



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2003).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

EL NEMATODO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO DE ESTUDIO DEL DESARROLLO

Rosa Estela Navarro González

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-600
México DF 04510, MEXICO
navarro@ifisiol.unam.mx

Introducción

El nematodo *C. elegans* es fácil de manipular en el laboratorio, tiene un genoma pequeño, una anatomía simple y esto lo convierte en un organismo modelo muy atractivo para estudiar los mecanismos de acción de sus genes, su funcionamiento y regulación. En este organismo podemos estudiar preguntas tan diversas tales como: ¿Cómo se forma un organismo?, ¿Por qué envejecen los seres vivos?, ¿Cómo funcionan las neuronas?, ¿Cómo se diferencia una célula?, ¿Qué determina el comportamiento de un organismo? y muchas otras más.

El surgimiento del *C. elegans* como un organismo modelo

En su carta dirigida a Max Perutz en 1963, Sydney Brenner (uno de los fundadores de la Biología Molecular) comenta que después del descubrimiento de la estructura del DNA, él sentía que las preguntas clásicas más interesantes de la Biología Molecular ya habían sido o serían contestadas muy pronto. Él consideraba que la investigación en esta área debía ser dirigida hacia algo más biológico, como el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos que regulan el desarrollo de un organismo y el funcionamiento del sistema nervioso [1]. Para estudiar el desarrollo, Brenner decidió elegir un animal pequeño en donde pudiera hacer análisis genéticos y bioquímicos y que presentara características parecidas a los microorganismos que se usaban en esa época. Las características que debía presentar este organismo modelo eran: ser multicelular, tener un ciclo de vida corto, fácil crecimiento en el laboratorio y con una numerosa descendencia para poder hacer estudios genéticos y estadísticos. Además, este organismo modelo debía presentar un número pequeño de células, que se diferenciarán en un patrón constante, para poder conocer el destino celular de cada una de ellas. Brenner se propuso trabajar con un nematodo pequeño, de tan solo 1 mm de largo, conocido como *Caenorhabditis elegans* que es de vida libre y se alimenta principalmente de bacterias. Este organismo que se encuentra principalmente en forma de hermafrodita, puede autofecundarse o cruzarse por reproducción sexual. Cada animal puede tener cerca de 200 embriones transparentes que se desarrollan fuera de la madre y que pueden ser observados fácilmente. El ciclo de vida de estos animales es muy corto, con un período de embriogénesis que dura aproximadamente 14 horas (Figura 1) y su crecimiento larvario que se completa en tan solo tres días. Cuando alcanza la madurez sexual tiene solo 959 células que están organizadas en epidermis, aparato digestivo, reproductor, nervioso y muscular (Figura 2). Brenner inició sus estudios identificando el destino celular de cada una de las células que componen a este organismo durante la embriogénesis, con el propósito de obtener un linaje celular. También se propuso aislar mutantes para hacer estudios genéticos. De este modo, Brenner y colaboradores publicaron en 1974 el primer artículo sobre el estudio del *C. elegans*, en donde se describe cómo cultivar a este organismo en el laboratorio, además de una colección de mutantes que sirven hasta la fecha como marcadores genéticos [2]. John Sulston y Robert Horvitz, convencidos por Brenner, se abocaron a la minuciosa tarea de observar en el microscopio cada una de las divisiones celulares que ocurren durante la embriogénesis del *C. elegans* (Figura 1) y determinar el linaje celular de este organismo, el cuál es el único que se ha completado hasta el momento. En 1977 y 1983 Sulston, Horvitz y colaboradores publicaron dos artículos en donde reportan el linaje celular del *C. elegans* durante la embriogénesis [3, 4]. En este trabajo, Sulston y Horvitz describieron cómo cada una de las células de este nematodo tiene un destino distinto, es decir, que puede diferenciarse en célula del aparato digestivo, en una neurona, en una célula germinal, etc.

Estos autores se sorprendieron al observar que algunas de las células de este organismo tenían como destino morir, y así fue como se descubrió por primera vez la muerte celular programada o apoptosis. Interesados en este fenómeno, Sulston y Horvitz realizaron una serie de mutaciones con el fin de encontrar a los genes involucrados en la muerte celular programada (Figura 3). Sus hallazgos fueron sorprendentes, ya que descubrieron a los genes que participan en la apoptosis de cualquier organismo vivo incluyendo a los humanos [5]. Debido a sus valiosas contribuciones en el campo de la Biología del Desarrollo y la Apoptosis, en el 2002 Sydney Brenner, John Sulston y Robert Horvitz fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina. ¿Quién hubiera creído que estudiar el desarrollo de un organismo tan sencillo, y tan

poco parecido a un ser humano, iba a conducir al descubrimiento de mecanismos básicos del funcionamiento de los seres vivos?

