta bacteriana estándar.

3. El dauer mantiene la regeneración axonal en la cepa mutante *mec-4(d)* durante estrés térmico prolongado

Finalmente, se evaluó el efecto de la vitamina B12 sobre la regeneración axonal en la cepa mutante *mec-4(d)* durante el estado dauer (Calixto, 2012; Caneo et al., 2019), en estrés térmico a 30 °C durante 7 días. Para este esto, se cuantificaron 30 nematodos por condición, clasificando la morfología axonal de la neurona AVM en distintas categorías (AxW, AxL, AxT, AxS y AxO), según Urrutia et al., (2020). Los resultados se presentaron como porcentaje de axones funcionales (Figura 9), previo a la exposición a 30 °C, y posterior a los 7 días a 30 °C. En ambos casos, luego de 7 días, los axones no se degeneran, se mantienen niveles similares, con la diferencia de que los nematodos dauer por inanición con vitamina B12, tuvieron niveles mayores de axones funcionales (60%) versus con *E. coli OP50* (40%).

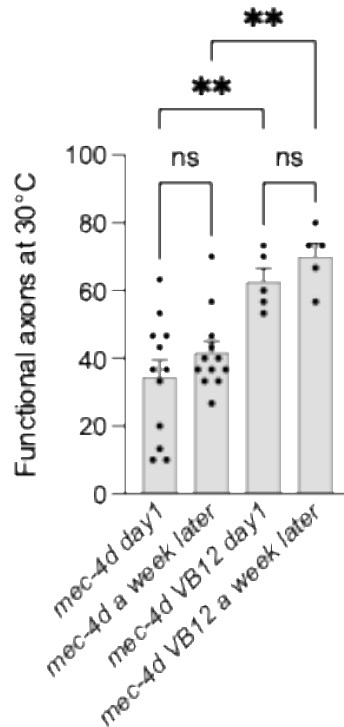


Figura 9. Axones funcionales (%) en animales dauer *mec-4(d)* previo y posterior a la exposición a 30 °C. En las barras del día 1, se representan los nematodos dauer por inanición tanto con *E. coli OP50* y vitamina B12, y en las barras de una semana, se representan los mismos nematodos dauer por inanición sometidos a 30 °C. Se realizó un ANOVA de una vía; 0.1234 ns, no significativo, P value 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***), <0.0001(****).

Este resultado indica que la diapausa con el metabolito incrementa aún más la protección neuronal que por separado, lo que sugiere que lo hacen por vías independientes. Sin embargo, sin o con B12, los niveles de neuroprotección no bajan durante la semana de estrés a 30 °C.

4. *RB755 (metr-1)* sugiere una mayor sobrevivencia en estado dauer sometido a estrés térmico

En esta sección se quiso evaluar el comportamiento entre los mutantes de la vitamina B12, los cuales son *RB1434 (mmcm-1)* y *RB755 (metr-1)*. Primero se sometieron a inanición y luego de ello se sometieron durante una semana a la temperatura de 30 °C. Tras esto, se calculó el índice de sobrevivencia de dauer (ecuación 1), y se comparó con el control *N2 (Cepa Silvestre)* con los valores obtenidos previamente (Tabla 1) a 30 °C durante 7 días. Se observa una diferencia evidente de la sobrevivencia del mutante *RB755 (metr-1)* a comparación del control siendo este del 40%, y el del mutante ~70%. A pesar de contar con solo una réplica biológica, esto nos sugiere que este mutante tiene una mayor sobrevivencia. En cambio, con el mutante *RB1434 (mmcm-1)* se observa una disminución a la sobrevivencia frente al control con la Cepa Silvestre. Aquí, nuevamente

a pesar de no tener las tres réplicas biológicas, se observa esta diferencia lo cual se sugiere que al no estar este gen afecta las rutas metabólicas implicadas y que el nematodo en estado dauer no sobreviva a las temperaturas de 30 °C durante una semana.

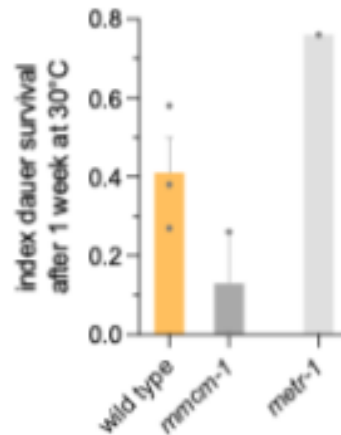


Figura 10. Comportamiento de los mutantes de la vitamina B12 en estado dauer a 30 °C. El control cepa N2 (*Cepa Silvestre*) presenta una sobrevivencia mayor a RB1434 (*mmcm-1*), pero menor en RB755 (*metr-1*).

