



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID Y CSIC

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

Caenorhabditis elegans: señalización de Ca^{2+} en la faringe

Memoria para optar al Título de Máster en Investigación Biomédica
presentada por:

PILAR ÁLVAREZ ILLERA

Directores:

Dra. Mayte Montero

Dr. Javier Álvarez

Valladolid, Julio 2016

ÍNDICE

1.- Introducción	3
1.1.- Ciclo de vida y desarrollo	4
1.2.- Tejidos de <i>C. elegans</i>	5
1.2.1.- Epidermis	6
1.2.2.- Músculo	6
1.2.3.- Aparato digestivo	6
1.2.4.- Sistema nervioso	7
1.2.5.- Aparato reproductor	8
1.3.- Faringe	9
1.3.1. Anatomía de la faringe	9
1.3.2.- Movimientos de la faringe	10
1.3.3.- Canales implicados en el bombeo	10
a) Receptor nicotínico	10
b) Canal de Ca ²⁺ tipo T	10
c) Canal de Ca ²⁺ tipo L	11
d) Canal de cloruro operado por glutamato	11
e) Canal de K ⁺	11
1.4.- Cepas mutantes	12
2.- Objetivos	13
3.- Material y métodos	14
3.1.-Mantenimiento de las líneas de gusano	14
a) Placas NGM agar	14
b) Placas NGM agar con FuDR	15
3.2.- Obtención de huevos para la sincronización	15
3.3.- Medidas de Ca ²⁺ citosólico	16
3.4.- Análisis de datos	19
3.5.- Obtención de cruces	19
3.6.- Curvas de mortalidad	20
4.- Resultados	21
5.- Discusión	25
6.- Conclusiones	27
7.- Bibliografía	28

Abreviaturas

NGM	Nematode growth médium
FuDR	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
ARNi	ácido ribonucleico de interferencia
ARNdc	ácido ribonucleico de doble cadena
LB	Luria Broth

1.- INTRODUCCIÓN

En la década de los 60, Sydney Brenner propuso al *Caenorhabditis elegans* como un posible modelo animal para el estudio de la biología molecular, biología del desarrollo, genética, desarrollo del sistema nervioso entre otras áreas (Brenner, 1988), gracias a esta aportación fue galardonado en 2002 con el Premio Nobel.

C. elegans es un nematodo, no parasito y de pequeño tamaño, el adulto alcanza 1mm de longitud. Es transparente, lo que permite, utilizando proteínas fluorescentes, estudiar diferentes procesos del desarrollo, aislar células o caracterizar la interacción de proteínas *in vivo* (Chalfie et al. 1994; Boulin et al 2006; Feinberg et al. 2008).

Tiene un desarrollo embrionario corto de huevo a adulto de apenas 3 días, al igual que su ciclo de vida es corto, de 18-23 días. Su descendencia es muy alta, y principalmente abunda la forma hermafrodita. El número de células somáticas permanece invariable durante toda la vida adulta, 959 células, a pesar de este número reducido de células cuenta con tejidos bien definidos: epidermis, sistema nervioso, muscular, aparato digestivo y aparato reproductor.

En la naturaleza se puede encontrar en el suelo, en la materia vegetal en descomposición que suministra la fuente bacteriana necesaria para su alimentación y desarrollo. En el laboratorio se utiliza como fuente de nutrientes para el *C. elegans* la cepa *E. coli* que se denomina OP50.

El tiempo de vida es corto (18-23 días) y es una característica que permite estudiar entre otros el estudio del envejecimiento y obtener resultados rápidos (Kenyon, 1995).

Otra característica que ha hecho que el *C. elegans* sea un modelo muy utilizado en el área de investigación genética es su fácil manipulación, incluso se pueden alterar la expresión de genes mediante ARNi sumergiendo a los gusanos en una solución con ARNdc (Tabara et al. 1998) o administrando OP50 con RNAdc (Timmons & Fire 1998). Además ha sido el primer organismo multicelular donde se descifró completamente el genoma en 1998 por el *C. elegans* Sequencing Consortium.

1.1 Ciclo de vida y desarrollo

La embriogénesis dura aproximadamente 16h a 20°C. Cuando el huevo eclosiona aparece el primer estado larvario, L1 que tiene 558 núcleos, algunos están presentes en sincitios multinucleares, por eso el número de células es menor. El desarrollo consta de estadios larvarios L2, L3 y L4 de diferente duración. Dentro del desarrollo larvario se producen diferentes procesos de división celular y apoptosis dirigida, además de un aumento de tamaño. En el paso de un estadio a otro va mudando la cutícula, pero antes de la muda se produce un periodo de inactividad que se conoce como letargo (Raizen et al. 2008).

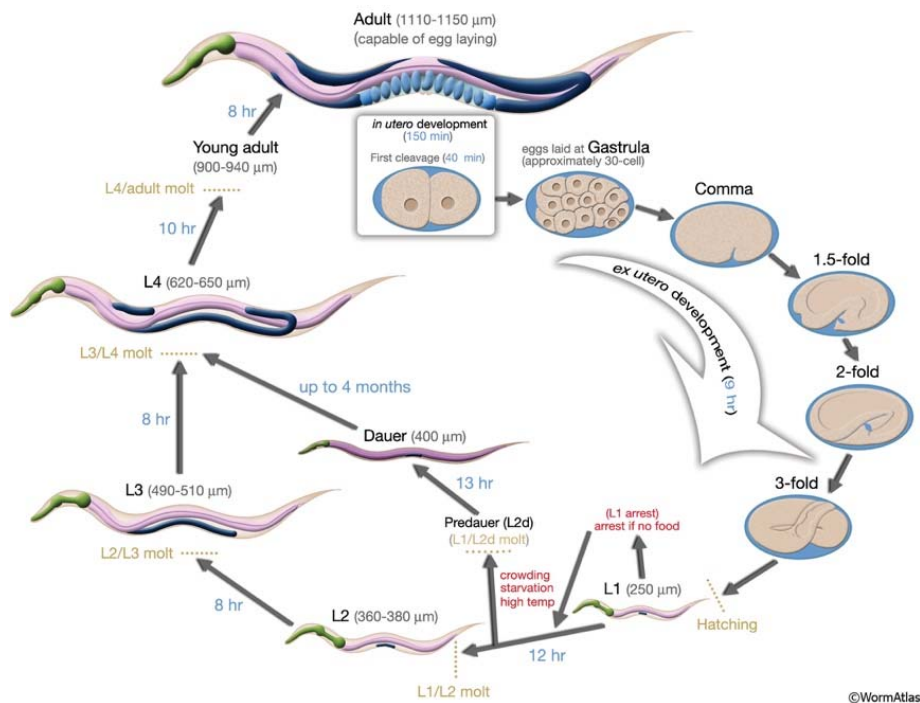


Figura 1: ciclo de vida de *C. elegans*. Altun & Hall (2009)

Aproximadamente 8h después de la muda del L4 tenemos un hermafrodita adulto joven que puede empezar a poner huevos. El período máximo de actividad ponedora está dentro de los primeros 2-3 días (aproximadamente 200-300 huevos), llegado a este punto se ha agotado la espermateca del hermafrodita. Si se quiere aumentar la descendencia se cruzan hermafroditas con machos, que aportan esperma y aumenta la progenie hasta 1000 huevos (Zarkower, 2006).

En condiciones de estrés como puede ser la ausencia de comida OP50, los gusanos en el estadio L2 pueden desviarse a un estadio larvario alternativo, lo que se

conoce como “*dauer*”, duración en alemán, ver figura 1. En este estadio “*dauer*”, la cutícula rodea totalmente la larva, incluso la boca impidiendo que ingiera comida y por tanto que continúe su desarrollo. Además se produce un cambio en el metabolismo que lo mantiene en esta fase durante meses. Esta cutícula lo hace resistente a cualquier estrés ambiental o químico (Hu, 2007). Cuando estas larvas que están en estado “*dauer*” vuelven a percibir condiciones favorables (presencia de comida), mudan la cutícula y continúan el desarrollo hacia L4.

1.2.- Tejidos del *C. elegans*

Una característica que ha hecho que el *C. elegans* sea un buen modelo de trabajo, es que a pesar de su pequeño tamaño y simplicidad tiene tejidos bien definidos: epidermis, músculo, aparato digestivo, sistema nervioso y aparato reproductor.