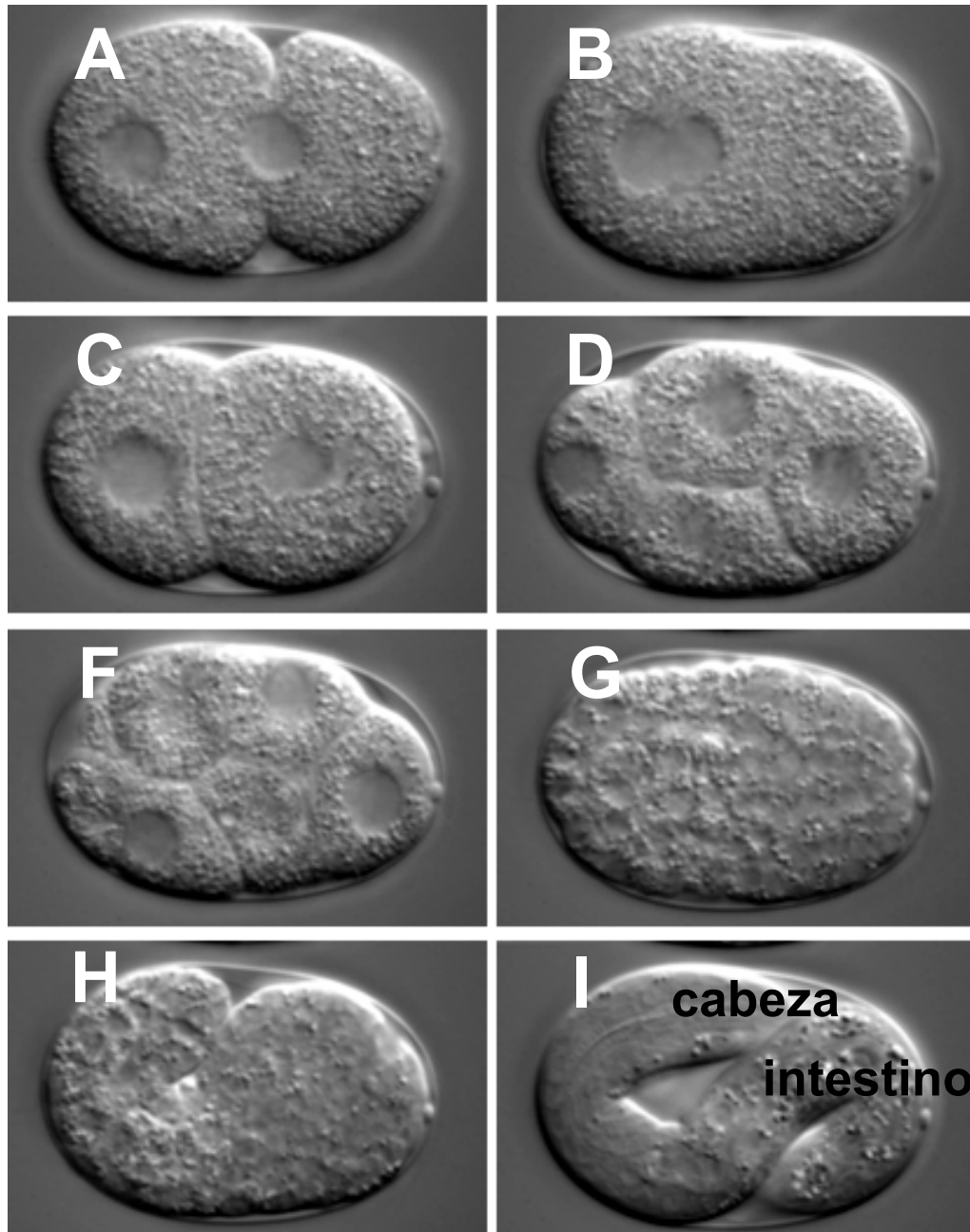


Figura 1. Desarrollo embrionario del *C. elegans*. Los embriones son transparentes lo que facilita su observación y aquí se muestran en microscopía tipo Nomarski. Se muestran embriones de una (A y B), dos (C), cuatro (D), siete (E) y aproximadamente 100 células (F). En H se muestra a un embrión en gastrulación y en I a un animal totalmente formado y a punto de salir del huevo. En A y B se puede apreciar la migración de núcleo paterno y materno para fusionarse antes de llevarse a cabo la primera división. La embriogénesis se completa en 14 horas.

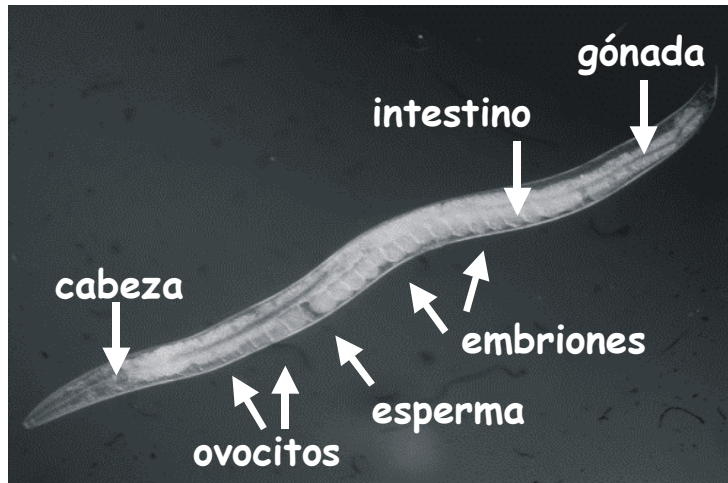


Figura 2. *C. elegans* adulto. Se puede apreciar la transparencia del animal y las estructuras que lo componen.

