

Universidad de Valladolid



INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

FACULTAD DE MEDICINA:
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Descripción de tres cepas mutantes en el gen *sel-12* de *C.elegans* (enfermedad de Alzheimer)

ELENA CALDERO ESCUDERO

Directoras: Dra. Rosalba Inés Fronteriz García
Dra. Mayte Montero Zoccola

Valladolid, Junio 2021

ÍNDICE

✚ Abreviaturas	pág 3
✚ Resumen/Abstract.....	pág 4
✚ Introducción	
▪ Enfermedad de Alzheimer (AD)	pág 5
▪ Papel de la presenilina-2 en la enfermedad de Alzheimer	pág 6
▪ <i>C.elegans</i> como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas	pág 7
▪ Hipótesis	pág 8
▪ Objetivos.....	pág 8
✚ Materiales y métodos	
▪ Materiales y reactivos	pág 9
▪ Cepas.....	pág 9
▪ Mantenimiento de las cepas de <i>C.elegans</i>	pág 10
▪ Preparación de placas Petri para los diferentes experimentos	pág 10
▪ Trasferencia de gusanos	pág 11
▪ Preparación y siembra de los medios bacterianos OP50, L4440 y SCA1	pág 12
▪ Sincronización de gusanos mediante obtención y siembra de huevos	pág 12
▪ Estudios de desarrollo	pág 13
▪ Fertilidad	pág 13
▪ Curvas de mortalidad	pág 13
▪ Electrofaringeograma (EFG)	pág 14
▪ Estudios de movilidad	pág 15
✚ Resultados	
▪ Comparativa del desarrollo de las líneas N2, AN87, RB1672 y GS1894	pág 17
▪ Fertilidad	pág 19
▪ Curvas de mortalidad	pág 20
▪ Electrofaringeograma	pág 22
▪ Estudios de movilidad	pág 23
✚ Discusión	pág 25
✚ Conclusiones	pág 26
✚ Bibliografía	pág 27
✚ Anexo	pág 29

*PALABRAS CLAVE: Alzheimer, PSEN2, *sel-12*, AN87, RB1672, GS1894, neurodegeneración, *C.elegans*, *sca-1*, iRNA, SERCA.

ABREVIATURAS

- AD: *Alzheimer disease* (Enfermedad de Alzheimer)
- ANOVA: Análisis de la Varianza
- ApoE: Apolipoproteína E
- APP: *Amyloid Precursor Protein* (Proteína Precursora Amiloidea)
- A β : β -amiloide
- BBPS: *body bends per second* (unidad de medida de las veces que el cuerpo de cada individuo se dobla con respecto al tiempo)
- BLPS: *body lengths per second* (medida de la velocidad específica de nematodos)
- CGC: *Caenorhabditis Genetics Center*
- EFG: electrofaringeograma
- EMS: metanosulfonato de etilo
- EOAD: *Early-onset Alzheimer's disease* (Alzheimer de inicio temprano)
- iRNA: interference RNA
- L4440: cepa bacteriana control (plásmido vacío)
- LOAD: *Load-onset Alzheimer's disease* (Alzheimer de inicio tardío)
- NFTs: *Neurofibrillary tangles* (Ovillos Neurofibrilares)
- NGM: *Nematode Growth Medium* (Medio de crecimiento de nematodos)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OP50: *Escherichia coli* OP50 (cepa bacteriana)
- PSEN1: presenilina-1
- PSEN2: presenilina-2
- *p-tau*: proteína *tau* hiperfosforilada
- Razón R1/E2: Relación entre el pico de repolarización R1 y el pico de despolarización E2, en mV.
- RE: Retículo Endoplásmico
- SCA1: *Escherichia coli* portadora del vector silenciador de *sca-1*
- *sca-1*: *Sarcoendoplasmic-calcium-ATPase*
- *sel-12*: *Suppressor/Enhancer of Lin-12*
- SERCA: ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico
- TPM: trimetilpsoraleno
- V_{máx}: velocidad máxima
- V_{media}: velocidad media