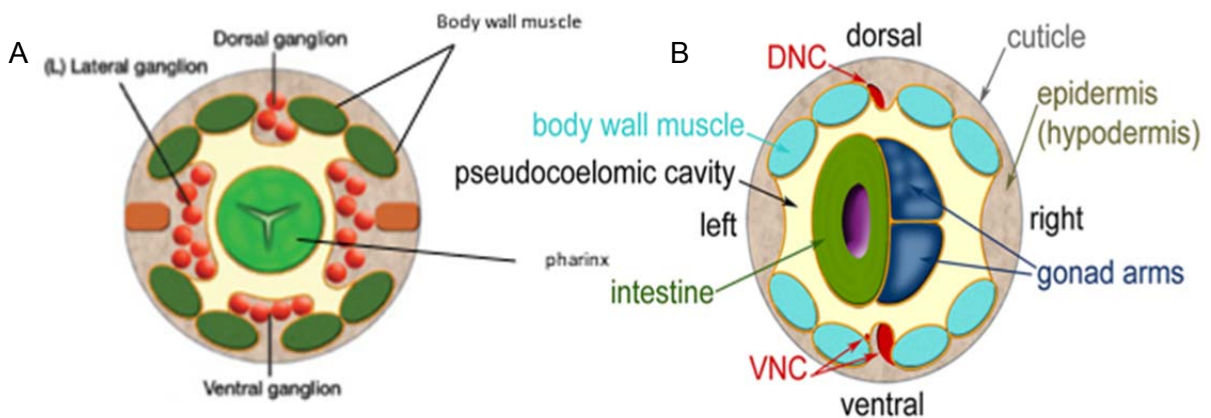


Figura 2. A. Corte transversal de la región anterior de un hermafrodita. La cutícula y el epidermis rodean a los cuatro cuadrantes de tejido muscular, dentro la cavidad celómica donde está la faringe. B. Corte transversal de la región posterior de un hermafrodita. rodeando de la epidermis y la cutícula. El intestino y las gónadas se localizan dentro de la cavidad celómica. VNC nervio cordal ventral y DNC nervio cordal dorsal. Altun & Hall (2009)

1.2.1.- Epidermis

Se trata del tejido más exterior y durante la embriogénesis se producen fusiones celulares que hacen que sea un largo sincitio epidérmico, es decir células plurinucleadas. Estas células de la epidermis secretan la cutícula que es una envuelta especializada de matriz extracelular compuesta de colágeno, lípidos y glicoproteínas. La cutícula determina la forma del cuerpo, y mediante conexiones ó puntos de anclaje entre la epidermis y el músculo, permite la contracción muscular. La cutícula también sirve como modelo de estudio de formación y función de la matriz extracelular (Chisholm & Hardin, 2005).

Se ha utilizado la cutícula del *C. elegans* como modelo de inmunidad innata en respuesta a patógenos o como modelo para el estudio de la reparación de heridas provocadas mediante punción. La epidermis cuando se altera estimula señalización por Ca^{2+} dirigida a la polimerización de actina para así reparar la herida. Además se activan vías de señalización de inmunidad innata que protegen al gusano de la infección provocada por la herida (Xu et al. 2012).

1.2.2.- Músculo

Se localiza justo debajo de la epidermis y hay una íntima conexión con ella. Consta de 95 células que se dividen en 4 cuadrantes a lo largo de todo el cuerpo. La contracción y relajación son las que van a producir el movimiento sinusoidal del nematodo. Son células somáticas estriadas y mononucleadas con múltiples sarcómeros por célula (Moerman & Fire 1997).

Además de las células musculares distribuidas a lo largo del cuerpo, el gusano también tiene células musculares que controlan la ingesta (músculo faríngeo), la puesta de huevos (músculo de la vulva y útero), el apareamiento (músculo específico de la cola del macho) y la excreción (músculos entéricos).

1.2.3.- Aparato digestivo

La comida entra por la región anterior del animal a través de la faringe. La faringe es una bomba neuromuscular bilobulada que succiona y tritura la comida antes de que pase al intestino donde se digiere. El bombeo de la faringe va a depender de la disponibilidad de comida, así, el nematodo bombea más rápido cuando está hambriento y menos cuando está saciado (Avery & Shtonda, 2003).

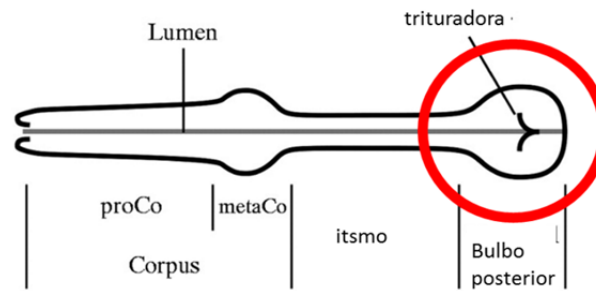


Figura 3. Esquema de la faringe (Avery & You, 2012).

La faringe posterior conecta con el intestino que está compuesto de 20 células epiteliales poliploides alargadas dispuestas en pares formando un tubo que recorre la longitud del animal y termina en el ano (McGhee, 2007).

C. elegans ha servido para el estudio de la respuesta a infecciones intestinales por diferentes bacterias patogénicas, o virus que colonizan el sistema digestivo (Darby, 2005; Diogo & Bratanich, 2014).

1.2.4.- Sistema nervioso

Un hermafrodita adulto tiene 302 neuronas. La mayoría de los cuerpos neuronales se disponen en unos pequeños ganglios en la cabeza, en el cordón ventral y en la cola (Sulston & Horvitz, 1977).

La conducción nerviosa es peculiar porque *C. elegans* carece de canales de Na^+ dependientes de voltaje, por lo que no puede generar potenciales de acción típicos. Se debate todavía si realmente la conducción ocurre mediante potenciales de acción u otro tipo de eventos regenerativos, incluyendo conducción pasiva o potenciales graduados (Lockery et al., 2009). Aún así, las neuronas expresan una amplia variedad de canales iónicos incluyendo canales de potasio y de calcio dependientes de voltaje (Hobert, 2013). De hecho, se han descrito potenciales de acción de Ca^{2+} en células de músculo del cuerpo (Gao & Zhen, 2011).

A pesar de su sistema primitivo, se han identificado neurotransmisores como acetilcolina, glutamato, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina y serotonina y se han encontrado receptores para ellos (Hobert, 2013).

1.2.5.- Aparato reproductor

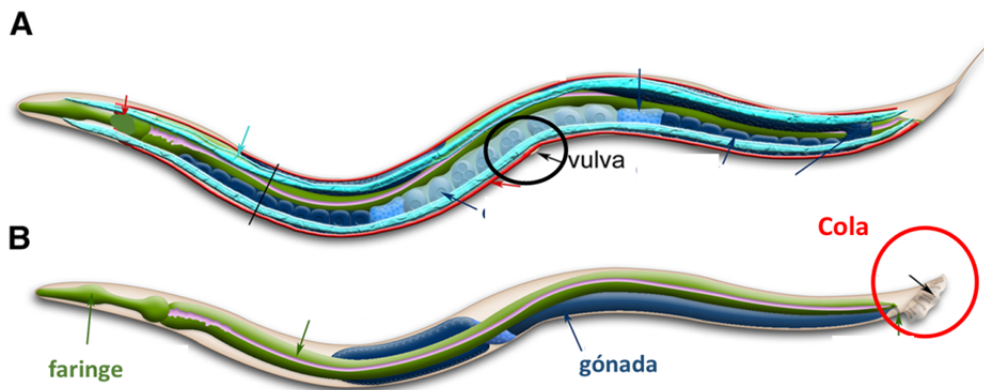


Figura 4. A. Hermafrodita. B. Macho de *C. elegans*. (Chalfie, 2015).

El *C. elegans* tiene dos formas sexuales, hermafrodita (XX) y macho (X0). En la naturaleza el porcentaje de machos es muy bajo, aproximadamente 1%, sin embargo en situaciones de estrés ambiental como un aumento temperatura, la proporción de machos aumenta. El hermafrodita, aloja en la gónada oocitos y espermatozoides, y a lo largo del oviducto se produce la fecundación y desarrollo de los huevos; también existe la posibilidad de ser fecundado por machos, lo que aumenta el número de puesta de huevos. Los machos son más pequeños, delgados y sólo producen espermatozoides (Herman, 2006).

Anatómicamente ambos sexos son muy parecidos, se diferencian en las estructuras sexuales, el hermafrodita en el tercio posterior tiene la vulva, esta estructura le permite realizar la deposición de los huevos, pero también a través de ésta el macho fecunda al hermafrodita. El macho al final de la cola tiene un penacho en forma de cepillo a través del cual va a introducir el espermatozoides en el hermafrodita por la vulva.

1.3.- Faringe

1.3.1.- Anatomía de la faringe

La faringe es un tubo lineal bilobulado encerrado en una membrana basal, que se encarga de succionar el alimento, triturarlo e introducirlo hasta el intestino. Se puede subdividir en seis secciones: cavidad bucal, procorpus, bulbo anterior (metacorpus), istmo, bulbo terminal (grinder/triturador) y válvula faríngeo-intestinal. Ver figura 5 (Albertson & Thomson, 1976).