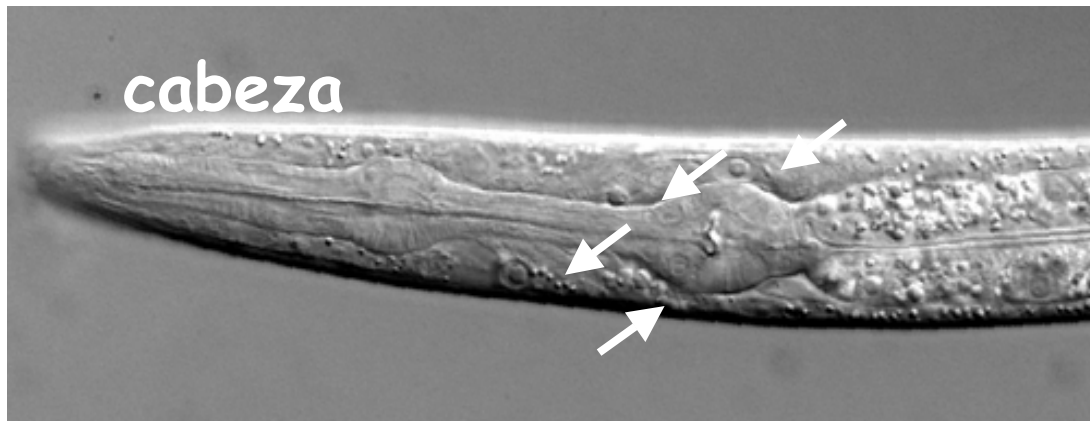


Figura 3. Muerte celular programada en *C. elegans*. Durante la embriogénesis y la primera etapa larvaria, 131 células mueren después de realizar su función. Las flechas blancas indican células en apoptosis en la cabeza de una larva L1 (primera etapa larvaria de cuatro).

Actualmente conocemos la secuencia completa de su genoma y sabemos que para formar a este pequeño organismo se requieren cerca de 19,000 genes. Ahora tenemos la enorme e interesante labor de estudiar cómo es que estos genes funcionan y cómo es que se relacionan entre ellos. Actualmente para responder estas preguntas, la comunidad de científicos que usan a *C. elegans* como organismo modelo, cuenta con numerosas herramientas que se describen a continuación.

El nematodo *C. elegans* en la era de la Genómica

Hasta hace menos de cinco años el enfoque clásico en la investigación genética era encontrar una mutante con un fenotipo interesante y tratar de encontrar el gen que estaba afectado, lo cuál implicaba varios años de estudio. Ahora la ciencia esta avanzando rápidamente gracias a que conocemos la secuencia completa de los genes de varios organismos y podemos hacer "Genética Reversa". ¿En qué consiste esto? Bueno, ahora podemos comenzar por elegir nuestro gen preferido de las secuencias genómicas disponibles, hacer una mutante dirigida, estudiar su fenotipo, aislar genes que participan en la misma vía y comenzar el ciclo de nuevo. Todo esto se puede hacer a un ritmo acelerado gracias al desarrollo de nuevas tecnologías que revisaremos en este apartado.

Mutagénesis e Interferencia de ARN (RNAi)

Ahora que conocemos la secuencia completa del genoma del *C. elegans*, una de las prioridades de la comunidad científica, es mutar todos y cada uno de los genes de este nematodo y determinar su repercusión en el desarrollo y sobrevivencia del organismo. En este sentido se formó un Consorcio para mutagenizar todos los genes del *C. elegans* que está formado por tres laboratorios independientes, localizados en EUA, Canadá e Inglaterra. Hasta la fecha se han generado más de 200 mutantes y cada día se están obteniendo más. La técnica que se utiliza para aislar a las mutantes está basada en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Figura 4). Primero se genera una colección de animales mutagenizados con el compuesto químico (conocido como etil metano sulfanato, EMS) (Figura 4A). Estos animales se separan en dos grupos (Figura 4B); una parte sirve para preservar a los animales y la otra para extraer al DNA que será utilizado en la reacciones de PCR. Para localizar a los genes se diseñan secuencias de DNA que flanquean cada gen y que se utilizan en la reacción de PCR (Figura 4C). El químico utilizado para producir a las mutantes, fragmenta los genes al azar de tal forma que, cuando se realiza la reacción de PCR se pueden identificar los genes mutados porque ahora son más pequeños que el original (Figura 4D). Una vez identificada la población de animales mutados, se crece a los animales vivos que se guardaron y se separan en poblaciones más pequeñas con las cuales se repite el procedimiento (Figura 4E). De tal forma que la población de animales portadora de la mutación se va separando hasta aislar el animal que tiene mutado el gen que se busca. Una vez aislada la mutación (Figura 4F) se puede estudiar su fenotipo por medio de microscopia y realizando pruebas específicas para el tipo de mutación.