5. Las placas con comidas al cabo de una semana forman dauer y sobreviven bajo estrés térmico

Los resultados a este experimento son muy relevantes, debido a que antes no se ha evaluado esto con nematodos en comida y siendo sometidos a estrés térmico. Entonces, en temperaturas frías de -80 °C a -20 °C, se observa que hay sobrevivencia de nematodos no dauer (%) durante una semana, siendo los tres mayores al 50%. Pero en -40 °C presentando un pequeño % de ~10% de formación de dauer.

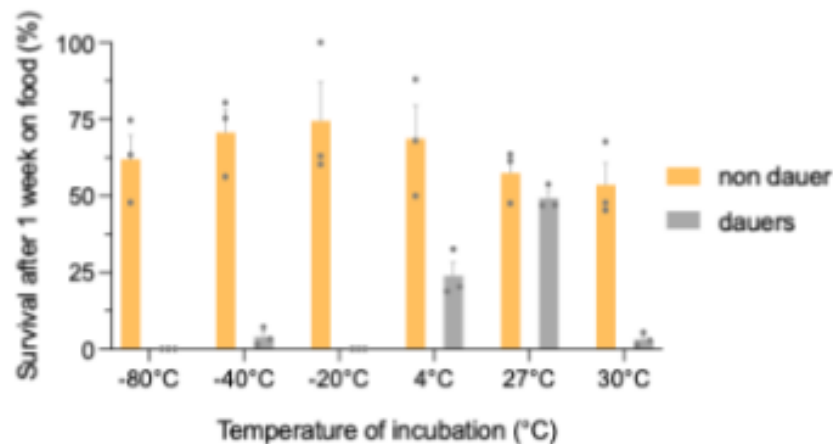


Figura 11. Efecto de la temperatura en la supervivencia y formación de dauer en presencia de E. coli OP50. Se presentan barras de supervivencia (no dauer) y barras de formación de dauer. Se destaca la supervivencia al 50% de todas las temperaturas y la inducción a dauer en 4 °C y 27 °C.

En 4 °C, se observa que también hubo supervivencia de más del 50% pero a su vez también hubo formación de nematodos en estado dauer del casi 25%, del cual nos sugiere que el nematodo puede hacer dauer a esta temperatura baja por temperaturas frías pero extremas como lo es -80 °C que es un estado de criptobiosis, por ejemplo. En cambio, a temperaturas más cálidas como 27 °C y 30 °C, también hubo supervivencia estando con comida de un 55% aproximadamente. Aquí, la formación del dauer en 27 °C fue mayor a todas las temperaturas, del cual fue 50% de los nematodos. Esto se explica por los factores que están implicados para que el nematodo entre en diapausa, y esto nos confirma que por este tipo de estrés y a esa temperatura se induce la entrada al dauer. A diferencia de 30 °C, la formación de dauer fue mínima, misma situación que a la temperatura de -40 °C.

Estos resultados sugieren que independiente de la temperatura, habiendo comida en el ambiente, gran parte de la población del nematodo puede sobrevivir por un periodo prolongado y además, se puede inducir a dauer por temperaturas frías como 4 °C y 27°C, siendo la primera no registrada en la literatura.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

1. Límites térmicos del estado dauer en *Caenorhabditis elegans*

Los resultados obtenidos en este estudio permiten discutir los límites fisiológicos del estado dauer de *C. elegans* frente a distintas temperaturas extremas, todas estas aplicadas a nematodos previamente inducidos a dauer por inanición.

En temperaturas extremadamente bajas, como -80 °C, se observó una fracción reducida, pero de igual manera con supervivencia tras la reanimación, especialmente a las 24 horas de exposición (Figura 7). Este resultado es coherente con investigaciones previas que demuestran que ciertos nematodos son capaces de sobrevivir a congelamientos extremos mediante estados de animación suspendida o criptobiosis (Shatilovich et al., 2023; Gade et al., 2020). Se ha evidenciado la recuperación de nematodos desde el Permafrost Siberiano de hace ~46.000 años, por lo que, estos ecosistemas son lugares de reservorios únicos de vida a temperaturas bajo cero durante la evolución (Shatilovich et al., 2023). Adicionalmente, existen otros registros de criptobiosis que incluyen especies como *Plectus murrayi*, recuperada tras ~25,5 años en musgo antártico congelado, y *Tylenchus polyhyphus*, reanimado tras 39 años desecado (Steiner & Albin, 1946; Kagoshima et al., 2012).

