

**COMPARACIÓN DE LAS COLORACIONES NILE-RED Y SUDÁN III PARA LÍPIDOS  
EN *Caenorhabditis elegans***

**ALEJANDRA GARNICA GUZMÁN**

**ANGELA KATERINE CASTAÑEDA PARRA**

**JENNY KATHERIN ROMERO MARTÍNEZ**

Trabajo de grado para optar el título de Citohistotecnología

Directoras

Marcela Gómez Garzón

Jeannette León Enciso



Fundación Universitaria  
de Ciencias de la Salud  
**FUCS**

Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud

Facultad Citohistología

2021

## TABLA DE CONTENIDO

<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>4</b>
2.1 Caenorhabditis elegans .....	4
2.2 Lípidos .....	6
2.3 Metabolismo de lípidos en C. elegans.....	7
2.4 Coloraciones para lípidos .....	9
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>12</b>
4.1 Cultivos de Caenorhabditis elegans .....	12
4.2 Sincronización de cultivos de Caenorhabditis elegans .....	12
4.3 Preparación Nile-Red.....	13
4.4 Preparación Sudan III .....	13
4.5 Protocolos de coloraciones para lípidos.....	14
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>
<b>6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>24</b>
<b>8. ANEXO 1</b> .....	<b>26</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los tejidos, sobre todo los de los animales, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas con el microscopio óptico. Esto se consigue con el uso de los colorantes, sustancias coloreadas que son capaces de unirse de manera más o menos específica a estructuras del tejido aportándoles color. Se utilizan normalmente para teñir a las células y componentes tisulares que van a ser observados con el microscopio óptico y por ello, se realizan habitualmente sobre secciones de tejido, siendo las más utilizadas las secciones obtenidas a partir de inclusiones en parafina u obtenidas en el criostato. Los colorantes son los elementos principales de las tinciones generales.

Trabajamos con un parásito muy pequeño que fue aislado en la tierra de Algeria por el zoólogo francés Emile Maupas en 1900. Su nombre *Caenorhabditis elegans* es una mezcla del griego “Caeno” que significa nuevo-reciente, y “rhabditis” que significa bastón y del latín “elegans” que quiere decir elegante. Como su pronunciación es algo complicada lo llamaremos en forma abreviada “*C. elegans*”<sup>1</sup>.

*C. elegans* posee una serie de características que lo hacen útil y exitoso como modelo invertebrado para la investigación biológica, algunas de estas particularidades son: su genoma bien caracterizado; la facilidad de mantenimiento; un cuerpo pequeño, la posibilidad de mantener en condiciones de laboratorio con una dieta de *Escherichia coli*, lo que resulta ser bastante económico y fácil; adicional a su corto ciclo de vida 3 días<sup>2</sup>.

El presente estudio uso dos tipos de coloraciones para diferenciar tipos de lípidos, Sudam III y Nile-Red, con el fin de ser utilizadas en trabajos de la línea de modelos invertebrados. Como estudiantes del semillero SIMIC presentamos el trabajo sin resultados en la categoría Poster en el VI Encuentro Nacional de Semilleros de Investigación de la FUCS.

## 2. MARCO TEÓRICO

*Caenorhabditis elegans* es un modelo invertebrado clave para los investigadores interesados en estudiar sistemas vivos. *C. elegans* es un parásito redondo de 1 mm de largo, es uno de los más populares en casi todas las áreas de la biología moderna. Algunas de las características que lo hacen atractivo para la biología: es pequeño, transparente y genéticamente manejable. A pesar de su simplicidad, *C. elegans* presenta fenotipos complejos asociados con la multicelularidad: el parásito tiene células y órganos diferenciados, envejece y tiene una vida útil bien definida, y es capaz de aprender y recordar <sup>3</sup>.

Las enfermedades que afectan el metabolismo de los carbohidratos y lípidos provocan a largo plazo problemas en órganos esenciales y afectan la calidad de vida. Al buscar nuevos tratamientos para estas enfermedades se requiere contar con modelos experimentales como *Caenorhabditis elegans*, modelo que permite evaluar diferentes enfermedades gracias a la homología de sus genes con los humanos <sup>4</sup>.

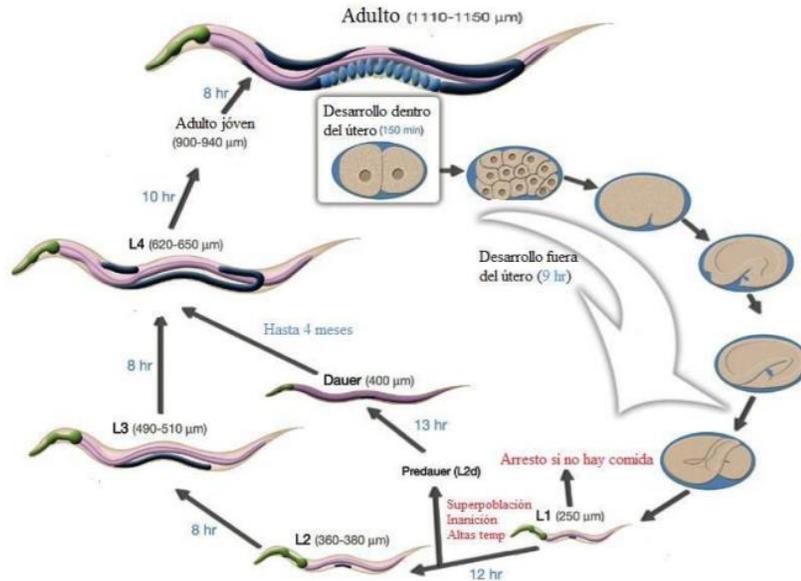
### 2.1 *Caenorhabditis elegans*

Es un parásito que hace parte del filo Nematoda, presenta un tamaño pequeño y crece hasta 1mm de longitud, suele vivir en vegetación que se encuentra en descomposición y se alimenta de microbios como las bacterias <sup>1</sup>.