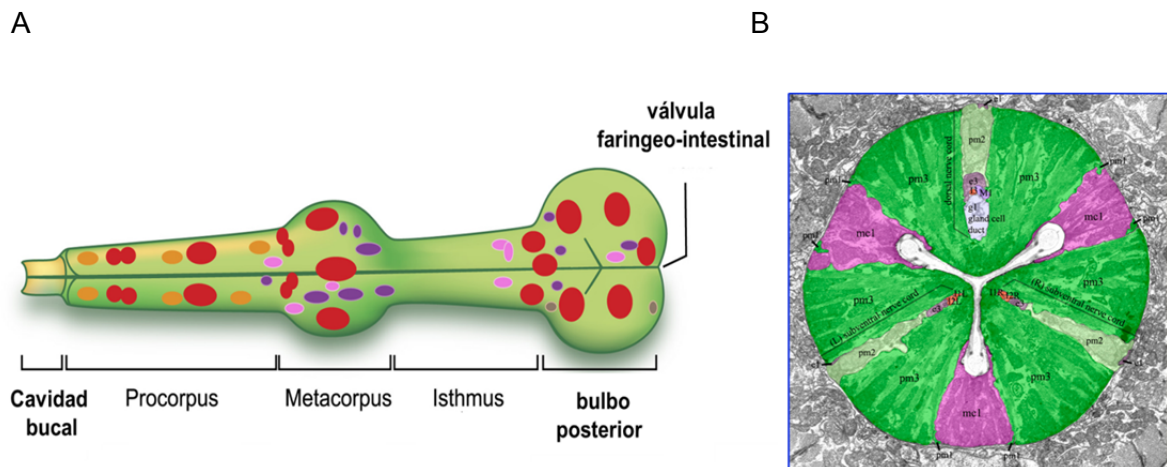


Figura 5: A. Partes del faringe. B. Disposición radial de las células musculares y marginales en un corte transversal de la faringe. (Mango, 2007).

A lo largo del eje longitudinal, hay ocho secciones de músculos y tres secciones de las células marginales que constituyen la mayor parte de la faringe. Radialmente, los músculos y las células marginales están organizados con simetría triple abrazando el lumen (Albertson & Thomson, 1976).

El sistema nervioso de la faringe tiene 20 neuronas, de 14 tipos diferentes, de las cuales 3 son los responsables de conseguir un funcionamiento normal y una ingesta adecuada (Albertson & Thomson, 1976).

La faringe también tiene dos tipos de células de naturaleza glandular, localizadas en el bulbo terminal, que contienen vesículas que se abren hacia el lumen. La naturaleza de las secreciones vesiculares es desconocida, pero se ha propuesto que ayudan en la degradación de la quitina y la cutícula en los cambios de los estadios larvarios, y en la digestión de los alimentos. Además, en el bulbo terminal existen unos “dedos” especializados que pueden funcionar como un tamiz durante la alimentación, ayudando a la trituración del alimento (Mango, 2007).

1.3.2.- Movimientos de la faringe.

El movimiento de las bacterias desde el exterior hacia el intestino se realiza mediante dos tipos de movimientos en la faringe: bombeo y movimientos peristálticos del istmo. Ambos están coordinados (Shimozono, 2004).

- Bombeo: consiste en ciclos coordinados de relajación y contracción de los músculos orientados radialmente en el corpus, istmo anterior y bulbo terminal. Cada ciclo de contracción/relajación se corresponde con un potencial de acción de las células musculares. Este potencial de acción se produce a través de cinco canales iónicos (Avery & You, 2012).
- Movimientos peristálticos del istmo: se producen tras 3-5 bombeos. Durante este movimiento el istmo posterior se abre y se cierra mediante una onda que va en dirección anterior-posterior, mediante esta onda se van a transportar las bacterias atrapadas en el istmo hasta el bulbo posterior donde se encuentra la trituradora.

En el bulbo posterior se encuentra la trituradora que va a aplastar las bacterias para que sean digeridas más fácilmente en el intestino.

Ambos movimientos están coordinados, pero para facilitar su estudio se suelen estudiar por separado (Raizen et al., 2012). En este trabajo nos centramos en el estudio del bombeo en el bulbo posterior.

1.3.3.- Canales implicados en el bombeo

a) Receptor nicotínico de acetil colina

En el bombeo normal de la faringe cada potencial de acción se inicia con la actividad de las neuronas motoras. La neurotransmisión rápida en el músculo de la faringe está mediada por acetil colina que actúa sobre los receptores nicotínicos (Mckay et al, 2004). Se han realizado mutaciones dirigidas en el receptor nicotínico (Raizen et al, 1995) y ablación de esas neuronas motoras (Avery & Horvitz, 1989) y se ha comprobado que sigue existiendo el bombeo aunque más lento e irregular.

b) Canal de calcio tipo-T (CCA-1)

El gen *cca-1* codifica para la subunidad α -1 (formadora del poro) de un canal de Ca^{2+} tipo-T. Se ha demostrado que el canal CCA-1 es necesario para el inicio de un potencial de acción eficiente en respuesta a la estimulación de la neurona motora. Por lo tanto, la pérdida de la función del gen *cca-1* provoca una disminución en la

probabilidad de excitación de la neurona motora, y reduce la capacidad de un animal para ingerir los alimentos (Steger et al., 2005).

El canal CCA-1 va a aumentar el efecto de excitación sináptica, permitiendo la contracción del músculo faríngeo. Sin embargo, los músculos de la faringe disponen de alternativas para iniciar los potenciales de acción en casos donde se ha producido alteración en las neuronas motoras (Steger et al., 2005).

c) Canal de calcio tipo-L (EGL-19)

El gen *egl-19* codifica la subunidad $\alpha 1$ del canal, se trata de un homólogo presente en vertebrados de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje de tipo L. Juega un papel fundamental en la regulación de la excitación y la contracción muscular en todos los músculos del *C. elegans* (Lee et al, 1997).

d) Canal de cloruro operado por glutamato (AVR-15)

Las neuronas motoras M3 de la faringe (Albertson & Thomson, 1976) realizan la sinapsis en el músculo del corpus, modulando el tiempo de relajación. Cuando se interrumpe la sinapsis de estas neuronas M3 las contracciones musculares tienen una duración media más larga (Raizen & Avery, 1994). *avr-15* es un gen necesario para que las neuronas motoras M3, propaguen la transmisión muscular. Es un gen que se expresa postsinápticamente y necesario para que se produzca una sinapsis funcional de las neuronas M3, y para el efecto de hiperpolarización de glutamato en el músculo de la faringe (Dent et al., 1997).

e) Canal de potasio (EXP-2)

El canal EXP-2 pertenece a la familia Kv de canales iónicos de potasio dependientes de voltaje. Se describió mediante mutaciones de pérdida y ganancia de función observándose que mediaba en la repolarización rápida de los músculos faríngeos (Davis et al., 1999).

Se trata de un canal diferente porque puede permanecer latente durante un potencial de acción neuronal típico, pero retorna de manera eficiente al potencial de reposo cuando el potencial de membrana cae por debajo de su umbral por acción de las neuronas M3. La función sería poner fin a los potenciales de acción que tienen una duración variable (Shtonda & Avery, 2005).

1.4.- Cepas mutantes

Para estudiar el patrón de bombeo de la faringe en el *C. elegans*, se decidió hacer cruces entre AQ2038, que tiene integrada en su genoma el gen que permite la expresión de la proteína YC2.1, y unos mutantes de *C. elegans* deficientes en unos genes determinados, *a priori* se pensó que podrían aportar información al estudio del Ca^{2+} en la faringe.

Todas las líneas mutantes escogidas aumentan la esperanza de vida respecto al silvestre. Las líneas mutantes utilizadas para el estudio son:

1.- ***nuo-6***: esta línea de gusanos tiene una mutación en una subunidad del complejo I mitocondrial (NUDFB4), que está muy conservada en la evolución. Esta mutación reduce la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que conlleva un bajo consumo de oxígeno, lento crecimiento, movilidad más lenta y un incremento de la esperanza de vida. (Yang & Hekimi, 2010). Se ha elegido este mutante para estudiar cómo puede afectar al bombeo de la faringe la baja actividad de la cadena respiratoria y en consecuencia la disminución en la producción de ATP.