La supervivencia observada en -80 °C en *C. elegans* se explica por las características del estado dauer, tales como la presencia de una cutícula más gruesa e impermeable, reducción extrema del metabolismo y la acumulación de protectores moleculares como la trehalosa, la cual estabiliza proteínas y membranas durante el congelamiento y la desecación (Erkut et al., 2011; Gade et al., 2020). Sin embargo, la menor supervivencia observada fue durante una semana, en comparación con 24 horas, y esto sugiere que el estado dauer no es un estado estable, sino que presenta límites fisiológicos cuando el estrés se mantiene de forma prolongada (Figura 7).

En cambio, a -40 °C y -20 °C no se observó supervivencia (Figura 7). Si bien estas temperaturas se encuentran dentro del rango de climas como polares o subpolares, la ausencia de sobrevivientes se puede atribuir tanto a factores técnicos asociados al enfriamiento, como equipos que mantienen frío sin generar congelamiento homogéneo, como a la posibilidad de que estas condiciones generen un daño celular progresivo sin activar completamente el programa de criptobiosis. A diferencia del congelamiento a -80 °C, las temperaturas bajo cero no extremas pueden favorecer la formación de cristales de hielo en el organismo, que son considerados dañinos para la integridad celular (Mazur, 2004).

A 4 °C, esta es una temperatura comparable a ambientes fríos templados o regiones como la Patagonia austral, por ejemplo, y en esta temperatura se observó una supervivencia tanto a 24 horas como a una semana (Figura 7). Este resultado es relevante debido a que es algo que se descubrió durante esta tesis.

En temperaturas alta, como 27 °C, se observó un aumento en la proporción de animales en estado dauer al final del experimento, tras una semana 24 horas y una semana

(Figura 7). Este resultado es consistente con estudios previos, que describen que 27 °C es una temperatura inductora de dauer, especialmente si se combina con inanición, debido a que se encuentra fuera del rango óptimo del fitness del nematodo (15 °C - 25 °C) (Riddle et al., 1981; Antebi, 2008). En este contexto, la temperatura actúa no solo como estresor, sino también como señal ambiental para reforzar la decisión de mantener la diapausa.

A 30 °C, aunque no se observó mucha sobrevivencia (Figura 7) a comparación de 27 °C, muchos individuos presentaron deterioro estructural. Este fenómeno podría estar asociado a procesos de desecación parcial o anhidrobiosis, considerando que las larvas dauer han sido descritas como verdaderas anhidrobiontes capaces de sobrevivir a la pérdida severa de agua corporal (Erkut et al., 2011; Gade et al., 2020). En este estado, el metabolismo se reprograma hacia un modo gluconeogénico, con activación de la β -oxidación de ácidos grasos y desvío de acetil-CoA hacia la vía del glioxilato para la síntesis de trehalosa, un metabolito clave para la tolerancia a la desecación y al estrés térmico (Erkut et al., 2011; Gade et al., 2020). Pero, temperaturas cercanas o superiores a 30 °C comienza a haber un papel en la estabilidad enzimática y la integridad de membranas, lo que limita la eficacia del estado dauer.

En 37 °C no se observó supervivencia, lo que es coherente con el hecho de que esta temperatura excede el rango térmico tolerable para *C. elegans*. En esta temperatura, nuevamente la pérdida de función enzimática y el colapso de la homeostasis celular ocurren de manera rápida, incluso en organismos en estado dauer, estableciendo un límite fisiológico claro para la diapausa (Kourtis & Tavernarakis, 2011).

Algo clave de este estudio es la diferencia observada entre los tiempos de exposición de 24 horas y una semana. Las mediciones a 24 horas reflejan la fase de del estado dauer, considerando que su formación completa puede tardar entre 24 y 48 horas dependiendo de la intensidad del estrés (Cassada & Russell, 1975; Riddle et al., 1981). En cambio, los datos de una semana evalúan la capacidad de mantención prolongada del estado dauer bajo estrés continuo. La disminución de la supervivencia a tiempos largos sugiere un desgaste progresivo de las reservas energéticas y una acumulación de daño celular, evidenciando que el dauer es un programa dinámico y finito, no un estado indefinidamente estable.