RESUMEN/ABSTRACT

La demencia es un tipo de enfermedad neurodegenerativa en la que la mayor parte de los casos se clasifican como Alzheimer, por presentar simultáneamente depósitos extracelulares de péptido β -amiloide, agregaciones de ovillos neurofibrilares y neurodegeneración progresiva. Alteraciones genéticas de la presenilina-2 promueven el aumento de la forma más neurotóxica de péptido β -amiloide. En el presente trabajo se realiza un estudio descriptivo de tres cepas mutadas en el gen *sel-12* en *Caenorhabditis elegans*, por ser ortólogo de la presenilina-2 en humanos. Las líneas alteradas AN87, RB1672 y GS1894 se comparan con la estirpe salvaje, N2, imitando modelos de la enfermedad de Alzheimer. Los resultados muestran una disminución de la fertilidad y supervivencia de las tres cepas mutantes, retraso en el crecimiento de AN87 y RB1672 independiente del tamaño y defectos en las variables de movilidad de GS1894. Así mismo, los registros electrofisiológicos de GS1894 presentan una amplitud, duración del bombeo y razón de repolarización/despolarización mayor que los de N2. El tratamiento de las cepas con el RNA de interferencia *sca-1*, aumenta la supervivencia de GS1894 y la estirpe salvaje, N2.

*Dementia is a type of neurodegenerative disease in which most cases are classified as Alzheimer's disease because of the simultaneous presence of extracellular deposits of β -amyloid peptide, aggregations of neurofibrillary tangles and progressive neurodegeneration. Genetic alterations in presenilin-2 promote the increase of the most neurotoxic form of β -amyloid peptide. In the present work, a descriptive study of three strains mutated in the *sel-12* gene in *Caenorhabditis elegans* is carried out, as it is an ortholog of presenilin-2 in humans. The altered lines AN87, RB1672 and GS1894 are compared with the wild-type strain, N2, mimicking models of Alzheimer's disease. The results show decreased fertility and survival of the three mutant strains, size-independent growth retardation of AN87 and RB1672 and defects in motility variables of GS1894. Likewise, electrophysiological recordings of GS1894 show higher amplitude, pump duration and repolarisation/depolarisation ratio than those of N2. Treatment of the strains with *sca-1* RNA interference increases the survival of GS1894 and the wild-type strain, N2.*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son actualmente una de las mayores preocupaciones en cuanto a salud pública debido al envejecimiento poblacional, su alta prevalencia y coste social consiguiente. Tal es su importancia, que año tras año se desarrollan planes y estrategias que impulsan su investigación (1).

Una de las neuropatologías más frecuentes es la demencia, definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un síndrome basado en el deterioro de la función cognitiva, ya sea de naturaleza crónica o progresiva, cuya causa se relaciona con enfermedades y lesiones cerebrales, que afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio, entre otras, originando una situación de discapacidad y dependencia entre quienes la padecen. El subtipo de demencia más frecuente y predominante es la enfermedad de Alzheimer (AD), que representa el 60-70% de los casos y es reconocida por la OMS como una prioridad de salud pública (2).

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer fue descubierta por el médico alemán Alois Alzheimer y el psiquiatra Emil Kraepelin, en 1907, tras el examen del cerebro de una mujer de 51 años que sufría pérdida de memoria, del lenguaje, desorientación y alucinaciones (3). Existen tres características histopatológicas utilizadas para diferenciarla de otras formas de demencia, que deben darse simultáneamente:

- 1) Acumulación de depósitos extracelulares de péptido β -amiloide ($A\beta$), ya sea amorfos o dispuestos en una conformación β , localizados fundamentalmente en la sustancia gris del cerebro (4).
- 2) Formación de agregaciones intraneuronales de ovillos neurofibrilares (NFTs). Es decir, filamentos de proteína *tau* hiperfosforilada (*p-tau*) que alteran la conformación convencional de los microtúbulos y, consecuentemente, su función transportadora, dando problemas sinápticos y neuronales (5).
- 3) Neurodegeneración progresiva, por pérdida de neuronas o su función sináptica (5).