La primera vez que se utilizó este nematodo fue para estudios de desarrollo y comportamiento por Sydney Brenner en 1974, sus descubrimientos le hizo ganar el premio nobel de fisiología y medicina. A partir de ese momento, *C. elegans* ha sido modelo para estudiar diferentes procesos biológicos permitiendo a los investigadores de diferentes campos entender las enfermedades humanas <sup>2</sup>.

Su ciclo de vida consiste en 4 fases larvianas: L1, L2, L3, L4 y adultos. Cada etapa tiene patrones específicos de división celular y diferenciación celular (Figura 1). El desarrollo embrionario puede producirse en 14 horas y el postembrionario en unas 43 horas. Así mismo, existen factores que influyen en el crecimiento del nematodo como la temperatura, las condiciones del medio pues si hay ausencia de alimento se forma un

estadio intermedio L2d (dauer) que detiene su desarrollo dejando de alimentarse y puede permanecer en esa condición unos 4 meses; Si las condiciones son favorables otra vez, la larva puede seguir con su desarrollo <sup>3</sup>.



**Figura 1** Ciclo de vida de un hermafrodita a 22 °C. Imagen tomada de WormAtlas ([www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org))

La población del parásito está dominada por hermafroditas auto fecundados (XX) con una rara aparición de machos (X0), que tienen una morfología distinta. Tiene 5 pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales. Para que se dé un hermafrodita, el sexto par de cromosomas debe ser (XX), mientras que, si es X0, se genera un macho. El tamaño entre ambos sexos es similar, con una estructura simétrica, cuerpo tubular, una anatomía conformada por boca, faringe, intestino, gónadas, cutícula de colágeno, orificio bucal en el extremo anterior de la cabeza (Figura 2).

El intestino relativamente simple de *Caenorhabditis elegans* cumple muchas de las funciones complejas del tracto digestivo, el hígado y los tejidos grasos de los mamíferos, al mismo tiempo que desempeña funciones en la defensa, la inmunidad y la longevidad de los patógenos. El intestino es responsable de la digestión y asimilación de los alimentos, así como de la síntesis y el almacenamiento de macromoléculas. Además, el intestino se perfila como un potente sistema experimental para estudiar fenómenos

biológicos universales como el tráfico vesicular, los relojes bioquímicos, las respuestas al estrés y el envejecimiento <sup>4</sup>.

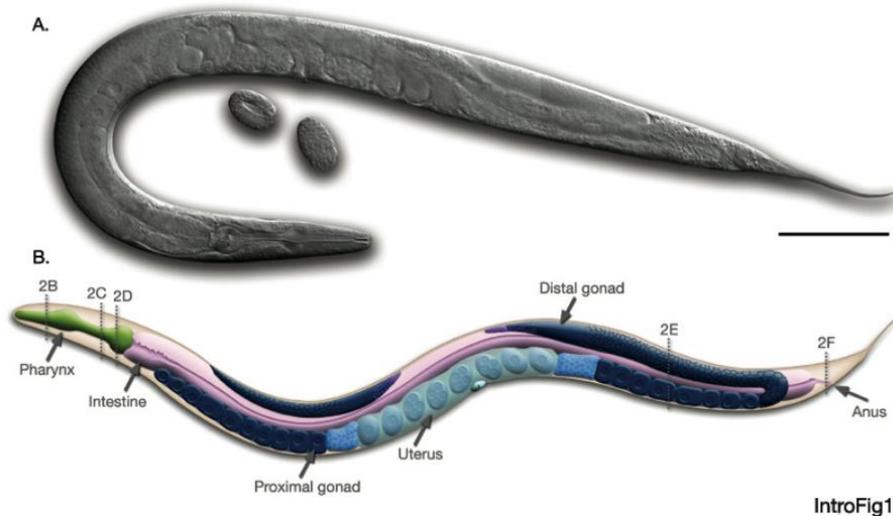


Figura 2 Anatomía *C. elegans*. Imagen tomada de: <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/psicologia-y-neurociencia/30/posts/de-gusanos-y-clulas-madre-entrevista-con-michalis-barkoulas-13296>

Las razones por la que *C. elegans* se utiliza como modelo invertebrado son las características de cultivo económico y fácil manipulación; su anatomía simple, con cuerpo transparente que facilita la coloración y visualización por medio de un microscopio. Además, su genoma ha sido completamente secuenciado, llegando a la conclusión de que posee un 60% de genes homólogos con el genoma humano, lo cual lo convierte en un excelente modelo para estudiar distintas enfermedades <sup>5,6</sup>.

## 2.2 Lípidos

Los lípidos son pequeñas moléculas orgánicas que son insolubles en agua, pero son solubles en solventes orgánicos. Bioquímicamente, se originan total o parcialmente a partir de condensaciones de tioésteres a base de carbaniones (átomo de carbono trivalente con una carga negativa), que forman ácidos grasos, que son componentes de triacilgliceroles (TAG), fosfolípidos y esfingolípidos; o por condensación a base de carbocatines (átomo de carbono cargado positivamente) de unidades de isopreno, formando derivados isoprenol incluyendo esteroides <sup>7</sup>.

El metabolismo de los lípidos y carbohidratos se ha disparado en los últimos años debido a los casos de obesidad humana y las epidemias de diabetes. Los lípidos, las proteínas y los carbohidratos, se adquieren en la dieta habitual de los seres vivos y se absorben en los procesos digestivos, especialmente en el intestino, se procesan en el organismo como macronutrientes precursores vitales necesarios para construir material celular para el crecimiento y la reproducción, aunque la sobrenutrición conduce a una variedad de enfermedades modernas en los seres humanos<sup>8</sup>.

Además de ser los componentes principales de las membranas celulares, son fundamentales para el almacenamiento de la energía y actúan como mensajeros secundarios, entre otros. En el metabolismo lipídico, existen algunas alteraciones que conducen a enfermedades como obesidad y diabetes tipo II, este tipo de enfermedades son de importancia en la salud pública y pueden ser estudiadas con ayuda del nematodo. *Caenorhabditis elegans* que permite estudiar el metabolismo de los lípidos porque tiene el potencial de sintetizar miles de especies de lípidos distintas, muchas de las cuales aún no se han caracterizado<sup>8</sup>.