Otra manera de estudiar el fenotipo causado por la alteración de un gen es conocido como interferencia de ARN o RNAi (por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el reciente descubrimiento de que en los organismos vivos, se puede apagar la expresión de un gen específico en respuesta a la introducción a la célula de su propio ARN [6]. El ARN tiene que estar en forma de una cadena doble y complementaria al gen que se desee estudiar. La cadena de ARN doble (Figura 5A), se introduce al animal por medio de inyecciones (Figura 5B). Al entrar a la célula, este ARN es degradado en moléculas de RNA de aproximadamente 21 nucleótidos que, mediante un mecanismo aún desconocido, apagan la expresión únicamente del gen en estudio (Figura 5C). El silenciamiento en la expresión de este gen es transitorio y solo puede observarse por una o dos generaciones, tiempo suficiente para estudiar el fenotipo. Este mecanismo de silenciamiento de genes que fue descubierto en el *C. elegans* y ahora se sabe que está conservado en varios organismos, y podría ser utilizado como un mecanismo de terapia

génica en el futuro. Es decir, si sabemos que en cierta enfermedad existe un aumento en la expresión de un gen específico y conocemos su identidad, podríamos apagar su expresión por medio de inyecciones de ARN de doble cadena y curar así la enfermedad.

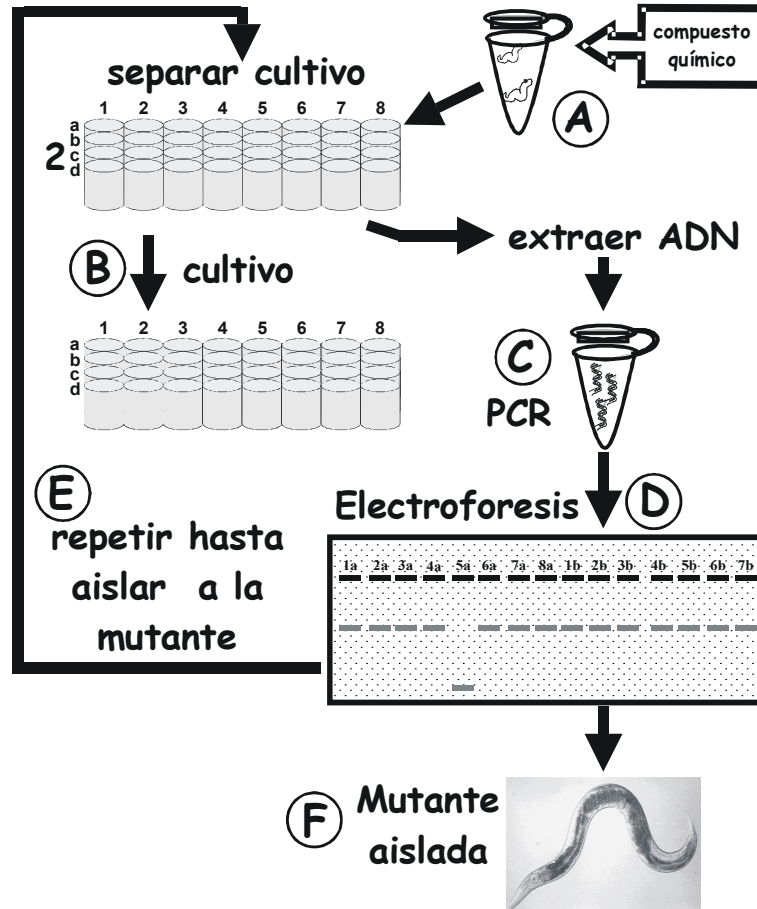


Figura 4. Aislamiento de mutantes en *C. elegans*. Un compuesto químico que provoca deleciones en el genoma es utilizado para aislar mutantes de este organismo. Las mutaciones son identificadas mediante PCR. Un producto de PCR de menor peso molecular del esperado indica que hubo una deleción en el gen. Los pasos del procedimiento son: A) Mutagénesis. B) Separación de la muestra en: cultivos para preservar a los animales y muestras para extraer DNA. C) reacción de PCR. D) Las muestras de PCR se separan en una electroforesis y se visualiza la mutante (carril 5a). E) Se repite el procedimiento hasta aislar la mutante (F).