La acumulación de placas $A\beta$ es el proceso desencadenante de la enfermedad de Alzheimer más conocido. El péptido β -amiloide se forma como resultado del procesamiento aberrante y polimerización posterior de la proteína precursora amiloidea (APP) por el complejo γ -secretasa. La APP se produce de forma fisiológica en las neuronas y aunque su función es actualmente desconocida, se cree que está relacionada con la sinapsis neuronal y su plasticidad (6). Las agregaciones de $A\beta$ están implicadas en la interferencia y bloqueo de la transmisión sináptica, la alteración de la homeostasis del calcio, la inflamación y el agotamiento de factores energéticos y neuronales, lo que conduce al deterioro neuronal y la función cognitiva asociada (6).

Además, la sobreagregación del péptido β -amiloide inicia la segunda característica histopatológica mencionada anteriormente, la formación de NFTs en el interior de las neuronas. Los NFTs son agregados insolubles de proteína *tau* hiperfosforilada producidos por enzimas con actividad quinasa. En situaciones fisiológicas saludables, la proteína *tau* se asocia con la tubulina para formar microtúbulos estables y los interconecta. Por tanto, la hiperfosforilación de la misma interviene en la pérdida de la comunicación entre neuronas y el procesamiento de señales (5).

Sorprendentemente y pese a la estrecha relación entre ambas, cabe destacar la existencia de pruebas indicativas de que la acumulación de placas $A\beta$ no es

necesariamente un síntoma del desarrollo de Alzheimer. En algún otro punto deben incidir factores decisivos en la neurodegeneración cerebral (5).

Hoy en día, el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer se basa principalmente en test neuropsicológicos, técnicas de neuroimagen no-invasivas, como estudios PET (Tomografía de Emisión de Positrones), y vigilancia de algunos marcadores aceptados, como la relación $p\text{-tau}/\text{tau}$ o el ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, donde $A\beta_{42}$ es la forma menos abundante, insoluble, neurotóxica y con tendencia a la agregación, mientras que $A\beta_{40}$, es más abundante y menos reactiva (4). No obstante, la evaluación cerebral de la enfermedad solo puede confirmarse mediante una autopsia *post mortem*, donde se evidencian los daños histológicos del tejido, que no siempre coincide con la gravedad de los síntomas cognitivos del paciente (5).

Las causas asociadas a la enfermedad de Alzheimer no están del todo claras, existiendo diversas clasificaciones de los pacientes en subgrupos delimitados por diferentes variables. Por este motivo se le ha bautizado como una enfermedad multifactorial. Centrándonos en su origen, la patología se divide en 'Alzheimer familiar' y 'Alzheimer esporádico'. El primero y menos común (5% de los casos) se define por individuos que presentan mutaciones autosómicas en tres genes principalmente; PSEN1 (presenilina-1), PSEN2 (presenilina-2) y APP. El 95% de los casos restantes son 'Alzheimer esporádico', desencadenado por diversos factores de riesgo entre los que priman el ambiente y el estilo de vida de cada paciente (7). Por otra parte, desde un punto de vista clínico determinado por la edad de aparición de los síntomas, se propone clasificar la enfermedad como 'Alzheimer de inicio temprano' (EOAD), en personas menores de 65 años o 'Alzheimer de aparición tardía' (LOAD) en mayores de 65 años. Además, existen investigaciones que relacionan ambas categorías, siendo el tipo LOAD, mayoritariamente esporádico y EOAD, familiar o de causa genética (8).

Papel de la presenilina-2 en la enfermedad de Alzheimer

Las mutaciones en la presenilina se relacionan estrechamente con los casos de EOAD, aunque las mutaciones descritas para PSEN2 son una minoría con respecto a las encontradas en PSEN1. No obstante, se conoce que las formas alteradas genéticamente de PSEN2 promueven el aumento de $A\beta$, sobre todo de $A\beta_{42}$, su forma de mayor neurotoxicidad (9).