En conjunto, estos resultados indican que el estado dauer confiere a *C. elegans* resiliencia frente a un amplio rango de temperaturas, pero también posee límites definidos por la duración del estrés y la intensidad térmica. Comprender los mecanismos que permiten la inducción, mantención y el colapso de este estado aporta información fundamental sobre los límites entre la vida activa, la animación suspendida y la muerte celular (Gade et al., 2020)

2. Vitamina B12 como modulador metabólico del mantenimiento del estado dauer a 30 °C

La vitamina B12 es un micronutriente esencial que participa en reacciones clave del metabolismo, como en rutas que conectan el metabolismo de lípidos, aminoácidos y la

producción de energía celular. En *C. elegans*, la vitamina B12 no puede ser sintetizada de *novo* y debe ser obtenida a través de la dieta bacteriana. (Watson et al., 2014). En condiciones estándar de laboratorio, la bacteria *E. coli* OP50 es utilizada como fuente alimenticia basal, no solo como control experimental, sino porque permite un crecimiento estable y reproducible del nematodo. Sin embargo, *E. coli* OP50 es relativamente pobre en vitamina B12, lo que implica que el metabolismo del nematodo sea bajo condiciones de disponibilidad limitada de este cofactor (Watson et al., 2014).

Uno de los roles metabólicos más relevantes de la vitamina B12 es su función como cofactor de la enzima metilmalonil-CoA mutasa, encargada de catalizar la conversión de metilmalonil-CoA en succinil-CoA. El metilmalonil-CoA es un intermediario que se genera principalmente durante la β -oxidación de ácidos grasos. En ausencia o deficiencia de vitamina B12, este intermediario se acumula, lo que puede generar disfunción metabólica y estrés celular. En contraste, cuando la vitamina B12 está disponible, la conversión a succinil-CoA permite que estos carbonos ingresen eficientemente al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), integrándose a la producción energética mitocondrial (Watson et al., 2014; Gade et al., 2020).

El dauer se caracteriza por una profunda reprogramación metabólica para la supervivencia a largo plazo, en la cual los lípidos almacenados en forma de triacilglicéridos constituyen la principal fuente de energía (Erkut et al., 2016). Estos lípidos son degradados mediante β -oxidación, generando acetil-CoA y otros intermediarios que deben ser eficientes para evitar el agotamiento de las reservas energéticas. La disponibilidad de vitamina B12 podría, por tanto, optimizar el flujo metabólico entre la β -oxidación y el ciclo del TCA, favoreciendo una utilización más eficiente de los lípidos durante la permanencia prolongada en dauer (Erkut et al., 2016; Gade et al., 2020).

Además de su conexión con el ciclo del TCA, el metabolismo del dauer se distingue por una transición gluconeogénica. En este estado, el carbono derivado de los ácidos grasos no se utiliza para la oxidación completa, sino que es redirigido hacia la síntesis de glucosa y, posteriormente, de trehalosa, un disacárido no reductor fundamental para la tolerancia al estrés (Erkut et al., 2011). Este proceso se lleva a cabo a través del desvío del acetil-CoA desde el ciclo del TCA hacia la vía del glioxilato, una ruta metabólica que permite la conversión de lípidos en carbohidratos, algo que no es posible mediante el TCA convencional (Erkut et al., 2016; Gade et al., 2020).

La trehalosa producida a partir de esta gluconeogénesis cumple funciones protectoras: estabiliza proteínas, preserva la integridad de las membranas celulares y reduce el daño asociado a la desecación y al estrés térmico. Estudios previos han demostrado que niveles elevados de trehalosa son esenciales para la supervivencia del dauer bajo condiciones extremas, incluyendo desecación severa y temperaturas desfavorables (Erkut et al., 2011; Gade et al., 2020). En este contexto, una mayor eficiencia metabólica facilitada por la vitamina B12 podría favorecer la síntesis de trehalosa, contribuyendo a una mayor estabilidad celular durante la exposición prolongada a 30 °C.

La elección de 30 °C como condición experimental es relevante, ya que esta temperatura se sitúa por encima del rango óptimo de desarrollo de *C. elegans* (15 °C - 25 °C), pero

por debajo de la temperatura letal observada a 37 °C. En cuanto a 30 °C, los nematodos experimentan alteraciones en el plegamiento proteico y una mayor demanda energética para el mantenimiento de la homeostasis celular (Ailion & Thomas, 2000). Bajo estas condiciones, pueden traducirse ventajas de supervivencia a lo largo del tiempo, que depende de un equilibrio fino entre ahorro energético y mantenimiento de funciones vitales.