### **2.3 Metabolismo de lípidos en *C. elegans***

La alimentación de *C. elegans* depende de la acción de la faringe, un bombeo neuromuscular que une la boca al intestino. La faringe es una bomba tubular responsable de succionar bacterias hacia dentro del gusano, concentrándose, moviéndolas y transportándose hasta el intestino. Esto se logra a través de una combinación de dos movimientos, bombeo y peristaltismo del istmo<sup>5</sup>.

El bombeo es un ciclo de contracción y relajación que aspira líquido del ambiente circundante junto con las partículas en suspensión, luego expulsa el líquido atrapando las partículas, el músculo faríngeo es capaz de bombear sin la participación del sistema nervioso, pero durante la alimentación rápida normal su tiempo es controlado por dos tipos de motoneuronas faríngeas. La peristalsis del istmo, una onda en movimiento posterior de la contracción del músculo del istmo posterior, depende de un tercer tipo de neurona motora<sup>6</sup>.

Estos cambios son predecesores de los ajustes metabólicos encaminados a favorecer la conservación y eficiencia energética que tienen lugar en mamíferos sometidos a restricción calórica. Por esta razón, *C. elegans* constituye un buen modelo para estudios relacionados con estrés oxidativo, metabolismo calórico y longevidad, particularmente útil en estudios sobre envejecimiento.

En 2013, Zang y col. construyeron una base de datos que contenía 471 genes de lípidos del genoma de *C. elegans* y asignaron la mayoría de los genes de lípidos a 16 rutas metabólicas de lípidos diferentes que se integraron en una red. Más del 70% de los genes de lípidos de *C. elegans* tienen ortólogos humanos, con 237 de los 471 genes de lípidos de *C. elegans* conservados en humanos, ratones, ratas y *Drosophila*. Encontraron que 71 genes están relacionados específicamente con enfermedades metabólicas humanas. Además, se utilizó interferencia mediada por ARN (ARNi) para interrumpir la expresión de 356 de 471 genes de lípidos con clones de ARNi disponibles. Concluyeron que 21 genes afectan fuertemente el almacenamiento, el desarrollo, la reproducción y otros fenotipos visibles de grasa, 6 de los cuales no han estado implicados previamente en la regulación del metabolismo de las grasas y otros fenotipos <sup>9</sup>.

El metabolismo de los lípidos en *C. elegans* está regulado en respuesta a factores ambientales, como la temperatura y la disponibilidad de alimentos, así como por el estado fisiológico, incluido el desarrollo, la reproducción y el envejecimiento. La acumulación de grasa se altera dependiendo de la cepa bacteriana utilizada en cultivo, la disponibilidad de alimentos, temperatura, hierro y varios tratamientos dietéticos, tales como la administración de suplementos de extractos derivados de plantas <sup>5</sup>.

Las vías metabólicas del metabolismo de lípidos y carbohidratos están bien conservadas en todo el reino animal. *C. elegans* también posee vías que son raras en los animales, pero comunes en las plantas, como la capacidad de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados en ausencia de ácidos grasos esenciales en la dieta y la síntesis de maradolípidos para protegerlos de la desecación. Como en otros animales, las vías del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos convergen, porque los animales tienen una capacidad limitada para almacenar carbohidratos de la dieta y, por lo tanto, los carbonos de los carbohidratos de la dieta se convierten en acetil-CoA, donde pueden desviarse hacia la síntesis de ácidos grasos <sup>7</sup>.

Los ácidos grasos acumulados pueden ser visualizados por microscopia óptica y electrónica en *C. elegans*<sup>10</sup>.

## **2.4 Coloraciones para lípidos**

Los lípidos no se colorean fácilmente, ya que la mayoría de los colorantes son polares. Existen una serie de colorantes específicos para los lípidos, como el Sudán III, el Sudán IV, Nile-Red, rojo aceite O y el Sudán Negro B, que tienen utilidad para técnicas microscópicas citológicas, histológicas y anatomopatológicas <sup>11</sup>.

Sudán IV ( $C_{24}H_{20}N_4O$ ) es un diazo colorante soluble en grasas. Se utilizar para la tinción de los lípidos, triglicéridos y lipoproteínas en secciones parafinadas. La tinción es una técnica bioquímica importante, que ofrece la capacidad de calificar visualmente la presencia del compuesto graso de interés sin aislarlo. No reacciona con hidratos de carbono o proteínas. En presencia de un lípido o grasa, el Sudán IV cambiará su color a rojo.

Sudan III, este se utiliza para identificar grasas mediante la tinción de triglicéridos y otros tipos de lípidos. Es un colorante que no presenta afinidad por estructuras ácidas o básicas y es insoluble en agua. Al ser de color rojo, tiñe las grasas de color rojo anaranjado. También, se emplea para detectar las cadenas de hidrocarburos de los lípidos. Es no polar y forma interacciones hidrofóbicas con las cadenas de hidrocarburos de los lípidos.

Nile-Red es una coloración lipofílica, es decir, que tiene afinidad por los lípidos donde se acumula en los glóbulos lipídicos y los colorea de rojo. Esta coloración puede utilizarse en células vivas. Es utilizado para teñir lípidos neutros como los triglicéridos o ésteres de colesterol ya que cuenta con un color fuerte. El Nile-Red tiñe de amarillo las gotitas de lípidos intracelulares. En la mayoría de los solventes polares, el Red-Nile no emitirá fluorescencia; sin embargo, cuando se encuentra en un ambiente rico en lípidos, puede ser intensamente fluorescente, con colores que varían desde el rojo intenso hasta una fuerte emisión de oro amarillo. Tiene una máxima excitación y emisión de 450-500 nm.

Oil Red O se utiliza para la detección de grasas neutras o gránulos de polietileno, es un colorante lipófilo que, debido a su comportamiento de solución, difunde hacia los lípidos del tejido.