En cuanto a su estructura, la presenilina-2 es una aspartil proteasa de 448 aminoácidos, con 9 fragmentos transmembrana y un peso molecular de 55 kDa (9).

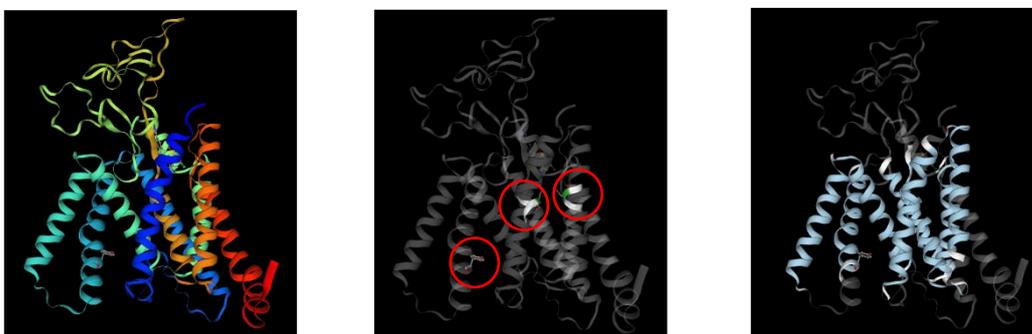


Figura 1: A la izquierda, estructura tridimensional de la presenilina 2. En el centro, se marcan los segmentos transmembrana y a la derecha, los sitios activos de la proteína (10).

La mayor parte de las alteraciones de PSEN2 asociadas a formas de EOAD y LOAD se encuentran en las partes hidrofílicas de la proteína, que coinciden con las regiones más conservadas.

En las neuronas, puede encontrarse en forma de holoproteína, es decir, proteína simple, en el aparato de Golgi y en la membrana del retículo endoplasmático (RE). En este último, algunos estudios sugieren que forma canales iónicos 'de fuga de calcio', que cuando están operativos aumentan la concentración de Ca^{2+} citosólica a costa de liberar dicho ión de los depósitos del RE, activando inevitablemente, las vías de señalización por este segundo mensajero. En consecuencia, se propone que las mutaciones en PSEN2 alteran la homeostasis del Ca^{2+} (11).

Sin embargo, la forma holoproteica de PSEN2 es muy inestable. Por ello sufre una endoproteólisis autocatalítica en su bucle citoplasmático mayor, dando lugar a un heterodímero ya estable y convirtiéndose en la subunidad catalítica del complejo γ -secretasa, donde ejerce su función principal: la escisión de APP en $\text{A}\beta$. De hecho, las mutaciones de la PSEN2 relacionadas con la enfermedad de Alzheimer, se deben a que estas derivan en una ganancia de función. Es decir, las formas aberrantes de PSEN2 cursan con un aumento de la actividad del complejo γ -secretasa, que conlleva el incremento de péptido $\text{A}\beta$ y que, además, se desvía hacia la formación de su forma con mayor neurotoxicidad, $\text{A}\beta_{42}$ (9).

Es importante señalar que la formación de canales de fuga en el retículo y la actividad desempeñada por PSEN2 en el complejo γ -secretasa, son independientes, ya que cada una de dichas funciones requiere una conformación específica; proteína simple o madura (escindida), respectivamente (11).

C.elegans como modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas

Caenorhabditis elegans es un modelo animal ampliamente utilizado como objeto de estudio de múltiples enfermedades. Se trata de un nematodo de vida libre con una larga lista de ventajas que lo hacen más que apto en cuanto a investigaciones relacionadas con el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas, como lo es la AD (12).