Los resultados obtenidos muestran que la suplementación con vitamina B12 en *E. coli OP50* incrementa el índice de dauer en el día de inicio por inanición y tras una semana a 30 °C este índice se mantiene en comparación con *E. coli OP50* sin suplementar (Figura 8). Estos datos sugieren que la vitamina B12 no actúa como un inductor del estado dauer, sino como un modulador metabólico que mejora la capacidad del dauer para sostener su programa de supervivencia frente a condiciones desfavorables (Watson et al., 2014; Gade et al., 2020).

Cabe destacar que existen escasos antecedentes que evalúen específicamente el efecto de la vitamina B12 sobre la fisiología del estado dauer. La mayoría de los estudios previos se han centrado en el desarrollo larval, la fertilidad o el crecimiento en condiciones no extremas. Por lo tanto, los resultados presentados aportan evidencia novedosa que sugiere que la vitamina B12 podría desempeñar un rol relevante en la resiliencia metabólica del dauer, en saber cómo los micronutrientes bacterianos influyen en estados de diapausa (Watson et al., 2014; Gade et al., 2020). Además, se sugiere hacer este mismo protocolo, pero con otras temperaturas, quizás hacer una comparación a 4 °C, o alguna temperatura más extrema como -80 °C ó -40 °C.

3. La vitamina B12 modula la regeneración axonal en el estado dauer por inanición

La diapausa en *C. elegans*, además de funcionar como una estrategia de supervivencia frente a condiciones ambientales desfavorables, está asociada a mecanismos de protección y regeneración del sistema nervioso. Estudios previos han demostrado que, durante la diapausa, el nematodo no sólo reduce su metabolismo y reorganiza su fisiología, sino que también activa programas de defensa celular que preservan la integridad neural frente a estrés degenerativos (Calixto et al., 2012; Caneo et al., 2019).

Los nematodos en estado dauer con la mutación *mec-4(d)* evita la degeneración axonal que normalmente ocurre en estas neuronas, evidenciando que el estado dauer promueve la neuroprotección frente a estímulos pro-degenerativos (Calixto et al., 2012; Caneo et al., 2019)

En el estudio de Caneo et al., (2019) demostraron que la diapausa induce la regeneración funcional de axones truncados en neuronas mecanosensoriales (como AVM, ALM y PLM) tras daño severo causado por la hiperactivación del canal MEC-4 (Caneo et al., 2019). Además, en este estudio, observaron que los animales recuperaron la capacidad de responder a estímulos mecánicos tras pocos días en estado dauer. Este fenómeno de regeneración completa ayuda a explorar la biología en organismos *in vivo* y posicionando a este modelo como potenciador para futuras preguntas de investigación.

Desde un punto de vista molecular, la neuroprotección y regeneración en *C. elegans* durante la diapausa están fuertemente moduladas por la vía de señalización similar a la insulina/IGF-1 (IIS) y factores de transcripción como DAF-16/FOXO. La inactivación genética del receptor de insulina DAF-2 en animales no dauer promueve la regeneración de axones *mec-4(d)*, mientras que la sobreexpresión de DAF-16 incrementa la protección neuronal, y la pérdida de DAF-16 acelera la degeneración (Caneo et al., 2019).

A nivel de redes genéticas, la regeneración axonal en *C. elegans* en estado dauer involucra múltiples factores moleculares además de IIS. La regeneración de axones truncados depende, por ejemplo, de la quinasa DLK-1, una proteína conservada requerida para la reparación axonal que actúa a través de vías de señalización que regulan estabilidad y traducción local de mRNAs en el sitio de regeneración (Caneo et al., 2019). Esto indica que la respuesta regenerativa en dauer resulta de la interacción entre rutas de señalización celular que detectan daño, factores de transcripción que programan respuestas protectoras y maquinaria local en el axón que moviliza componentes regenerativos (Caneo et al., 2019; Yan et al., 2009) .

Aunque no existen aún estudios publicados que evalúen específicamente el impacto de vitamina B12 sobre regeneración axonal de nematodos en estado dauer, los resultados sugieren que ambientes nutricionales enriquecidos con vitamina B12 protegen las morfologías neuronales del tipo silvestre (AxW) después de estrés por inanición y las mantiene a un estrés térmico a 30 °C.