2.- ***eat-2***: la mutación en este gen afecta a la subunidad del receptor nicotínico de acetil colina que actúa en el músculo faríngeo. (McKay et al, 2003) La alteración del receptor desencadena un menor bombeo en la faringe lo que conduce a una restricción calórica. (Lakowski & Hekimi, 1998) Estudiando esta mutación se pretende ver cómo la restricción calórica puede modificar o no el patrón citosólico de Ca^{2+} de la faringe.

3.- ***daf-2***: este gen codifica para el factor de crecimiento insulina-like. *daf-2* es parte de la primera ruta metabólica descrita que participa en la regulación del envejecimiento. También se ha visto que regula: el desarrollo reproductivo, la resistencia al estrés oxidativo, la temperatura, la hipoxia y la resistencia a patógenos bacterianos (Kenyon, 2011). Esta línea con *daf-2* mutado se escogió porque se ha visto que es la que tiene mayor esperanza de vida, y se pretende estudiar en qué grado el patrón de calcio varía con el aumento de la esperanza de vida.

2.- OBJETIVOS

- 2.1 Medir variaciones de Ca^{2+} en la faringe en condiciones de experimentación.
- 2.2. Observar posibles diferencias en el patrón de calcio citosólico en la faringe a lo largo de la vida del *C. elegans*.
- 2.3. Obtención de líneas mutantes que expresen el colorante YC2.1 en gusanos que llevan las mutaciones *eat-2*, *nuo-6* y *daf-2* ya descritas, para ver si dichas mutaciones afectan al patrón de Ca^{2+} observado en el gusano silvestre.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Mantenimiento de las líneas de gusanos

Los *C. elegans* que se han utilizado en este trabajo son:

- La línea AQ2038, que tiene integrado el gen que codifica para la proteína YC2.1 fluorescente sensible a Ca^{2+} , en el nematodo N2 silvestre. La proteína YC2.1 deriva de la GFP, proteína fluorescente verde.
- La línea mutante *eat-2*. Estos gusanos *eat-2* tienen una mutación en el receptor nicotínico.
- *daf-2* corresponde a la línea mutante que presenta una mutación en el receptor insulina-like,
- La línea mutante de nematodos *nuo-6* se trata de una línea que tiene una mutación en el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

Todas las estirpes de gusanos se mantienen a 20°C en incubador y durante los experimentos.

a) Placas NGM agar

El *C. elegans* se mantiene y crece en el laboratorio en placas de agar con Nematode Growth Medium (NGM). El NGM agar se prepara del siguiente modo: para 250ml de H₂O se añaden 0.75g NaCl, 4.25g de agar, 0.625g de peptona, se ajusta el volumen y se autoclava (20 minutos a 121°C). Finalizado el autoclave, se lleva a un baño caliente a 55°C y se deja 20 minutos para que se enfríe. Posteriormente, bajo llama de bunsen, se añaden 250µl de colesterol (5mg/ml), 250µl CaCl₂ 1M, 250µl MgSO₄ 1M y 6,25ml de tampón KPO₄, siempre por este orden para evitar que se formen precipitados, agitando bien antes de añadir cada compuesto. Luego se vierte en placas de 35mm, intentando llenar todas por igual y sin hacer burbujas. Se dejan solidificar una noche a temperatura ambiente. Posteriormente se siembran con 250µl de la cepa *E. coli* OP50, que es la fuente de alimentación del gusano. El OP50 se deja crecer previamente en LB a saturación, una noche a temperatura ambiente. 250 µl OP50 se ponen en el centro de la placa para que los gusanos permanezcan dentro de la comida, si se siembra cerca del borde los gusanos tienen más facilidad para salir del agar, perderse por los bordes de la placa y morir (Stiernagle, 2006).

b) Placas NGM agar con FuDR (15 μ M).

Para realizar experimentos con gusanos de la misma edad, hay que evitar que pongan huevos, porque la siguiente generación nos confundiría debido a que en dos días volveríamos a tener gusanos adultos, siendo imposible distinguir la primera generación de la segunda. Por todo esto es necesario interrumpir la puesta de huevos de los gusanos adultos, para ello se añaden 125 μ l de FuDR 30 μ M a los 250ml de NGM agar antes de verterlo en las placas. El FuDR es un inhibidor de la timidilato sintasa, que metila las timinas del ADN, lo que afecta a la división celular. En un gusano adulto el FuDR sólo afecta al desarrollo de los huevos, puesto que como ya se ha mencionado, cuando el gusano alcanza el estadio adulto sus células no vuelven a dividirse (Mitchell, 1979). Al día siguiente, a las placas con FuDR se les añade 250 μ l OP50 que es el alimento de los gusanos.

3.2.- Obtención de huevos para la sincronización.

Lo primero que se hace para sincronizar los gusanos es tener una gran población de gusanos adultos con muchos huevos en su interior. Para ello se ponen unos 50 gusanos adultos en una placa NGM agar con comida y pasados dos días se observa la placa. En el momento que ya no tienen comida, pero aún no han oradado en el agar en busca de comida es cuando se procede a realizar la sincronización. En el momento que los gusanos no tienen comida van a retener los huevos en su interior hasta que vuelven a tener comida. El proceso de obtención de huevos consiste en recoger los gusanos con una pipeta Pasteur de cristal con 1,3ml de agua desionizada, pasándolos a un eppendorf estéril. Se centrifugan 2 minutos a 2000rpm. Se retira el sobrenadante y añadimos 150 μ l de una mezcla 2:1 de lejía comercial-NaOH 2N y 250 μ l de tampón M9. La solución de lejía comercial-NaOH sólo va a romper los gusanos, los huevos son resistentes. El tampón M9 tiene la siguiente composición: 3 g KH_2PO_4 , 6 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl, 1 ml 1 M MgSO_4 , H_2O estéril hasta 1mL. Se procede a agitar con vórtex 10 segundos cada 2 minutos durante un máximo de 10 minutos. Bajo lupa se observa que los gusanos se van fragmentando. Pasado el tiempo procedemos a centrifugar 1 minuto a 8000rpm. Se retira el sobrenadante y añadimos 1ml de tampón M9 para lavar la lejía, y se centrifuga otro minuto a 8000rpm. Retiramos el sobrenadante y nos quedamos aproximadamente con 100 μ l que vamos a resuspender con la pipeta Pasteur de vidrio. Añadimos una gota de la suspensión a cada placa NGM agar con OP50. Dejamos que se absorba la gota en el agar y luego se introducen en el incubador a 20°C.

El tiempo de desarrollo del gusano dependerá de cada línea. Los gusanos AQ2038 tardan aproximadamente dos días y medio (56h) al igual que los N2, de los que proceden (Byerly, 1976) en alcanzar el estadio adulto joven. El adulto joven aún no ha puesto ningún huevo pero está perfectamente desarrollado. Los gusanos de las líneas mutantes *daf_2*, *eat_2* y *nuo_6* tardan cuatro o cinco días en alcanzar el estadio adulto joven.

Una vez tenemos los gusanos en el estadio de adulto joven, sus células no van a dividirse más, es el momento de trasladarlos a las placas de NGM agar con FuDR 15 μ M para realizar los diferentes estudios en imagen y de mortalidad.

3.3.- Medidas de Ca²⁺ citosólico en la faringe

Los experimentos de medida de Ca²⁺ citosólico se realizan los días 2, 5, 8 y 12 de vida del gusano, desde que alcanzan el estadio adulto. Para inducirles el bombeo de la faringe se añade serotonina 5mg/ml, previo ayuno completo de 4-6h antes del experimento. Esto se consigue pasando cada gusano individualmente a una placa de FuDR pero sin OP50.

Pasado el tiempo de ayuno, se procede a pegar el gusano para hacer el experimento. Preparamos agar especial para imagen no fluorescente, al 2% en tampón M9, lo dejamos en un termobloque a 70°C para disolverlo y mantenerlo en estado líquido.

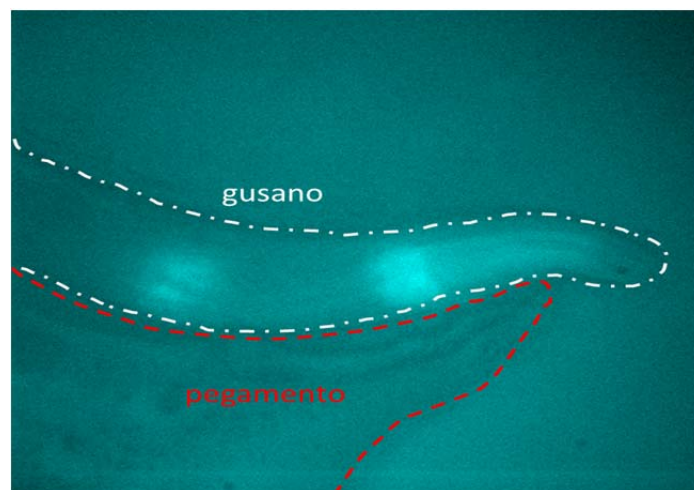


Figura 6: Gusano pegado con Dermabond.