Algunas de sus virtudes son: su pequeño tamaño (1mm cuando alcanza la edad adulta), bajo coste y fácil mantenimiento. Debido al uso de este organismo como modelo, existen muchos protocolos de manejo disponibles y optimizados. En cuanto a su biología, *C.elegans* es transparente (lo cual permite la mejor visualización de sus estructuras internas), su ciclo vital y reproductivo son cortos (2-3 semanas y 3 días, respectivamente), es hermafrodita (aunque bajo condiciones de estrés térmico se desarrolla un bajo porcentaje de machos), por lo que en la mayor parte de los casos se da la autofecundación, facilitando la uniformidad genética entre los individuos y realiza puestas grandes que permite la obtención de alrededor de 300 larvas/adulto, que pueden ser sincronizadas. Además, es el primer animal con su genoma completamente secuenciado del que también se encuentra actualmente descrito su transcriptoma, lo que le hace ser el nematodo más estudiado en términos moleculares (13). Incluso, juega en su favor el hecho de tener más del 65% de los genes ortólogos a los implicados en enfermedades humanas, un alto número de cepas mutadas disponibles y, para culminar, no requiere la aprobación del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (12).

En definitiva, la clave del estudio de AD en *C.elegans*, reside por una parte en su corta esperanza de vida, necesaria en el estudio de enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Por otra parte, está la existencia de multitud de ensayos en los que se ha demostrado que la neurodegeneración de las líneas transgénicas de este nematodo es muy similar y puede traducirse a los efectos observados en humanos. Además, *C.elegans* carece de genes ortólogos para proteínas como APP o ApoE, por lo que la introducción de $\text{A}\beta$ transgénico, permite estudiar sus efectos como tal, excluyendo los impactos que podría tener el procesamiento de APP o la intrusión de ApoE (14). Lo mismo se puede aplicar a nuestras líneas de estudio, mutantes para el gen ortólogo de

la PSEN2, *sel-12* (*Suppressor/Enhancer of Lin-12*) en el gusano. Utilizando el *software* Ensembl, se observa la existencia de un 50% de identidad entre ambas secuencias aminoacídicas (15).

Según las bases de datos WormBase y UniProt, *sel-12* codifica para una proteína cuya función propuesta es similar a la de PSEN2 en humanos. Se trata de una endopeptidasa con localización subcelular en el RE y aparato de Golgi, expresada en la mayoría de las neuronas y que participa en varios procesos, como la conexión neural, termotaxis, función muscular (16), así como en la regulación de la transducción de señales y la oviposición (17).

Los nematodos mutantes en *sel-12* tienen aumentada la transferencia de calcio del RE a la mitocondria y, por tanto, se da una potenciación de los mecanismos de respuesta frente al estímulo. Una de las actividades aumentadas es la respiración mitocondrial, que tiene como inconveniente el incremento de la producción de iones superóxido que provocan situaciones de estrés y daño en el sistema nervioso del gusano (18).

Hipótesis

Antecedentes en la bibliografía sitúan mutaciones en la presenilina-2 como una de las causas de la enfermedad de Alzheimer por herencia familiar, generalmente de aparición temprana. Además, se ha caracterizado un gen ortólogo de PSEN2 en *C.elegans*, *sel-12*, cuya función propuesta se asemeja para la descrita en humanos.

Dadas estas premisas, se han escogido tres cepas mutantes en *sel-12*, con alteraciones de diferente relevancia; AN87, RB1672 y GS1894, en orden de gravedad decreciente, para poder evaluar los efectos fenotípicos de la misma y compararlos con la línea N2, estirpe salvaje. Además, se ha planteado la inhibición del único gen homólogo de la SERCA en *C.elegans*, *sca-1* (*Sarcoendoplasmic-calcium-ATPase*) (19), como posible solución a la sobreestimulación mitocondrial.