Desde una perspectiva evolutiva, la capacidad de regenerar neuronas y proteger el sistema nervioso durante periodos de latencia metabólica como la diapausa representa una clara ventaja adaptativa. Organismos que logran conservar la funcionalidad de sus circuitos neuronales tras condiciones extremas tienen mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse cuando el ambiente vuelve a ser favorable, evitando así la pérdida de degeneración neural irreversible (Caneo et al., 2019; Calixto et al., 2012). Además, se sugiere realizar este mismo experimento por un tiempo prolongado como alrededor de un mes, o al igual que intentar con temperaturas más frías como los 4 °C o -80 °C en donde se evidenció en los límites del dauer la sobrevivencia de dauer a -80 °C.

4. Hallazgo de 4 °C como posible inductor de diapausa en *Caenorhabditis elegans*

Los resultados obtenidos en este experimento son particularmente relevantes, ya que evalúan por primera vez la sobrevivencia y la formación del estado dauer en *C. elegans* en presencia de alimento bajo distintas condiciones de estrés térmico. La mayoría de los estudios previos han analizado estos fenómenos en condiciones de privación de alimento (inanición), por lo que la inclusión del alimento como variable ambiental aporta una perspectiva novedosa al entendimiento de la respuesta adaptativa del nematodo.

En términos generales, se observó que, más del 50% de la población logró sobrevivir durante una semana en presencia de alimento, lo que sugiere que la disponibilidad de alimento podría desempeñar un rol protector frente al estrés térmico prolongado. Este

resultado es consistente con la idea de que el alimento no solo sostiene el metabolismo basal, sino que también podría contribuir a la mantención de la viabilidad celular bajo condiciones ambientales adversas (Carey et al., 2003).

En temperaturas extremadamente bajas, entre $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se registró una alta sobrevivencia de nematodos no dauer. Este fenómeno podría asociarse a mecanismos de tolerancia extrema al frío, como estados de criptobiosis, previamente descritos en *C. elegans* (Shatilovich et al., 2023). En el caso de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, si bien la sobrevivencia se mantuvo elevada, se detectó un bajo porcentaje de formación de dauer ($\sim 10\%$), lo que sugiere que esta temperatura podría representar un umbral intermedio donde se activan parcialmente las vías de respuesta al estrés, sin inducir masivamente la diapausa.

Uno de los hallazgos más relevantes del estudio se observó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde coexistieron una hubo una inducción significativa del estado dauer ($\sim 25\%$), aun en presencia de alimento. Este resultado es llamativo, ya que la inducción de dauer a esta temperatura no ha sido previamente reportada en la literatura, especialmente bajo condiciones de disponibilidad de alimento. Esto sugiere que el frío sostenido, aunque no extremo, podría actuar como un estresor suficiente para activar programas de desarrollo alternativo como el dauer, incluso cuando el alimento está presente.

En temperaturas más elevadas, específicamente a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observó la mayor inducción de dauer ($\sim 50\%$), lo cual concuerda con lo descrito en la literatura (Ailion et al., 2000), donde esta temperatura es reconocida como un potente inductor de la entrada en diapausa. En este contexto, la presencia de alimento no impidió la activación del programa dauer. A $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en cambio, la formación de dauer fue mínima, similar a lo observado en $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que podría indicar que temperaturas más extremas limitan la capacidad del nematodo para entrar al programa de diapausa.

En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia de alimento permite una alta sobrevivencia de *C. elegans* bajo estrés térmico prolongado, pero no impide la inducción del estado dauer cuando las condiciones ambientales lo favorecen. Además, se demuestra que tanto temperaturas cálidas ($27\text{ }^{\circ}\text{C}$) como frías ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) pueden inducir la formación de dauer, siendo este último un hallazgo novedoso y no descrito previamente. Por lo que, estos datos abren nuevas interrogantes respecto al rol del alimento como modulador de la respuesta al estrés térmico y a la regulación del desarrollo en *C. elegans*. Futuros estudios deberían considerar un mayor número de réplicas biológicas, así como extender el período de exposición más allá de una semana, con el fin de evaluar la estabilidad de la sobrevivencia y la dinámica temporal de la formación de dauer bajo estas condiciones.

5. Efecto de mutantes de la vitamina B12 en la sobrevivencia del estado dauer bajo estrés térmico

La sobrevivencia observada entre los mutantes asociados al metabolismo de la vitamina B12 sugiere que estas rutas metabólicas influyen en la capacidad del estado dauer para tolerar estrés térmico prolongado. En el mutante *RB1434 (mmcm-1)* presentó una menor sobrevivencia en comparación con la cepa silvestre, lo que es consistente con la

acumulación de propionato y metabolitos tóxicos derivados de la alteración de la vía propionato–succinil-CoA, previamente descrita en la literatura (MacNeil et al., 2013; Urquiza et al., 2023). Este estrés metabólico podría interferir con la activación de mecanismos de respuesta al estrés.