Una vez que se hace RNAi del gen que se desea, el procedimiento para estudiar el fenotipo causado por la falta de expresión del gen es el mismo que se sigue en mutantes. La ventaja de este método es que es relativamente rápido y en tres días (tiempo de generación del *C. elegans*) podemos conocer el resultado. Los grupos de Julie Ahringer y Tomy Iman, de manera independiente, han llevado a cabo un análisis sistemático de RNAi y han apagado la expresión de 4590 genes que se encuentran en los cromosoma I y III, respectivamente [7, 8]. Estos estudios se han realizado en gran escala gracias a otra ventaja del *C. elegans*. El ARN de

doble cadena también puede ser producido dentro de una bacteria, que es lo que come *C. elegans*, así que si los animales son alimentados con bacterias que están produciendo ARN de doble cadena, el efecto de RNAi puede ser también observado. Actualmente existen bibliotecas de bacterias que producen ARN de doble cadena de todos y cada uno de los genes del *C. elegans*, de tal suerte que podemos buscar un fenotipo específico usando esta herramienta. Más grupos en el mundo están actualmente llevando a cabo ensayos de este estilo, con la idea de apagar la expresión de todos los genes del *C. elegans* y estudiar su fenotipo.

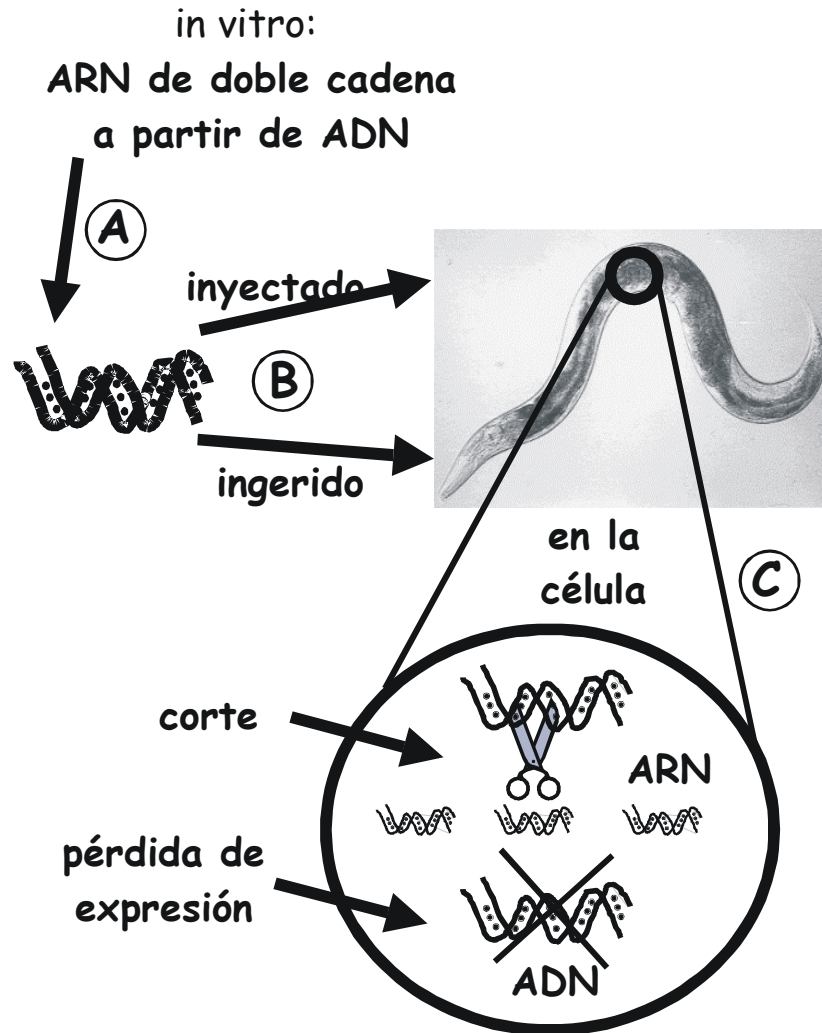


Figura 5. Interferencia de RNA (RNAi). La introducción de RNA de cadena doble al *C. elegans* provoca la pérdida específica y de manera transitoria. A) Hibridación tipo Northern Blot, B) Hibridación tipo *in situ* y C) Fusión con la proteína verde fluorescente.

Expresión genética

Para estudiar la expresión de un gen se pueden utilizar el método clásico de hibridación tipo Northern Blot (Figura 6A), en donde se extrae ARN del individuo y se visualiza en un gel usando una sonda radioactiva. Otra técnica se conoce como hibridación *in situ* (Figura 6B) y consiste en fijar la muestra y utilizar una sonda marcada con un colorante para revelar la localización del ARN en el organismo. En Japón, en el laboratorio de Dr. Yuji Kohara, se ha utilizado la técnica de hibridación *in situ* y actualmente se conoce el patrón de expresión de cerca de 500 genes y esa información está disponible para todo el público.