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal observar los efectos de tres mutaciones de diferente gravedad en el gen *sel-12* de *C.elegans* y compararlas con la estirpe salvaje, N2. Las líneas mutantes se denominan AN87, RB1672 y GS1894 e imitan modelos de la enfermedad de Alzheimer.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos para las distintas cepas:

- Estudio del desarrollo
- Estudio de fertilidad
- Determinación de la esperanza de vida
- Posibles alteraciones en el bombeo de la faringe
- Posibles alteraciones en la movilidad

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

COMPUESTO	CASA COMERCIAL	REFERENCIA/LOTE
10% Tween20	Bio-Rad	16624040
Agar	Calbiochem	12177-1Kg
Clorhidrato de serotonina	Alfa-Aesar	B21263
Cloruro de calcio	MERCK	A935182914
Cloruro SÓDCO	EMSURE	K49437804743
Colesterol	Sigma-Aldrich	C8503-25G
Hidróxido de sodio	MERK	B794198108
Peptona bacteriológica	PRONADISA	1616,00
Pipeta Pasteur (90 y 30 mm ø)	Deltalab	200201
SceenChip60	NemaMetrix	SCC60
Sulfato de magnesio	Sigma-Aldrich	M2643-500G
FuDR 5'-fluoro-2'-deoxiuridina	Alfa-Aesar	L16497
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	Thermo Scientific	00659265
Carbenicilina	Fisher BioReagents	BP2648-5
Tampón M9:		
Cloruro sódico	EMSURE	K46991504540
Fosfato monopotásico	Sigma-Aldrich	P5655-500G
Fosfato disódico	Sigma-Aldrich	S0876-1KG
Sulfato de magnesio	Sigma-Aldrich	M2643-500G
Tampón K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄		
Fosfato De hidrógeno dipotásico	MERCK	A0026704927
Fosfato monopotásico	Sigma-Aldrich	P5655-500G
Lejía (37g de Cl activo/L)	Comercial	

Cepas

En el presente Trabajo de Fin de Máster se utilizan tres líneas de *C.elegans* con diferentes mutaciones homocigotas en el gen *sel-12*, cuya descripción detallada puede encontrarse en la plataforma WormBase.

- Cepa AN87: porta una sustitución de un solo par de bases, mutación *nonsense*, que da lugar a un codón de parada prematuro. Consecuentemente, el RNAm es más corto y existe una alta probabilidad de que codifique una proteína truncada no funcional (20).
Para el diseño de esta línea se empleó el metanosulfonato de etilo (EMS) como agente mutagénico, dando el genotipo *sel-12 (ty11) X*.
- Cepa RB1672: presenta una delección de 1525 pb originada con el agente mutagénico trimetilpsoraleno (TMP) o por luz ultravioleta, cuya proteína resultante es no funcional por un acortamiento de su cadena aminoacídica que podría alterar estructuras esenciales (21). El genotipo se indica como *sel-12 (ok2078) X*.

- **Cepa GS1894:** se trata de una línea denominada genotípicamente como *sel-12 (ar131) X*, con una mutación puntual de sustitución de un par de bases, correspondientes a la primera cadena transmembrana de la proteína codificada por el gen *sel-12* (22). El agente mutagénico empleado en su diseño es también EMS (23).

Las tres líneas fueron proporcionadas por el CGC (*Caenorhabditis Genetics Center*). Se utilizó la cepa N2 (*wild type*), actualmente consolidada como línea control (24).

Mantenimiento de las cepas de *C.elegans*

Las cuatro cepas de *C.elegans* estudiadas, N2, AN87, RB1672 y GS1894, se cultivan en placas de agar sembradas con un césped bacteriano de *Escherichia coli* (OP50) y se cultivan en incubadores a 20°C. De esta forma, se cumple con los requerimientos básicos de humedad, concentración de oxígeno atmosférica y temperatura entre 12-25°C (25).