### 3. OBJETIVOS

#### GENERAL

Seleccionar la mejor coloración para lípidos en *Caenorhabditis elegans* entre las coloraciones Sudán III y Nile-Red.

#### ESPECÍFICOS

1. Determinar protocolo para las coloraciones Sudán III y Nile-Red en larvas de *C. elegans*.
2. Establecer diferencias entre las coloraciones Sudán III y Nile-red al colorear lípidos en larvas de *C. elegans*.

## 4. METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo experimental, no aleatorio. Se entiende como experimental al estudio donde como investigadoras designamos el factor a estudiar, en este caso las coloraciones Sudan III y Nile-Red para poder distinguir los lípidos en el *Caenorhabditis elegans*.

### **4.1 Cultivos de *Caenorhabditis elegans***

Se utilizó la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* adquirida en Caenorhabditis Genetics Center de la Universidad de Minnesota, USA. Y se alimentó con la cepa *Escherichia coli* OP50 donada por Grupo de Biotecnología y Genética, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Para el mantenimiento y crecimiento de los cultivos, en cajas de Petri de 60 x 15 mm se colocaron 10 ml de medio NGM. Las placas se llevaron a 4 ° C hasta su uso. Dos días antes del uso, las placas se llevan a temperatura ambiente y se colocó 50 µl de cultivo líquido de la bacteria *E. coli* OP50 en el centro de las placas y se dejó crecer durante 24H a 37°C. Se revisó bajo microscopio la caja original con *C. elegans*, y se marcó de donde hacer los cortes con cuchilla estéril. El sector cortado se colocó sobre una placa NGM + *E. coli* OP50 y se verificó al microscopio que los parásitos se movían en busca de *E. coli* OP50. Se incubaron a temperatura ambiente.

### **4.2 Sincronización de cultivos de *Caenorhabditis elegans***

1. Se lavó la pipeta con alcohol y después con agua.
2. Se colocaron 7 ml de H<sub>2</sub>O en cada caja crecida con *C. elegans*. Luego, se empezó a mover suavemente la caja y se recogió el líquido con pipeta en el tubo de 15ml. Repetir el paso.
3. Se centrifugó el tubo 1200 rpm por 1 min.
4. Se descartó el líquido y dejó solo 1 ml. Se re suspendió y se adicionó 13ml de H<sub>2</sub>O y se centrifugó.

5. Se dejó 3,5ml y se re suspendió.
6. Se adicionó 0,5 ml KOH 5 M y 1ml NaOCl.
7. Se tapó y mezcló fuerte durante 6 min para liberar los huevos de los parásitos
8. Se adicionó H<sub>2</sub>O hasta 15 ml, mezcló y centrifugó 1200rpm por 2 min.
9. Se dejó 1 ml y se mezcló. Luego, se centrifugó sin adicionar nada
10. Se retiró el líquido hasta dejar solo el botón de huevos
11. Se adiciono con la pipeta automática y la punta recortada 4 ml de Buffer M9
12. Se mezcló suave con la pipeta, subiendo y bajando el líquido, para mezclar los huevos.
13. Se adicionó todo el líquido a la superficie de un agar LB limpio (sin *E. coli*), mezclar la caja para que se dispersen los huevos, revisar al microscopio.
14. Se dejó toda la noche a 20°C. Se lavó con M9 y se transfiere a otra placa con *E. coli* OP50. Las larvas recibirán el nombre de N2.
15. También se realizó transferencia de huevos a placas de NGM enriquecidas con Glucosa y sembradas con *E. coli* OP50. Las larvas recibirán el nombre de N2+glucosa.

#### **4.3 Preparación Nile-Red**

Se preparó 100ml de solución de stock <sup>11</sup>:

1. Se midió 100 ml de isopropanol y se pasó al vaso precipitado.
2. Se pesó 0.5 g de Nile Blue A y se agregó al isopropanol.
3. Se mezcló y se envasó en un frasco ámbar.
4. Se marcó el frasco con el nombre de la preparación y la fecha del día en el que se preparó.

#### **4.4 Preparación Sudan III**

Para la solución de trabajo se preparó 50 ml <sup>11</sup>:

1. Se midió con la probeta 50 ml de alcohol etílico de 70° y se pasó al vaso de precipitado.
2. Se pesó 0,5 g de Sudán III y se agregó al vaso con el alcohol.

3. Se calentó en la plancha hasta que se disolució del Sudan III.
4. Se dejó enfriar la solución y se filtró.
5. Se anotó en el frasco con un rotulador permanente el nombre del producto y la fecha de preparación.

#### ***4.5 Protocolos de coloraciones para lípidos***

Al llegar al estadio larvario de L4, aproximadamente 6 días, se tomaron larvas N2 y N2+Glucosa para realizar cada coloración. Realizamos una revisión de artículos y tesis en que han empleado estas coloraciones para *C. elegans* y llegamos a los siguientes protocolos <sup>10,12-15</sup>:

##### ***NILE-RED***

1. Se lavaron los parásitos PBS 1000 micro/L. Y centrifugó 4000 rpm
2. Se descartó el sobrenadante.

##### ***FIJACIÓN***

3. Se adicionó 600  $\mu$ L isopropanol. Y se agitó 30 min.
4. Se centrifugó 4000 rpm 1 min.
5. Se lavaron los parásitos PBS 1000  $\mu$ L. Y se centrifugó a 4000 rpm.

##### ***COLORACIÓN***

6. Luego, se adicionó 600  $\mu$ L Nile red. Y se agitó 1 hora cubierto con papel metálico.
7. Se lavaron los parásitos PBS 1000 micro. Y nuevamente se centrifugó a 40000 rpm.
8. Se observó bajo fluorescencia a 450 nm.
9. Fotográfico.

## **SUDAN III**

1. Se lavaron los parásitos PBS 1000  $\mu$ L. Y se centrifugó a 4000rpm
2. Se descartó sobrenadante.

### *FIJACIÓN*

3. Se adicionó 600  $\mu$ L de isopropanol y se agitó 30 min.
4. Se centrifugó 4000rpm por 1 min.
5. Se lavaron los parásitos PBS 1000  $\mu$ L. Y se centrifugó a 4000rpm.