En contraste, el mutante *RB755 (metr-1)* mostró una mayor sobrevivencia bajo las mismas condiciones. La alteración de la ruta homocisteína–metionina, si bien afecta la producción de S-adenosilmetionina (SAM) y procesos de metilación, no genera una acumulación inmediata de metabolitos altamente tóxicos, lo que podría permitir una mejor mantención de la homeostasis celular durante el estrés térmico (MacNeil et al., 2013).

Si bien estos resultados se basan en un número limitado de réplicas biológicas, se sugiere que la interacción entre metabolismo dependiente de vitamina B12 y vías de respuesta al estrés podría influir en la sobrevivencia del estado dauer bajo condiciones de estrés térmico.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN

El estado dauer de *Caenorhabditis elegans* representa una estrategia adaptativa altamente especializada que permite al organismo sobrevivir frente a condiciones ambientales adversas. Sin embargo, los resultados de este trabajo demuestran que esta resistencia no es ilimitada, sino que se encuentra modulada por la duración del estrés, la temperatura y el estado metabólico del nematodo.

A lo largo de los experimentos se observó que el dauer es capaz de mantenerse viable durante períodos prolongados de estrés térmico, incluso durante una semana completa a temperaturas elevadas como 30 °C. No obstante, esta sobrevivencia sugiere la existencia de un equilibrio entre mecanismos de protección celular y el costo fisiológico asociado a la mantención del estado de diapausa. En este contexto, la capacidad del dauer para tolerar estrés térmico prolongado parece depender de la mantención de la homeostasis metabólica y del control del daño celular, particularmente del estrés oxidativo.

El metabolismo como factor clave, condiciona los límites de la sobrevivencia del dauer. Alteraciones metabólicas, como aquellas asociadas a rutas dependientes de micronutrientes bacterianos, afectan la capacidad del nematodo para sostener respuestas protectoras eficientes frente al estrés. Esto sugiere que, aun en un estado altamente resistente como el dauer, la acumulación de metabolitos tóxicos o la alteración de procesos reguladores puede comprometer la viabilidad a largo plazo.

En conjunto, los resultados indican que el estado dauer no constituye un estado pasivo, sino una condición dinámica que requiere una regulación metabólica activa para mantener la integridad celular y limitar el daño oxidativo bajo estrés térmico prolongado. De este modo, la resistencia del dauer presenta límites definidos por la interacción entre temperatura, tiempo de exposición y estado metabólico, lo que amplía la comprensión de este estado como una estrategia adaptativa finita y dependiente del contexto fisiológico.

Estudios futuros se espera que incorporen un mayor número de réplicas biológicas y análisis directos de daño oxidativo permitirán profundizar en los límites fisiológicos del estado dauer y en los mecanismos que regulan su resiliencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ailion, M., & Thomas, J. H. (2000). Dauer formation induced by high temperatures in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 156(3), 1047–1067.
<https://doi.org/10.1093/genetics/156.3.1047>
2. Antebi, A., Yeh, W. H., Tait, D., Hedgecock, E. M., & Riddle, D. L. (2000). daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 14(12), 1512–1527.
<https://doi.org/10.1101/gad.14.12.1512>
3. Deborah A Birnby, Elizabeth Malone Link, Jennifer J Vowels, Hong Tian, Patrick L Colacurcio, James H Thomas, A Transmembrane Guanylyl Cyclase (DAF-11) and Hsp90 (DAF-21) Regulate a Common Set of Chemosensory Behaviors in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, Volume 155, Issue 1, 1 May 2000, Pages 85–104.
<https://doi.org/10.1093/genetics/155.1.85>
4. S Brenner, THE GENETICS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*, *Genetics*, Volume 77, Issue 1, 1 May 1974, Pages 71–94.
<https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
5. Carey, H. V., Andrews, M. T., & Martin, S. L. (2003). Mammalian hibernation: Cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological Reviews*, 83(4), 1153–1181.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00008.200>
6. Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1975). The dauer larva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 46(2), 326–342.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
7. Calixto, A. (2015). Life without Food and the Implications for Neurodegeneration. *Advances in Genetics*, Vol. 92, pp. 53–74.
<http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.09.004>