Preparación de placas Petri para los diferentes experimentos

Las placas de Petri en las que se cultivan los gusanos contienen agar NGM (*Nematode Growth Medium*) independientemente del objetivo experimental para el cual se usen. Por ello, se parte de un protocolo común:

- Preparación de una botella de 500 mL con: 0,75 g de NaCl 2,6 mM, 0,65 g de peptona (1,3 g/L), 4,25 g de agar (8,5 g/L) y 250 mL de agua desionizada.
- Se autoclavan a 125°C durante 2 horas y se mantienen en el baño a 55°C para evitar su solidificación.
- En la campana de flujo laminar se añaden:
 - 250 µL de una disolución de colesterol 12,9 mM
 - 250 µL de CaCl₂ 1 M
 - 250 µL de MgSO₄ 1 M
 - 6,25 mL de tampón fosfato (K₂PHPO₄/KH₂PO₄)

Una vez realizados estos pasos, el protocolo difiere dependiendo del tipo de experimento deseado, que cursa con la adición de los siguientes compuestos:

	MORTALIDAD	FERTILIDAD	MOVILIDAD	EFG
• FuDR	15 µM	-	15 µM	15 µM
• IPTG	1 mM	1 mM	1 mM	-
• Carbenicilina	0,2 µM	0,2 µM	0,2 µM	-

Tabla 1: Compuestos que se añaden al medio NGM según la finalidad experimental.

La fluorodesoxiuridina (FuDR) es un inhibidor de la replicación del DNA que dificulta la reproducción de *C.elegans* al bloquear el proceso de división mitótico. Ralentiza el crecimiento celular de los gusanos e impide su desarrollo, aunque presenta otros efectos secundarios inevitables (26). El isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es un compuesto inductor de la expresión de los operones de los vectores plasmídicos de las bacterias transformadas (27). Finalmente, la carbenicilina es un antibiótico que funciona como selector positivo de las bacterias transgénicas.

- Se resuspende con una pipeta de 50 mL para obtener una mezcla homogénea.
- Se pipetea 10 mL de la mezcla en placas de Petri de 90 mm de diámetro o 4 mL en placas de 35 mm.

Trasferencia de gusanos

Se utilizan diferentes métodos con el objetivo de pasar los gusanos de una placa de agar a otra, bien para su mantenimiento o con el fin de colocarlos en una condición adecuada para su estudio.

Una de las técnicas más generales, se conoce como 'chunk' o 'trozo'. Consiste en el empleo de una espátula, previamente flameada en alcohol de 70° para esterilizarla, con la que se corta un área determinada del agar donde se encuentran los gusanos de interés. Posteriormente, se coloca el fragmento extraído encima de una placa de Petri nueva sembrada con OP50, de forma que los gusanos queden en contacto directo con ambas capas de agar, como si se tratase de un bocadillo.

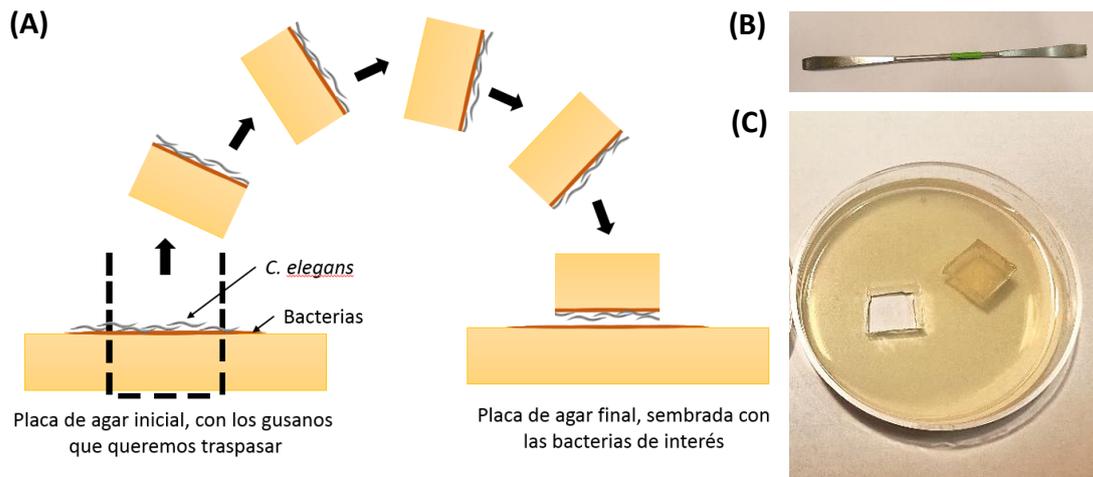


Figura 2: (A) Esquema del proceso de realización de un chunk con la orientación adecuada. (B) Espátula esterilizada para realizar el 'trozo'. (C) Placa de agar con un 'chunk'.