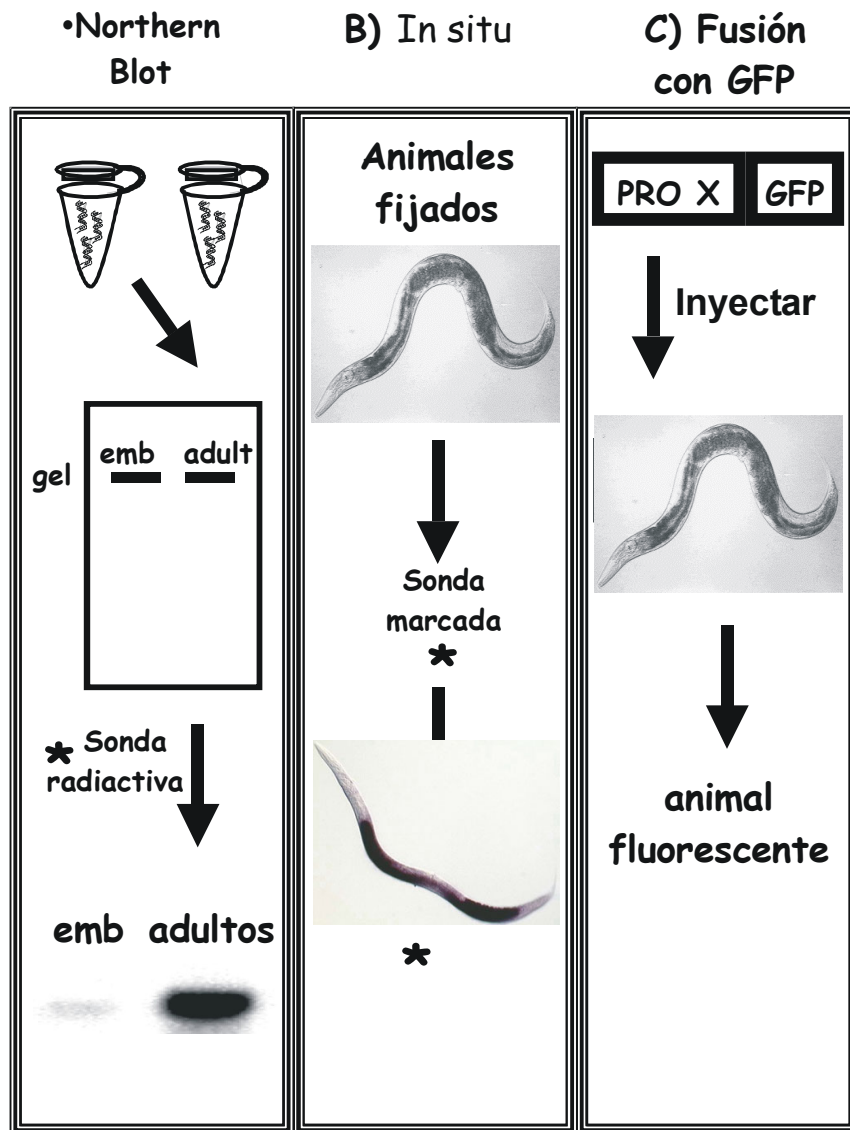


Figura 6. Estudios de expresión genética. Para estudiar la expresión de un gen se puede realizar cualquiera de las siguientes técnicas. A) Hibridación tipo Northern Blot. B) Hibridación *in situ* y C) Fusiones con una proteína reportera.

Recientemente, se ha incorporado una nueva técnica en la que se puede observar la localización de una proteína en un animal vivo. Esto se hace por medio de introducir en el animal la fusión de la proteína de interés con otra proteína, esta última proveniente de medusas de mar, que emite una fluorescencia de color verde (Figura 6C).

Para saber qué genes se expresan en un tejido particular o en una condición metabólica especial, se pueden utilizar microarreglos de ADN (Figura 7). (En este volumen se puede revisar un artículo que trata a profundidad el tema de los microarreglos de DNA, escrito por J. Ramírez y cols). Gracias a que conocemos la secuencia genómica del *C. elegans* se pueden poner todos los genes del organismo en una laminilla especial y arreglados de tal forma que sabemos la identidad de cada uno de ellos (Figura 7A). Esta laminilla es incubada con una muestra de ADN complementario (ARN que fue transferido a su secuencia correspondiente de ADN en el laboratorio) proveniente de la condición que deseamos conocer (Figura 7B) y por medio del análisis computacional de la fluorescencia asociada a la expresión de los genes podemos saber qué genes se expresan en ese tejido o condición fisiológica (Figura 7C). Los microarreglos han sido utilizados de una manera exitosa y un ejemplo de ello es que se ha encontrado que 2171 genes del *C. elegans* son los responsables de las diferencias entre un animal hermafrodita y un macho [9]. En otro estudio se observó que cerca de 1416 genes son necesarios para formar la gónada de este organismo, de los cuáles 650 se utilizan para formar a los espermatozoides y 250 se especializan en formar ovocitos [10]. Actualmente se estima que en el mundo se están llevando a cabo cerca de mil ensayos de microarreglos que incluyen estudios de genes involucrados con el envejecimiento, el desarrollo neuronal, la formación y funcionamiento del músculo, etc.