### *COLORACIÓN*

6. Se adicionó 600  $\mu$ L Sudan III. Se agitó 1 hora cubierto con papel metálico.
7. Nuevamente, se lavaron los parásitos PBS 1000  $\mu$ L. Y se centrifugaron a 4000rpm.
8. Campo claro
9. Fotográfico.

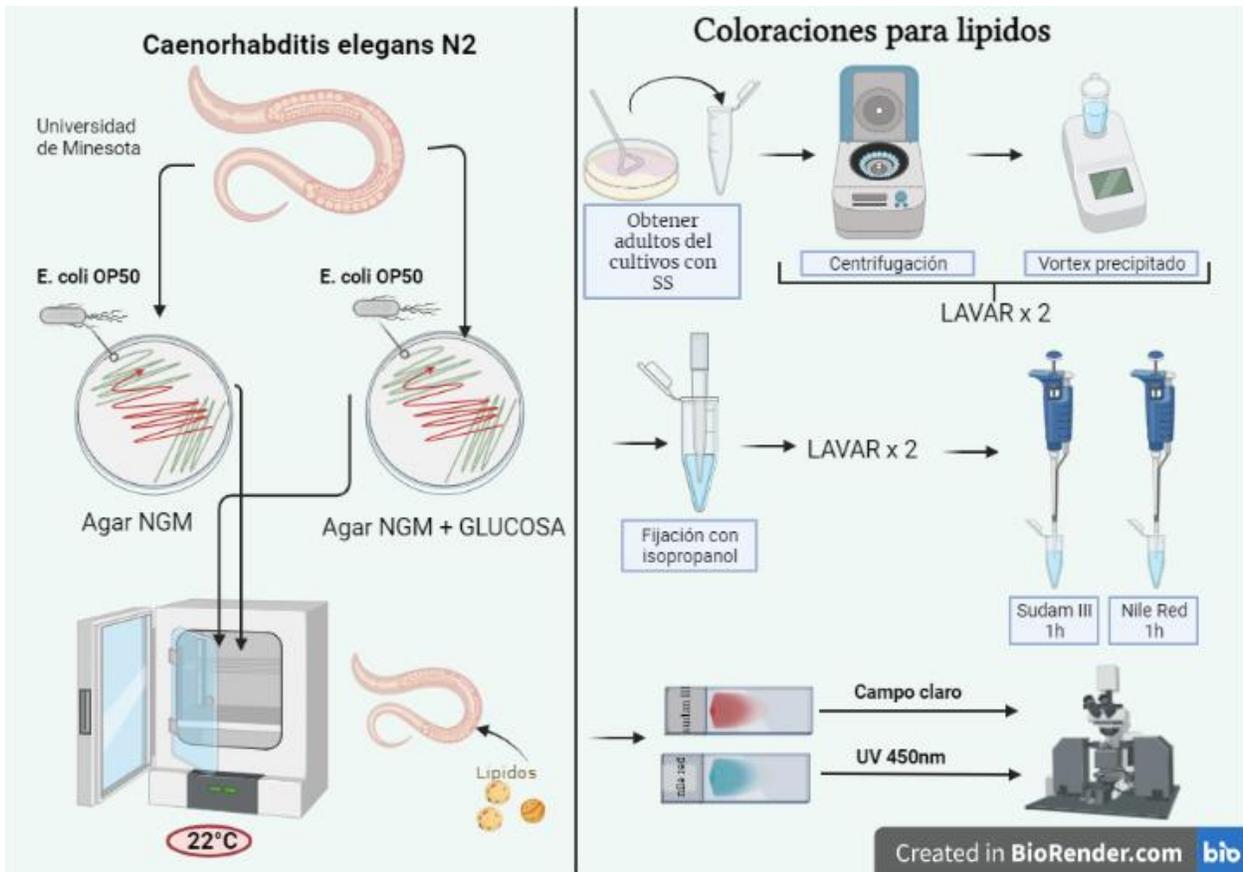


Figura 3 Explicación de forma gráfica de los procesos que se realizaron en el trabajo. Autoras

## 5 RESULTADOS

Se realizaron los cultivo y mantenimientos de *C. elegans* cepa N2 en medio NGM + *E. coli* OP50 (Figura 4) y de *C. elegans* cepa N2 en medio NGM enriquecido con glucosa + *E. coli* OP50



Figura 4 Crecimiento de *C. elegans* cepa N2 en agar NGM + *E. coli* OP50.

Al microscopio se revisó la presencia y movimiento de las larvas en las cajas de agar, se observaron los parásitos en el agar NGM y NGM+Glucosa (figura 5)

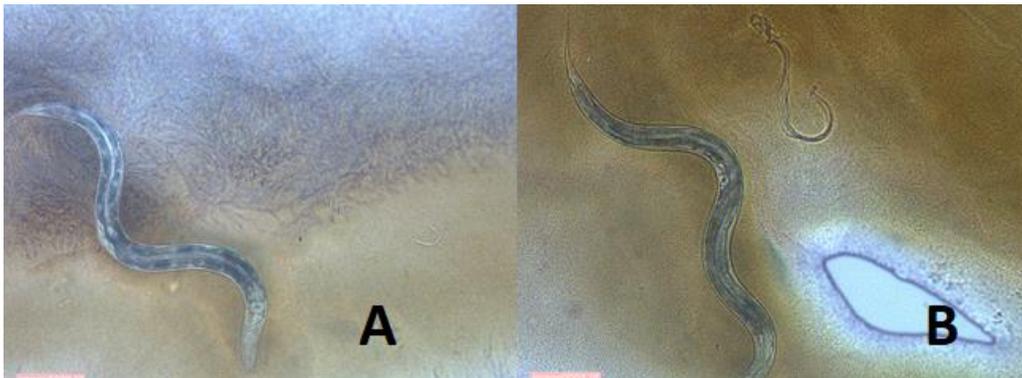


Figura 5 Larvas bajo 40X de *C. elegans* cepa N2 A. en agar NGM. B. en agar NGM + glucosa