Se cogen 25 μ l del agar al 2% disuelto en M9 y se pone en el centro sobre un cubreobjetos caliente que está sobre el termobloque. Sobre este cubreobjetos, se

pone otro encima, apretamos suavemente para que se extienda la gota y lo dejamos enfriar un par de minutos. Pasado el tiempo se separan los dos cubreobjetos con mucho cuidado para quedarnos con una película fina de agar (se denomina “pad”) en uno de ellos. Una vez tenemos el “pad” de agar lo montamos en la cámara de medida, que se ajusta perfectamente a la pletina del microscopio y procedemos a pegar el gusano con Dermabond. El Dermabond es un pegamento de cianocrilato que se utiliza actualmente en clínica para unir heridas de cortes o cirujías, y por tanto no es tóxico ni para humanos ni para el *C. elegans*. Se empieza a pegar desde la cola y progresivamente se avanza hacia la boca, sin llegar en ningún momento a tocarla, este proceso se realiza con mucho cuidado con ayuda de pipetas de Patch-Clamp que tienen la punta muy fina. Se añaden 300ml de serotonina 5mg/ml, preparada diariamente (Horvitz, 1982) en tampón M9, para estimular el bombeo de la faringe durante el experimento. La serotonina simula la presencia de comida y estimulan el bombeo. Se monta la cámara en el microscopio, Zeiss Axiovert 200 microscopio de fluorescencia invertido.

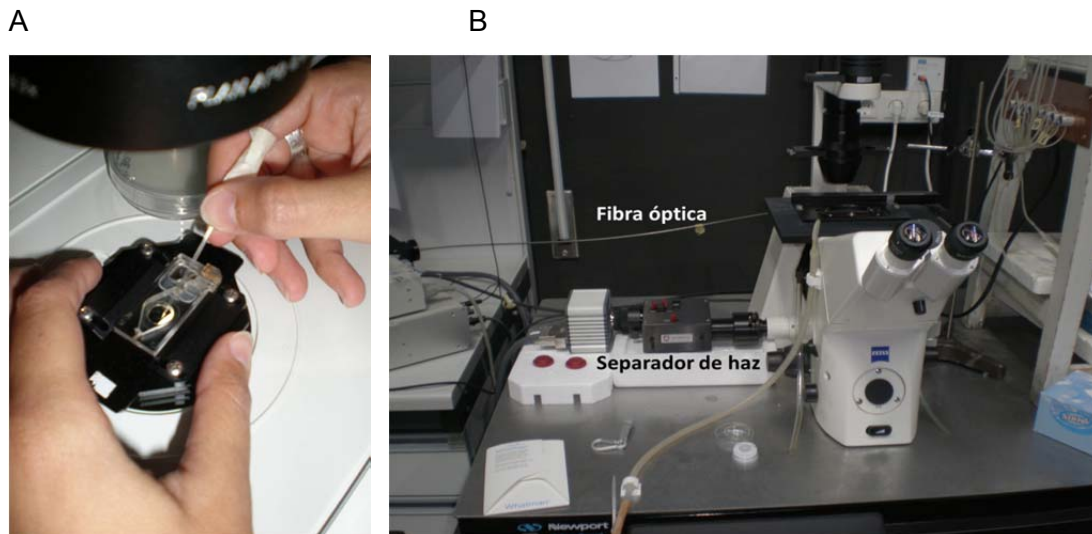


Figura 7: A. Procedimiento para pegar los gusanos. B. Microscopio invertido de fluorescencia con fibra óptica y separador de haz de longitudes de onda.

Los experimentos se realizan con el objetivo 40x LD-A-Plan. Al gusano le llega una longitud de onda de excitación de 430nm, que es la longitud de onda de excitación del YC2.1. Se utiliza un monocromador, con un ancho de banda de 4nm y excitación continua. La fluorescencia emitida por YC2.1, expresado por el gusano se recoge a 450nm, pasa por un espejo dicróico y se divide usando un separador (beam splitter) para obtener simultáneamente imágenes separadas a 480nm y 535nm de emisión. Se

obtienen imágenes cada 500ms y se graban continuamente las dos longitudes de onda y la ratio (cociente 535nm/480nm). La medida de la ratio nos permite discernir entre los picos reales debido a aumento en la concentración de calcio de cualquier artefacto. A 535nm la fluorescencia aumenta cuando aumenta el calcio y a 480nm la fluorescencia baja cuando aumenta el calcio. En la figura 9 se puede observar el patrón de las longitudes de onda de la proteína YC2.1. La duración del experimento es de 30 minutos tomando las imágenes ininterrumpidamente.

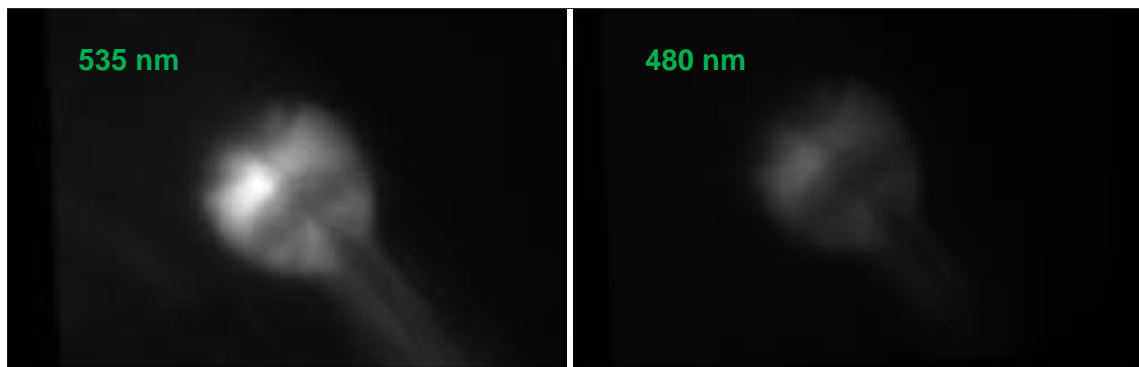


Figura 8: imagen de fluorescencia de la faringe a 535nm (izqda.) y 480nm (dcha).

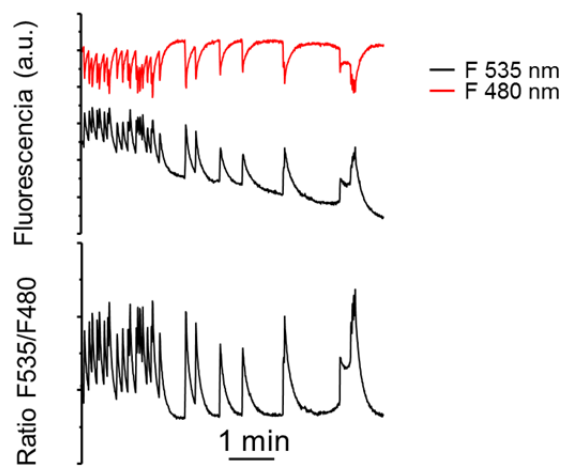


Figura 9: Cambios que se producen en la fluorescencia de YC2.1 de 480nm y 535 nm, como puede verse ambos registros son especulares.

3.4.- Análisis de datos:

Los videos de los experimentos registrados durante 30 minutos, se analizaron usando el programa Metafluor (Universal Imaging). Los gráficos se obtienen realizando el cociente de las imágenes a 535nm y 480nm. Este cociente nos permite ver el patrón de los picos de Ca^{2+} de la faringe del gusano. Se ha diseñado un algoritmo en el que se calcula la altura de los picos la anchura y la frecuencia de todos los picos del experimento. También se calcula la media de todas las frecuencias como la media de frecuencias individuales.

Sólo se consideran aquellos experimentos en los que los picos de Ca^{2+} tienen trazados inversos en las dos longitudes de onda. Como se puede observar en la figura 9.

3.5.- Obtención de cruces

Para estudiar el patrón de bombeo de la faringe en el *C. elegans*, se decidió hacer cruces entre gusanos AQ2038, que tiene integrado en su genoma el gen de la proteína YC2.1, y unos mutantes de *C. elegans* deficientes en genes determinados que “a priori” se piensa que pueden aportar información al estudio del Ca^{2+} en la faringe.

Las líneas mutantes para realizar los cruces con AQ2038 son: *nuo-6*, *eat-2* y *daf-2*.