Interacciones entre proteínas

Para estudiar interacciones entre cualquier proteína se puede utilizar el sistema de “Dos híbridos” (Figura 8). Este método se basa en las propiedades de la proteína Gal4 de levadura. Una parte de esta proteína se activa en respuesta a condiciones especiales y permite que la otra parte de ella pueda unirse a una secuencia específica de ADN. Para realizar el ensayo, el gen Gal4 se divide en dos pedazos, la parte que codifica para la activación de Gal4 se fusiona a la proteína de interés, mientras que la parte de unión a ADN se fusiona a una biblioteca de genes que codifican para todas las proteínas del gusano (Figura 8A). Estas dos fusiones se transforman en las levaduras y se espera que cuando la proteína de interés se una a otra proteína, la secuencia de Gal4 sea “reconstituida” y ahora pueda hacer su función (Figura 8B). Gal4 “reconstituida” activa la expresión de un gen reportero que tiñe de azul a las levaduras y de esta forma podemos identificar interacciones entre la proteína de interés y una proteína desconocida. Una vez identificada una interacción positiva, la fusión se extrae de la levadura para determinar su identidad. Con el uso de este método se pueden aislar proteínas que funcionan en la misma vía del gen de interés y esto nos ayuda a conocer la función del mismo. Actualmente el grupo de Marc Vidal en Boston, EUA, está descifrando la interacción de todas y cada una de las proteínas del *C. elegans* utilizando esta técnica

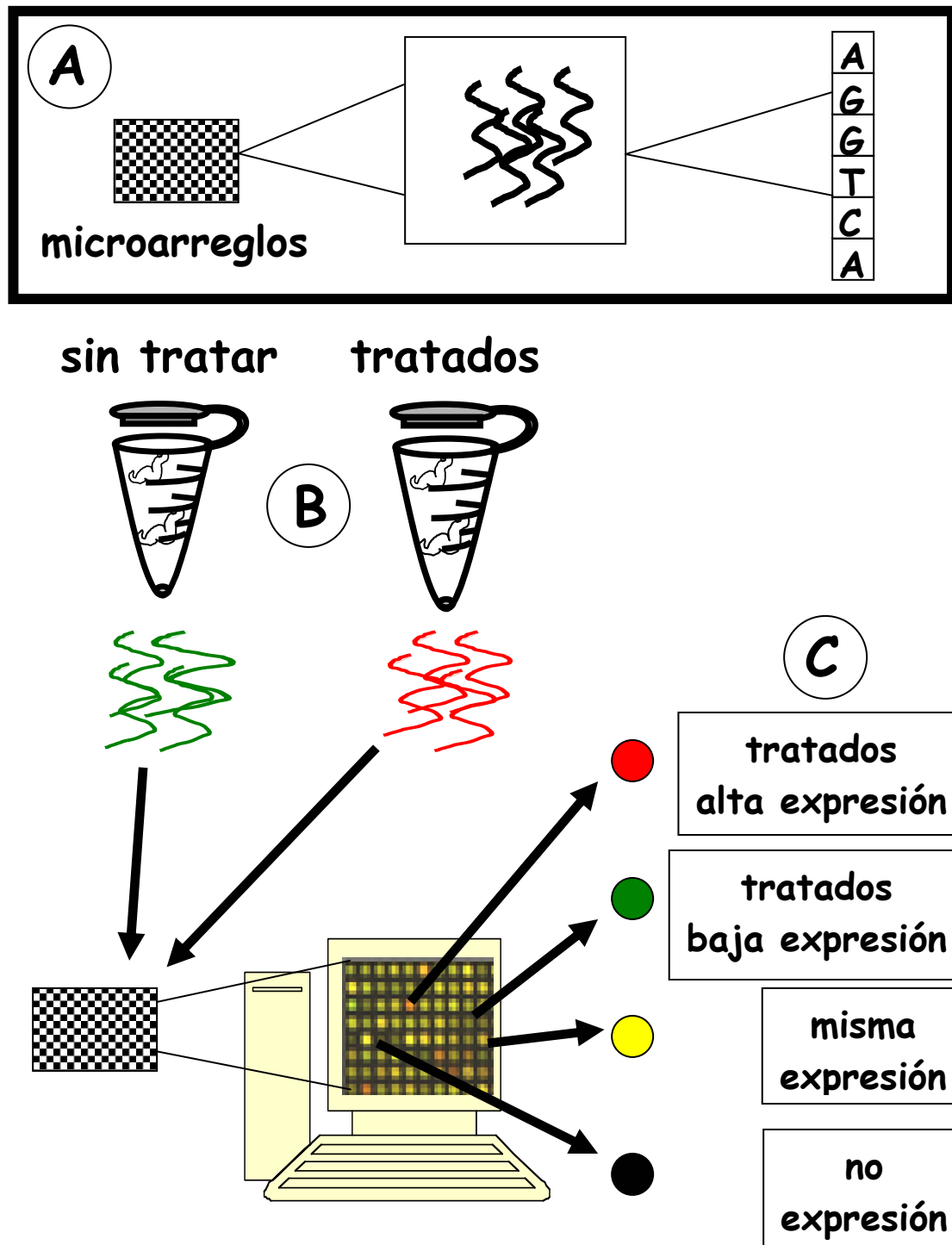


Figura 7. Microarreglos de ADN. Otra forma de estudiar la expresión genética es haciendo microarreglos de ADN. En A se muestra como se coloca el ADN en una laminilla. En B se trata una población de animales y un control que se utilizan para hacer la hibridación del ADN adherido a la laminilla y los resultados se observan por fluorescencia (C).