Se realizó la sincronización de *C. elegans* y se obtuvieron larvas y se revisaron en solución salina para comparar el crecimiento en medio NGM y NGM+Glucosa (Figura 6) para realizar las coloraciones Sudam III y Nile-Red (figura 7)



Figura 6 *C. elegans* cepa N2 en solución salina 20X. A. Crecida en agar NGM+Glucosa con *E. coli* OP50. B. Crecida en agar NGM con *E. coli* OP50



Figura 7 Procedimiento de las coloraciones para lípidos. A. Fijación de larvas. B. Lavado de larvas por centrifugación. C. Resuspensión de larvas por vortex. D. Adición de colorante Sudam III. E. Adición de colorante Nile-Red. F Incubación con colorantes protegidos de la luz.

Se realizó registro fotográfico para coloración Sudam III, bajo campo claro, observando zonas de color naranja intenso, correspondiente a lípidos acumulados (figura 8 y 9)

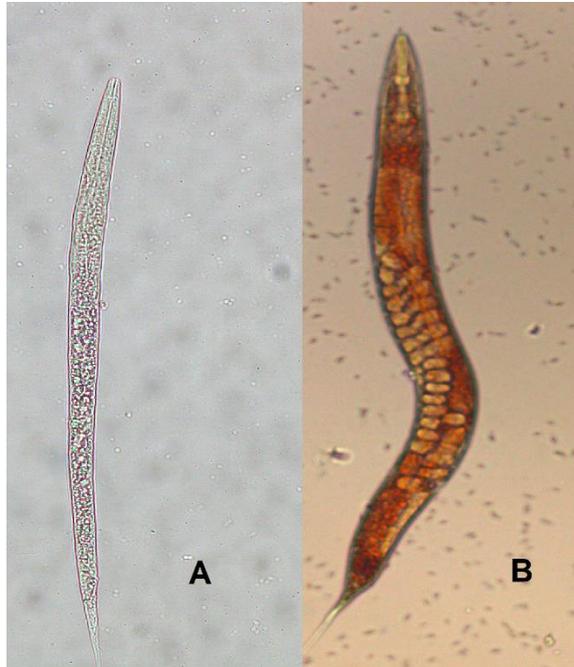


Figura 8 *Caenorhabditis elegans* con colorante Sudán III a 20X. A. Larva crecida en agar NGM y *E. coli* OP50 B. Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50

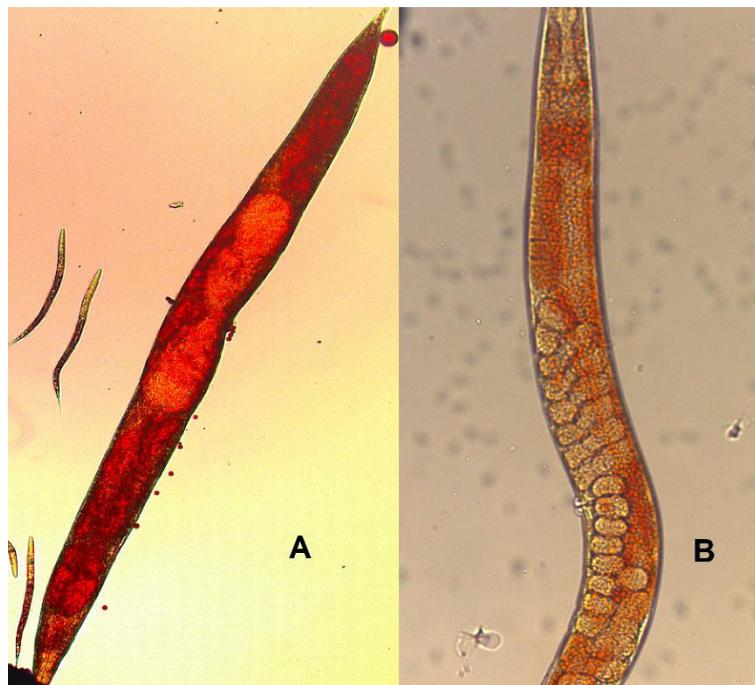


Figura 9 *Caenorhabditis elegans* con colorante Sudán III. A Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50 a 20X B. Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50 A 40X

Se realizó registro fotográfico para coloración Nile-Red, los lípidos acumulados se observaron de un color amarillo intenso (figura 10 y 11)

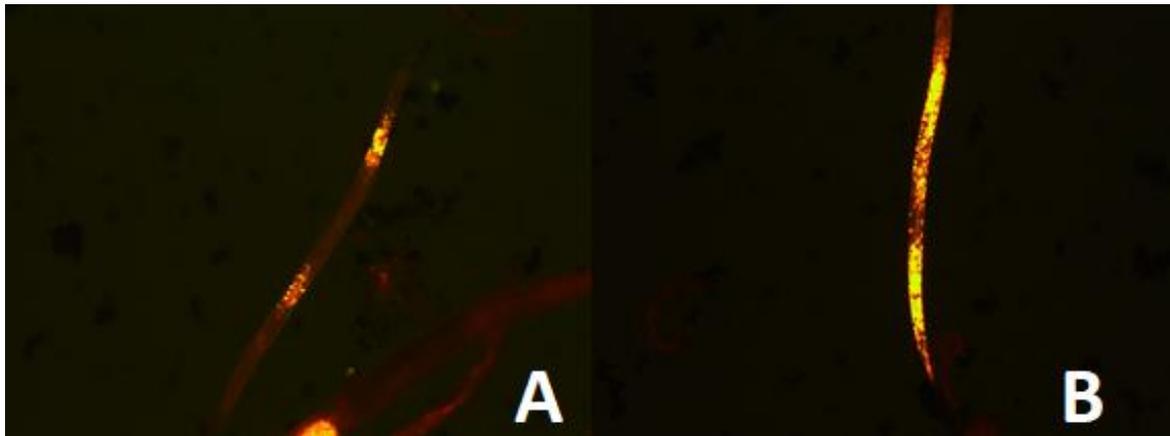


Figura 10 *Caenorhabditis elegans* con colorante Nile-Red a 20X. A. Larva crecida en agar NGM y *E. coli* OP50 B. Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50