8. Calixto, A., Jara, J. S. & Court, F. A. (2012). *Diapause formation and downregulation of insulin-like signaling via DAF-16/FOXO delays axonal degeneration and neuronal loss*. *PLoS Genetics*, 8(12), e1003141.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003141>
9. Caneo, M., Julian, V., Byrne, A. B., Alkema, M. J., & Calixto, A. (2019). Diapause induces functional axonal regeneration after necrotic insult in *C. elegans*. *PLoS Genetics*, 15(1), e1007863.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007863>
10. Driscoll, M., Chalfie, M. The *mec-4* gene is a member of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that can mutate to induce neuronal degeneration. *Nature* 349, 588–593 (1991).
<https://doi.org/10.1038/349588a0>
11. Erkut, C., Penkov, S., Khesbak, H., et al. (2011). Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. *Current Biology*, 21(15), 1331–1336.
DOI: 10.1016/j.cub.2011.06.064
12. Erkut, C., Gade, V. R., Laxman, S., & Kurzchalia, T. V. (2016). The glyoxylate shunt is essential for desiccation tolerance in *Caenorhabditis elegans* and budding yeast. *eLife*, 5, e13614.
<https://doi.org/10.7554/eLife.13614>
13. Fielenbach, N., & Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & Development*, 22(16), 2149–2165.
<https://doi.org/10.1101/gad.1701508>
14. Gade, V. R., Traikov, S., Oertel, J., et al. (2020). *Caenorhabditis elegans* possesses a general program to enter cryptobiosis that allows dauer larvae to survive different abiotic stresses. *Scientific Reports*, 10, 13466.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70311-8>
15. Golden, J. W., & Riddle, D. L. (1982). A pheromone influences larval development in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 218(4572), 578–580.
DOI:[10.1126/science.6896933](https://doi.org/10.1126/science.6896933)

16. Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 387–399.
<https://doi.org/10.1038/nrd2031>
17. Kimura, K. D., Tissenbaum, H. A., Liu, Y., & Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor–like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277, 942–946.
DOI:[10.1126/science.277.5328.942](https://doi.org/10.1126/science.277.5328.942)
18. MacNeil, L. T., Watson, E., Arda, H. E., Zhu, L. J., & Walhout, A. J. M. (2013). Diet-Induced Developmental Acceleration Independent of TOR and Insulin in *C. elegans*. *Cell*, 153(1), 240–252.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.049>
19. Lin, K., Dorman, J. B., Rodan, A., & Kenyon, C. (1997). *daf-16*: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 278, 1319–1322.
DOI:[10.1126/science.278.5341.1319](https://doi.org/10.1126/science.278.5341.1319)
20. Palominos, M. F., Verdugo, L., Gabaldón, C., et al. (2017). Transgenerational diapause as an avoidance strategy against bacterial pathogens in *Caenorhabditis elegans*. *mBio*, 8(5), e01234-17.
<https://doi.org/10.1128/mBio.01234-17>
21. Penkov, S., Raghuraman, B. K., Erkut, C., et al. (2020). A metabolic switch regulates the transition between growth and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biology*, 18, 31.
<https://doi.org/10.1186/s12915-020-0760-3>
22. Ren, P., Lim, C. S., Johnsen, R., et al. (1996). Control of *C. elegans* larval Development by Neuronal Expression of a TGF- β Homolog. *Science*, 274, 1389–1391.
DOI:[10.1126/science.274.5291.1389](https://doi.org/10.1126/science.274.5291.1389)
23. Riddle, D. L., Swanson, M. M., & Albert, P. S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature*, 290, 668–671.
<https://doi.org/10.1038/290668a0>

24. Shatilovich, A., Gade, V. R., Pippel, M., et al. (2023). A novel nematode species from the Siberian permafrost shares adaptive mechanisms for cryptobiotic survival with *C. elegans* dauer larva. *PLoS Genetics*, 19(7), e1010798. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010798>
25. Steiner, G., & Albin, F. E. (1946). Resuscitation of the nematode *Tylenchus polyhyphus* after almost 39 years' dormancy. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 36(3), 97–99. <http://www.jstor.org/stable/24531435>
26. Urquiza-Zurich, S., Garcia-Angulo, V. A., Burdisso, P., Palominos, M. F., Fernandez-Hubeid, L., Harcha, P. A., Castillo, J. P., & Calixto, A. (2023). The Assembly of Bacteria Living in Natural Environments Shapes Neuronal Integrity and Behavioral Outputs in *Caenorhabditis elegans*. *mBio*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.03402-22>
27. Watson, E., et al. (2014). Metabolic network rewiring of the bacterial diet determines lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 156(6), 1336–1337. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.019>
28. White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 314, 1–340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
29. Wood, W. B. (1988). *The Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1017/S0016672300027713>