Para la realización de los cruces con de las líneas mutantes, partimos de 10 machos de la línea AQ2038 que tiene integrada la proteína fluorescente (YC2.1), y se procede a juntarlos con 5 hermafroditas de cada línea en placas NGM agar junto. Cada cruce se hace de manera individual:

10 ♂ AQ2038 x 5 ♀ *nuo 6*

10 ♂ AQ2038 x 5 ♀ *eat-2*

10 ♂ AQ2038 x 5 ♀ *daf-2*

Se siembran placas NGM agar con 50µl de OP50, en lugar de 250µl para favorecer el encuentro entre los machos y los hermafroditas. Se ponen 10 machos por cada 5 hermafroditas, para facilitar que los machos siempre encuentren un hermafrodita y se llevan al incubador a 20°C. Se observa hasta que vemos aparecer la F1, primera generación adulta. Este será nuestro primer cruce. Se siguen realizando

cruces usando los machos que salen de la F1 anterior, comprobando que los machos son fluorescentes y se vuelven a cruzar con los hermafroditas mutantes. Este proceso se repite unas 5-6 veces. A continuación se procede a seleccionar individualmente hermafroditas fluorescentes manteniéndose los cruces para no perder ninguna generación.

En los gusanos seleccionados se comprueban si además de expresar la proteína YC2.1 fluorescente tienen la mutación, y para ello se compara el tiempo de desarrollo desde huevo hasta adulto de gusanos con la mutación y fluorescentes con aquellos que sólo tienen la mutación. En el momento que observamos que el desarrollo es como el del mutante, se hace un estudio de mortalidad. Debe concordar el tiempo de vida de los hermafroditas mutantes con el tiempo de vida de los hermafroditas mutantes fluorescentes que hemos seleccionado.

6.- Curvas de mortalidad:

Primero se obtienen los huevos y cuando han alcanzado el estadio de adulto joven se transfieren 50 gusanos a placas con FuDR, se dejan en el incubador a 20°C. Se realiza el contaje los días 2, 5, 8, 12 y a partir de este un día sí uno no. Un gusano se considera muerto cuando se ve que no se mueve ni responde al toque con el asa de platino. Se retira de la placa y se anota el día de vida al que ha muerto. Cuando han muerto todos los gusanos, realizamos las curvas de mortalidad con el programa de cálculo Origin 8.5.

Los experimentos de mortalidad se realizan por triplicado mínimo en tres experimentos distintos. Cuando en alguna de las placas se observa algún tipo de contaminación se retira del estudio y se reinicia la curva.

4.- RESULTADOS

En este trabajo se han realizado medidas de Ca^{2+} citosólico, en la línea de gusanos AQ2038 que tiene integrada la proteína fluorescente YC2.1, proteína sensible a Ca^{2+} , a lo largo de la vida del gusano. Como ya se ha comentado en materiales y métodos, se excita el faringe durante 30 minutos con una longitud de onda de 430nm y se registran las dos imágenes simultáneamente a 535nm y 480nm, se realiza el cociente de estas dos imágenes y obtenemos los trazados que se muestra a continuación. Los días que se han seleccionado para hacer los experimentos han sido día 2 se trata de un adulto joven en plena edad reproductora, día 5 donde la puesta de huevos decrece, día 8 apenas ponen huevos y día 12 gusanos considerados viejos.

Los registros obtenidos a días 2, 5, 8 y 12 están recogidos en las figuras 10, 11, 12 y 13.

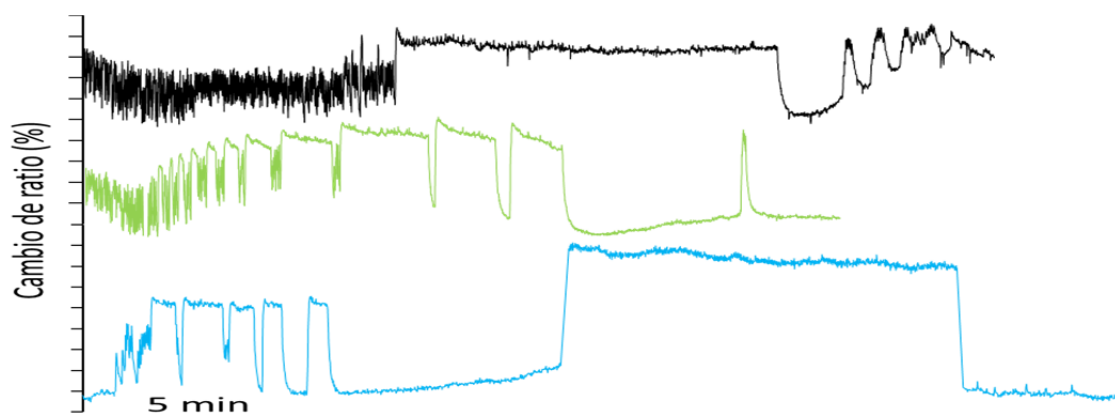


Figura 10: Día 2. Representación de la ratio de tres gusanos diferentes durante un tiempo de registro de 20-30 minutos.

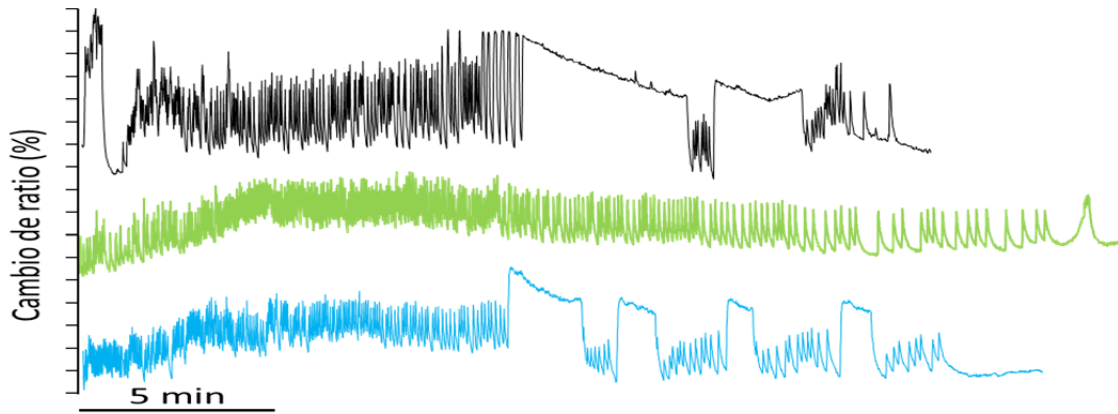


Figura 11: Día 5. Representación de la ratio de tres gusanos diferentes durante un tiempo de registro de 20-30 minutos.

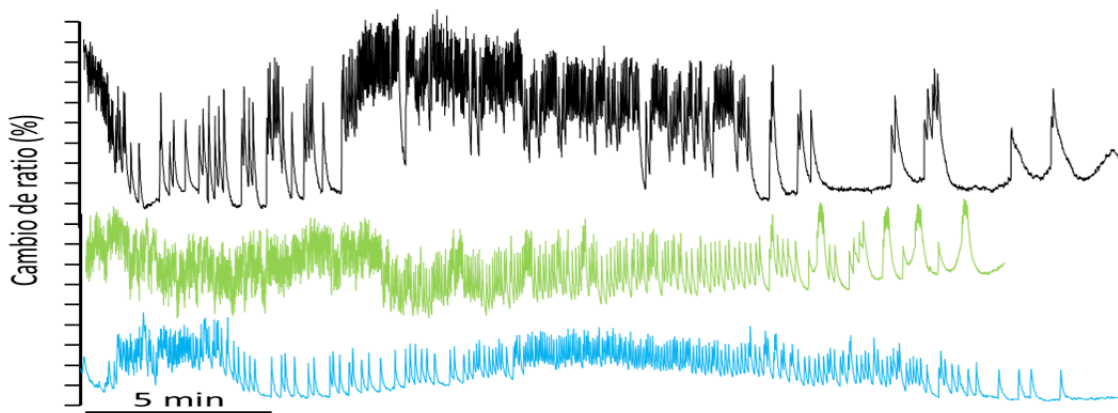


Figura 12: Día 8. Representación de la ratio de tres gusanos diferentes durante un tiempo de registro de 20-30 minutos.