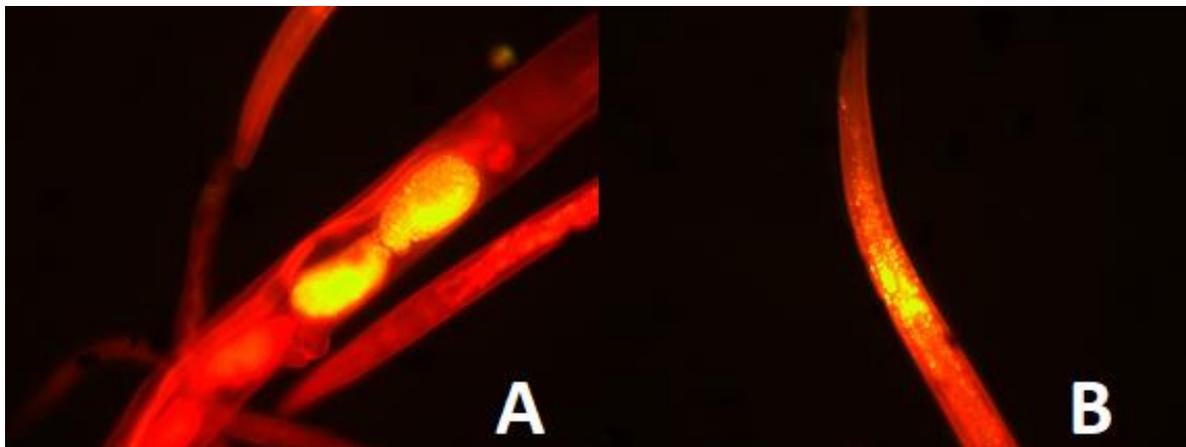


Figura 11 *Caenorhabditis elegans* con colorante Sudán III. A Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50 a 40X B. Larva crecida en agar NGM \* Glucosa y *E. coli* OP50 A 20X

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

En este estudio, se utilizó el nematodo *Caenorhabditis elegans* para identificar lípidos en su cuerpo bajo coloración de Sudan III y Nile-Red. De acuerdo a la clasificación de las coloraciones, utilizamos dos colorantes Indiferentes, que se caracterizan por no formar sales y al ser insolubles en las grasas se pueden usar para demostrar su presencia en células y tejidos, ya que tiñen en forma selectiva a los lípidos <sup>8</sup>.

Debido a la ausencia de tejido adiposo en *C. elegans*, el almacenamiento de lípidos se lleva a cabo en el intestino que a su vez ejerce funciones del hígado, en las células intestinales y en los orgánulos relacionados a lisosomas <sup>5</sup>. Nosotros observamos por la coloración de Nile-Red la mayor acumulación de lípidos en la zona del intestino (Figura 12)

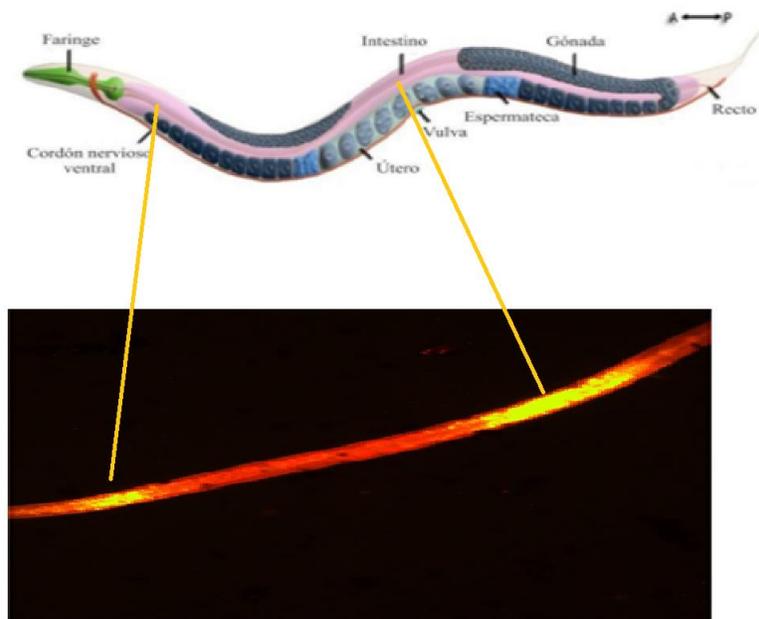


Figura 12 Ubicación de los sitios de acumulación de lípidos bajo coloración de Nile-Red

Identificamos con la coloración Nile-Red que los lugares con mayor acumulación de lípidos fueron la faringe y el intestino de *C. elegans* (figura 11 y 12), al observar un acumulo de color amarillo.

Bajo coloración de Sudam III, las gotas de lípidos citoplasmáticos o de los depósitos de grasa como de las membranas de fosfolípidos, se observan mucho más grandes que algunos orgánulos celulares (Figura 9B).

Bajo coloración de Nile-Red, se identificaron reservas de lípidos neutros coexistentes y gránulos autoflorescentes en *Caenorhabditis elegans* (Figura 10B). Estos gránulos intestinales se han relacionado con lisosomas (LRO) cuya expresión aumenta con el envejecimiento y estrés oxidativo <sup>11</sup>.

El intestino de *C. elegans* tiene varias clases de "gránulos" o vesículas morfológica y funcionalmente distintas. Una clase de gránulos grandes son autoflorescentes y birrefringentes; Si es ácido, las manchas se podrán observar con Nile-Red así como los principales depósitos de grasa que están contenidos en compartimentos subcelulares independientes del compartimento. Las principales reservas de grasa animal toman principalmente la forma de triglicéridos y se utilizan durante los períodos de privación de alimentos <sup>13</sup>.