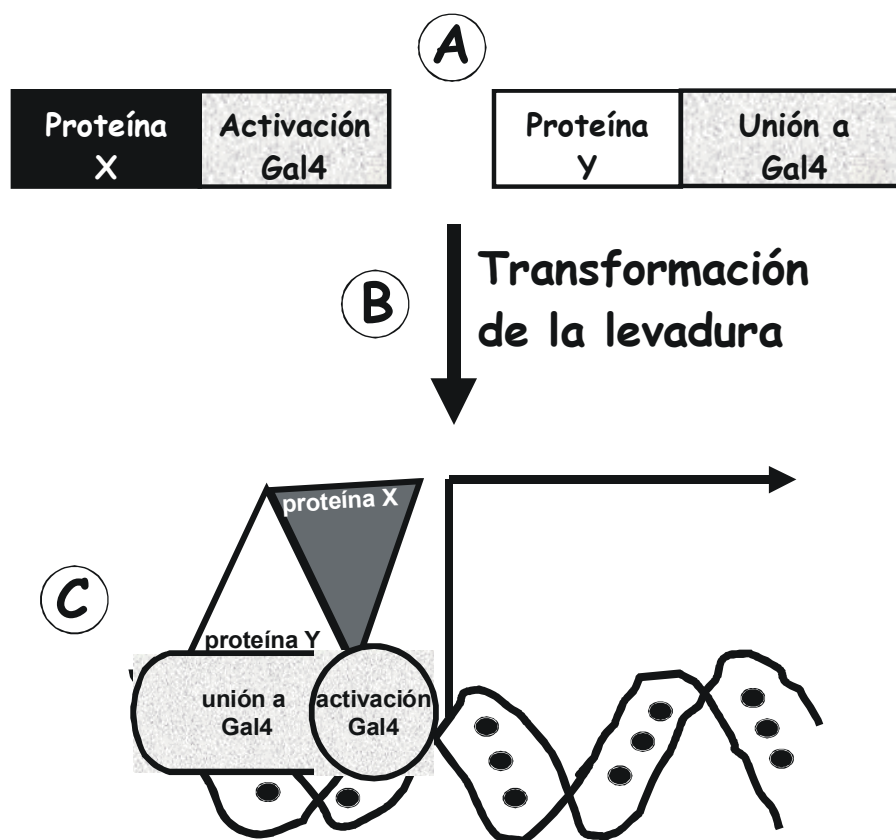


Figura 8. Interacción entre proteínas. La proteína de interés se une al dominio de activación de Gal4 de levadura mientras que una biblioteca de DNA complementario se fusiona al dominio de unión a ADN de Gal4 (A). Estas fusiones se transforman en levadura (B) y cuando la proteína de interés se une a una proteína desconocida, la proteína Gal4 es reconstituida y se activa la transcripción de un gen reportero que nos permite visualizar esta interacción.

Referencias

1. Wood, W.B.a.t.c.o.C.e.r., *The nematode Caerhabditis elegans*, ed. W.B. Wood. 1988, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 667 p.
2. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
3. Sulston, J.E. and H.R. Horvitz, *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1977. **56**(1): p. 110-56.
4. Sulston, J.E., et al., *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 1983. **100**(1): p. 64-119.
5. Hedgecock, E.M., J.E. Sulston, and J.N. Thomson, *Mutations affecting programmed cell deaths in the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1983. **220**(4603): p. 1277-9.
6. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
7. Gonczy, P., et al., *Functional genomic analysis of cell division in C. elegans using RNAi of genes on chromosome III*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 331-6.

8. Fraser, A.G., et al., *Functional genomic analysis of C. elegans chromosome I by systematic RNA interference*. Nature, 2000. **408**(6810): p. 325-30.
9. Jiang, M., et al., *Genome-wide analysis of developmental and sex-regulated gene expression profiles in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 218-23.
10. Kim, S.K., [Http://C.elegans](http://C.elegans): mining the functional genomic landscape. Nat Rev Genet, 2001. **2**(9): p. 681-9.
11. Walhout, A.J., et al., *Protein interaction mapping in C. elegans using proteins involved in vulval development*. Science, 2000. **287**(5450): p. 116-22.

Semblanza de la Dra. Rosa Navarro González.



Bióloga por la Facultad de Ciencias (1995) y Doctora en Ciencias Bioquímicas por la Facultad de Química de la UNAM (1998). Realizó Estudios Postdoctorales en la escuela de Medicina de Harvard en donde adquirió experiencia en la línea germinal del nemátodo *C. elegans* (1998-2002). Desde el 2002 es Investigadora Asociada "C" en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.