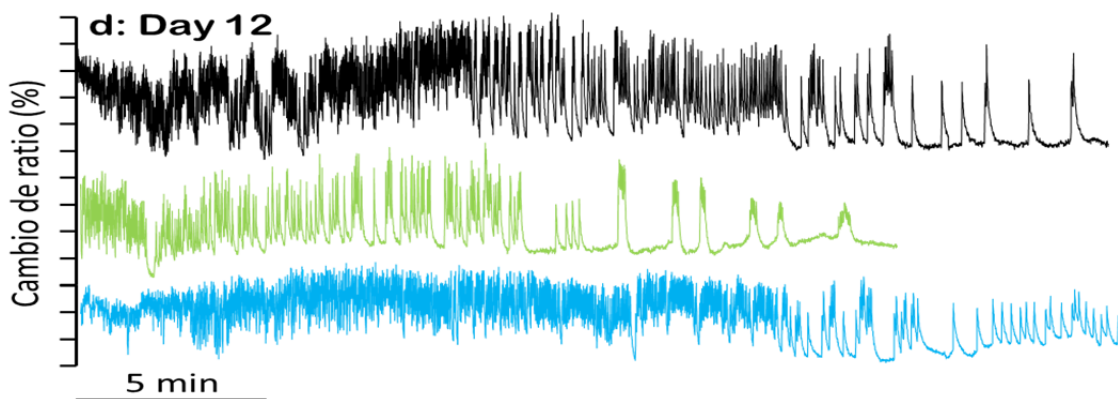


Figura 13: Día 12. Representación de la ratio de tres gusanos diferentes durante un tiempo de registro de 20-30 minutos.

A continuación se procede al análisis de los datos obtenidos a día 2, día 5, día 8 y día 12 mediante un algoritmo que se ha diseñado para este fin. Los datos que se obtienen son el número de picos de Ca^{2+} , la altura de los picos de Ca^{2+} y la duración

de los mismos de cada gusano en cada estadio de edad. Para que tenga un valor estadístico significativo se han realizado medidas de entre de 24-28 gusanos para cada condición. Los datos del número de picos y su anchura se han sumado dentro de cada grupo. En la figura 14 se puede observar la distribución del porcentaje de picos totales que tienen anchuras entre 1-10s, en intervalos de 0,5s, en los diferentes días de estudio. En la figura 15 se representa en escala logarítmica la distribución de la altura de todos los picos respecto a su anchura o duración, para cada día de estudio. Cada punto representa un pico de $[Ca^{2+}]$ definido por su altura y su anchura, y en cada gráfica se han acumulado todos los picos obtenidos en distintos gusanos del mismo día

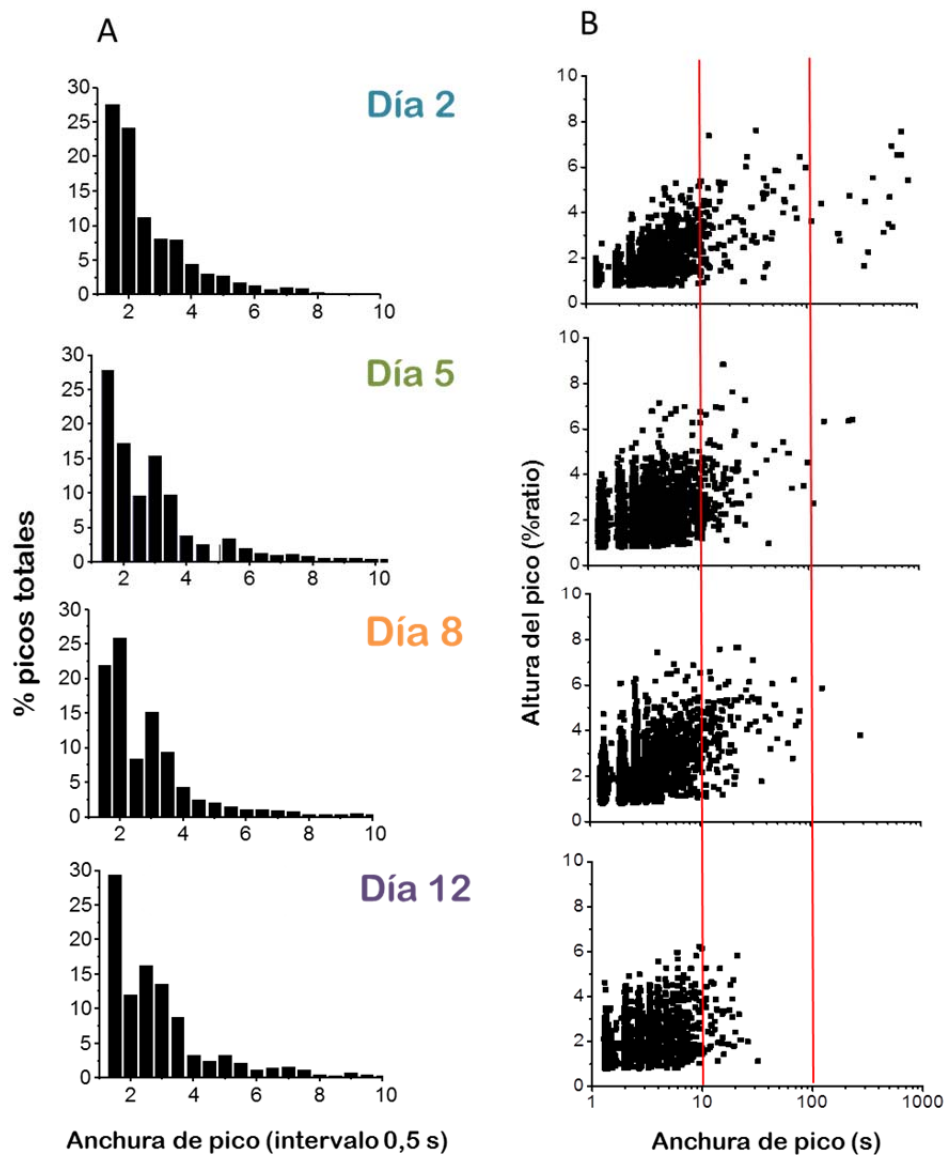


Figura 14: A) Representación en barras de la distribución de las anchuras de los picos de $[Ca^{2+}]$ de los gusanos en intervalos de 0.5s. B) Representación en escala logarítmica de todos los picos de $[Ca^{2+}]$ de los gusanos, agrupados según el día de vida al que corresponden los registros.

Los cruces obtenidos entre AQ2038 y los gusanos con las mutaciones ya definidas han dado lugar a:

1. La línea mutante AQeat-2 se ha obtenido mediante el cruce de machos AQ2038 y hermafroditas de la línea mutante *eat-2*.
2. Los gusanos de la línea mutante AQdaf-2 se obtuvieron mediante cruce entre machos AQ2038 y hermafroditas *daf-2*.
3. AQnuo6 es la línea mutante de nematodos que se obtuvo mediante el cruce entre machos AQ2038 y hermafroditas de la línea mutante *nuo6*.

En los cruces que se han realizado se comprueba que llevan la mutación original y expresan la proteína YC2.1 mediante las curvas de mortalidad. En este experimento también se ha hecho la curva del *C. elegans* silvestre N2 y de la línea AQ2038 para comprobar que al introducirle la proteína fluorescente no se ve afectada las esperanza de vida. Se ha realizado una media de 550-400 gusanos para cada línea.

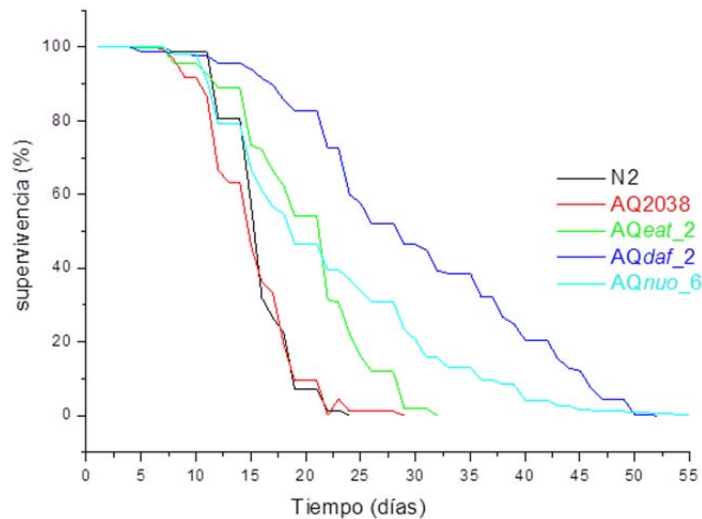


Figura 15: Representación de la curva de supervivencia de las líneas mutantes. (N2 n= 55, AQ2030 n=550, AQeat-2 n=550, AQdaf-2 n=500, AQnuo-6 n=400)

5.- DISCUSIÓN

Como se puede observar en las figuras 10-13 el patrón entre los días 2 y 12 es diferente. Considerando los gusanos de día 2 como jóvenes y los de día 12 como viejos, se ve que en los individuos más jóvenes hay un mayor número de picos que mantienen el Ca^{2+} alto durante minutos, en cambio a día 12 vemos muestra subidas y bajadas continuas de Ca^{2+} citosólico a lo largo de todo el ensayo. En los días intermedios, día 5 y día 8 lo que vemos es un cambio progresivo desde el patrón que se observa a día 2 hasta llegar al día 12. A día 5 seguimos viendo más picos donde el Ca^{2+} se mantiene elevado hasta minutos, y en día 8 aunque seguimos viendo picos con un Ca^{2+} alto, el número es menor.