En los triglicéridos (un lípido neutro), el Nile-Red tiene un máximo de excitación de aproximadamente 515 nm (verde) y un máximo de emisión de aproximadamente 585 nm (amarillo anaranjado). En contraste, en los fosfolípidos (lípidos polares) tiene un máximo de excitación de aproximadamente 554 nm (verde) y un máximo de emisión de aproximadamente 638 nm (rojo) <sup>10</sup>. Nosotros observamos que cepas de *C. elegans* N2 que únicamente se alimentaron de *E. coli* OP50 no generaron reservas de lípidos, a diferencia de las larvas que se suplemento con Glucosa, de acuerdo al color podemos concluir que acumularon triglicéridos. Desafortunadamente no realizamos registro fotográfico a 554nm, por lo cual no sabemos si había reservas tipo fosfolípidos.

La acumulación de lípidos se ha relacionado con la longevidad en diferentes organismos modelo y en humanos donde hay una mayor activación de la lipólisis y autofagia en los

almacenes lipídicos que podrían prolongar su esperanza de vida <sup>9</sup>. Nosotros trabajamos únicamente adultos jóvenes, lo que no nos permitió determinar la longevidad de nuestras larvas.

Teniendo en cuenta esto resultados, concluimos que las dos coloraciones identifican lípidos. Las dos coloraciones son fáciles de realizar, requiriendo el mismo tiempo para su ejecución.

Sudan III por sus características colorea fosfolípidos los cuales se observaron de color naranja; Nile-Red colorea los triglicéridos de color amarillo de acuerdo a la longitud de onda empleada.

Cabe resaltar que ambas coloraciones fueron exitosas para la visualización de lípidos, pero creemos conveniente realizar más ensayos para establecer cuál será la coloración más útil.

Finalmente queremos agradecer a nuestras tutoras, las profesoras Marcela Gómez y Jeannette León. Al estudiante Sebastian Cufiño de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por el entrenamiento y ayuda en el mantenimiento de *C. elegans*. Al Instituto de Ciencias Básicas por permitirnos hacer parte de este trabajo y utilizar todos los equipos.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. Published online 2015:1-31. doi:10.1895/wormbook.1.177.1
2. Madende M, Albertyn J, Sebolai O, Pohl CH. *Caenorhabditis elegans* as a model animal for investigating fungal pathogenesis. *Med Microbiol Immunol*. 2020;209(1). doi:10.1007/s00430-019-00635-4
3. Félix MA, Braendle C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol*. 2010;20(22):R965-R969. doi:10.1016/j.cub.2010.09.050
4. Dimov I, Maduro MF. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell Tissue Res*. 2019;377(3):383-396. doi:10.1007/s00441-019-03036-4
5. Park H-EH, Jung Y, Lee S-J V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*. 2017;40(2):90-99. doi:10.14348/molcells.2017.0017
6. Hunt PR. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol*. 2017;37(1):50-59. doi:10.1002/jat.3357
7. Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl(Suppl):S9-14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200
8. Watts JL, Ristow M. Lipid and Carbohydrate Metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2017;207(2):413-446. doi:10.1534/genetics.117.300106
9. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
10. Mak HY. Visualization of lipid droplets in *C. elegans* by light and electron microscopy. *Methods Cell Biol*. 2013;116:39-51. doi:10.1016/B978-0-12-408051-

5.00003-6

11. Megías M, Molist P, Pombal MA. *Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas Histológicas.*; 2019. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
12. Castañeda Y, Correales D. Valoración del efecto lipolítico y antioxidante del extracto etanólico de las hojas Bauhinia variegata Linn en un modelo experimental de diabetes inducida Caenorhabditis elegans. Published online 2020.
13. O'Rourke EJ, Soukas AA, Carr CE, Ruvkun G. C. elegans major fats are stored in vesicles distinct from lysosome-related organelles. *Cell Metab.* 2009;10(5):430-435. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.002
14. Yen K, Le TT, Bansal A, Narasimhan SD, Cheng J-X, Tissenbaum HA. A Comparative Study of Fat Storage Quantitation in Nematode Caenorhabditis elegans Using Label and Label-Free Methods. *PLoS One.* 2010;5(9):e12810. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012810>
15. Mota AAR, Correa JR, de Andrade LP, et al. From Live Cells to Caenorhabditis elegans: Selective Staining and Quantification of Lipid Structures Using a Fluorescent Hybrid Benzothiadiazole Derivative. *ACS Omega.* 2018;3(4):3874-3881. doi:10.1021/acsomega.8b00434

## 8. ANEXO 1

### ● PREPARACIÓN DE BUFFER M9

Para 1L de agua destilada, se:

1. Agregó 1 mL de MgSO<sub>4</sub>.
2. Luego, se agregó 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
3. Más, 6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
4. Y, por último, se agregó 5 g de NaCl.
5. Se agitó hasta ver disuelto los compuestos y autoclavar.

### ● PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN "BLEACHING" O DE BLANQUEAMIENTO

Esta solución se utiliza en el primer estadio del *C.elegans* y su principio radica en que los huevos se incuben en un medio sin alimento para acelerar la eclosión del parásito impidiendo un desarrollo posterior.

Esta solución debe realizarse antes de su uso puesto que la lejía pierde potencia durante cierto tiempo, esto por su fotosensibilidad.

	recipe #1	recipe #2	recipe #3	recipe #4	recipe #5
water (ml)	2.75	3.5	0.5	0.5	1.5
sodium hydroxide (ml)	1.25 (1M)	0.5 (5M)	2.5 (1M)	2.5 (2M)	2.5 (1M)
sodium hypochlorite ~ 4% (ml)	1	1	1	2	1
total (ml)	5	5	4	5	5

Para preparar 30mL, se:

1. Se agregó 3 mL de agua destilada.
2. Más 15 mL de NaOH al 2M. (Para preparar 10 ml, se pesan 0.8g de NaOH sólido)
3. Luego, se agregó 12 mL de Hipoclorito de sodio al 4% o 5%.