Estas observaciones pueden ser subjetivas, es por esto que se ha desarrollado un programa informático que permite analizar la frecuencia y amplitud de cada experimento y realizar una media con los experimentos de todos los gusanos de cada día. En la figura 14A podemos ver la distribución de la anchura los picos expresada como porcentaje de picos que tienen una anchura en un determinado intervalo. Se observa que alrededor del 50% de los picos tienen una anchura entre 1-2s, y el porcentaje de picos que tienen una anchura mayor hasta 10s va decreciendo con la edad.

En la Figura 14B se representa en escala logarítmica en forma de nube de puntos el porcentaje de altura de los picos respecto a la anchura; aquí se puede ver de manera visual que los gusanos a día 2 tienen picos cuya duración puede llegar hasta a 900s en la parte derecha de las gráficas, y que este tipo de patrón va desapareciendo a medida que aumenta el tiempo de vida, vemos menor número de puntos en el rango de 100 a 1000s a medida que aumenta los días de vida del gusano. A día 12 todos los gusanos tienen una duración en sus picos de menos de 50s.

Observando la figuras 10, 11, 12 y 13 se puede decir que los gusanos que se consideran jóvenes, día 2, son capaces de tener una alta concentración de Ca^{2+} en el citosol de la faringe durante más tiempo, lo que puede ser una característica que permite asociar este tipo de patrón a los adultos jóvenes, sin embargo si se observa un registro donde todos los picos son muy rápidos, se puede casi asegurar que estamos ante un gusano envejecido, debido a que este patrón se da en los gusano de día 12. Por tanto estudiar la dinámica de Ca^{2+} citosólico en la faringe podría resultar útil para determinar la edad de un gusano por el tipo de contracción de la faringe.

Todos los experimentos se han realizado en gusanos AQ2038, se trata de la línea *silvestre*, pero en estudios futuros se quiere realizar las mismas medidas de Ca^{2+} citosólico en las líneas mutantes obtenidas para estudiar el comportamiento de la faringe en aquellos que tienen mayor esperanza de vida. Si se ha visto que los gusanos jóvenes son capaces de mantener un nivel de Ca^{2+} citosólico alto, quizá en los gusanos con las mutaciones *eat-2*, *daf-2* y *nuo-6*, pueden aparecer a días 5 y 8 mayor cantidad de picos con el Ca^{2+} citosólico elevado porque su músculo aún sea capaz de mantener esas concentraciones elevadas y esta característica que se ha observado en los jóvenes sea indicativo de la plasticidad del músculo.

En este trabajo también se ha realizado paralelamente la obtención de líneas mutantes que tengan la proteína YC2.1 según se ha detallado en material y métodos. Como se puede ver en la figura 16 se han conseguido integrar en las tres líneas la proteína fluorescente, porque observando las curvas de supervivencia, en todos los casos aumentan la esperanza de vida. Además si se comparan con las realizadas por otros autores está son coincidentes.

A partir de estas líneas mutantes fluorescentes en un futuro se procederá a realizar los mismos experimentos que los realizados en la línea *silvestre* fluorescente

6.- CONCLUSIONES

1.- Se ha conseguido realizar medidas de concentración de Ca^{2+} citosólico en la faringe durante 30 minutos de manera continua sin alterar la actividad del bombeo.

2.- Se observan diferencias notables en el patrón de concentración de Ca^{2+} citosólico principalmente entre los días 2 y 12, los días intermedios se ve una tendencia hacia ese cambio en el patrón.

3.- Se ha conseguido introducir la proteína YC2.1 en las líneas mutantes mediante los cruces entre hermafroditas *eat-2*, *daf-2* y *nuo-6* y machos fluorescentes.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Albertson DG & Thomson JN. (1976). The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. **275**:299-325.
- Altun F & Hall DH. (2009) Introduction. In WormAtlas <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
- Avery L & Horvitz HR.(1989). Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. Neuron **3**:473-85.
- Avery L & Shtonda BB. (2003) Food transport in the *C. elegans* pharynx. J. Exp. Biol. **206**:2441-57.
- Avery L & You YJ. (2012) *C. elegans* feeding. WormBook. May **21**:1-23.
- Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. (2006) Reporter gene fusions, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Brenner S, 1988 Foreword. The Nematode *Caenorhabditis elegans*, edited by W. B. Wood, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Byerly L, Cassada RC, Russell RL. (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. Dev Biol. **51**:23-33.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. (2015) Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. Genetics. **200**:387-407,
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science **263**: 802-5.
- Chisholm AD & Hardin J. (2005) Epidermal morphogenesis, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Darby C, 2005 Interactions with microbial pathogens, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Davis MW, Fleischhauer R, Dent JA., Joho RH, Avery L. (1999). A mutation in the *C. elegans* EXP-2 potassium channel that alters feeding behavior. Science **286**:2501-4.
- Dent JA, Davis MW, Avery L. (1997). *avr-15* encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. EMBO J. **16**: 5867-79.
- Diogo J. & Bratanich A, (2014) The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. Arch. Virol. **159**: 2843-51.

- Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. (1995) The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans* Genetics. *Genetics*, **141**:1399-406,
- Feinberg EH, Vanhoven MK, Bendesky A., Wang G, Fetter RD. et al., (2008) GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron* **57**: 353-63.
- Herman MA, (2006) Hermaphrodite cell-fate specification, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Gao S & Zhen M. (2011) Action potentials drive body wall muscle contractions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 2557-2562.
- Hobert O. (2013) The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Horvitz HR, Chalfie M, Trent C, Sulston JE, Evans PD. (1982) Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **216**:1012-4.
- Hu PJ, (2007), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Kenyon C. (2011) The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **366**:9-16.
- Lakowski B, Hekimi S. (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **95**:13091-6.
- Lee RY, Lobel L, Hengartner M, Horvitz HR., and Avery L. (1997). Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca²⁺ channel cause myotonia in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* **16**, 6066-76.
- Lockery SR, Goodman MB, Faumont S. (2009) First report of action potentials in a *C. elegans* neuron is premature. *Nat Neurosci.* **12**:365–366.
- Mango SE. (2007) The *C. elegans pharynx*: a model for organogenesis, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- McGhee JD, (2007) The *C. elegans* intestine, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- McKay JP, Raizen DM, Gottschalk A, Schafer WR, Avery L. (2004) *eat-2* and *eat-18* are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics*. **166**:161-9.
- McKay JP, Raizen DM, Gottschalk A, Schafer WR, Avery L. (2004). *eat-2* and *eat-*

- 18 are required for nicotinic neurotransmission in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Genetics* **166**: 161-9.
- Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J, Sanadi DR. (1979) Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol.* **34**:28-36.
- Moerman DG, & Fire A. (1997) *Muscle: Structure, function and development*, Priess. Cold Spring Harbor Press. 417–70
- Raizen DM, & Avery L. (1994). Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron* **12**: 483-95.
- Raizen DM, Zimmerman JE, Maycock MH, Ta UD, You YJ et al., (2008) Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature* **451**: 569-72.
- Raizen DM, Lee RY, Avery L. (1995). Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **141**: 1365-82.
- Shimozono S, Fukano T, Kimura KD, Mor I, Kirino Y, Miyawaki A. (2004). Slow Ca²⁺ dynamics in pharyngeal muscles in *Caenorhabditis elegans* during fast pumping. *EMBO Rep.* **5**: 521-6.
- Shtonda B. & Avery L. (2005). CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *J. Exp. Biol.* **208**: 2177-90.
- Steger KA., Shtonda BB, Thacker C, Snutch TP, Avery L. (2005). The *C. elegans* T-type calcium channel CCA-1 boosts neuromuscular transmission. *J. Exp. Biol.* **208**: 2191-203.
- Stiernagle T. (2006) Maintenance of *C. elegans*. *WormBook.* **11**:1-11.
- Sulston, JE. & Horvitz HR, (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **56**: 110-56.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC. (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. *Science* **282**: 430-1.
- Timmons L, & A. Fire, (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**: 854.
- Xu S, Hsiao TI, Chisholm AD. (2012) The wounded worm, using *C. elegans* to understand the molecular basis of skin wound healing. *Worm* **1**: 134-8.
- Yang W. & Hekimi S. (2010) Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* **9**:433-47.
- Zarkower D. (2006) Somatic sex determination. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, <http://www.wormbook.org>.