Las otras dos técnicas de transferencia empleadas tienen la ventaja de que permiten la selección de los gusanos individualmente, se les denomina *asa* y *asa de pestaña*. El *asa* consiste en un alambre de platino de 0,3-0,5 mm, que permite su rápida esterilización al flamearlo en la llama de un mechero Bunsen, fundido por un extremo a una pipeta Pasteur de vidrio y aplanado en su otro extremo. De esta forma, tocando suavemente sobre el césped bacteriano y después sobre los gusanos, estos se adhieren por tensión superficial al alambre. Finalmente, se depositan en la placa de agar nueva tocando la misma. También se utiliza el *asa de pestaña*, que consiste en una pestaña fusionada a punta de 200 μ L. Se desinfecta por inmersión en alcohol de 70°. Este método es más delicado y permite la selección individual de los *C.elegans*. Cabe destacar, el requerimiento de horas de práctica para estos dos últimos métodos, así como el tiempo que se precisa para su correcta ejecución.

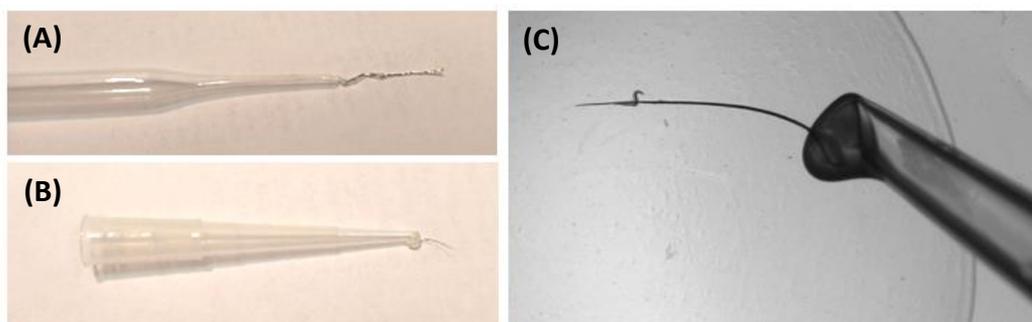


Figura 3: (A) Imagen del asa y (B) asa de pestaña. (C) Toma de gusanos con un asa de pestaña.

Pese a los pasos de desinfección, existe una probabilidad de contaminación asociada a estas técnicas.

Preparación y siembra de los medios bacterianos OP50, L4440 y SCA1

La especie bacteriana que sirve de alimento a las cepas de *C.elegans* es *Escherichia coli*. La cepa que se utiliza convencionalmente para el mantenimiento de este nematodo se denomina OP50 (28).

Para el cultivo de *E.coli* OP50 (OP50), se toma con la punta de una pipeta de 200 μ L una colonia de una placa sembrada en estría y se resuspende en un tubo de doble cierre con entre 4 mL de medio 2xYT. Posteriormente, se coloca en agitación en el incubador-agitador a 37°C durante la noche/12 horas para facilitar el crecimiento bacteriano. Tras 24 horas, se vierte el contenido del tubo en un bote de 50 mL estéril con 40 mL de medio 2xYT.

Las cepas bacterianas utilizadas para el estudio con RNA de interferencia (iRNA) son L4440 y SCA1. Son transgénicas y ambas portan el vector plasmídico L4440. La cepa bacteriana control, L4440, contiene el plásmido vacío, mientras que la cepa SCA1 tiene el iRNA *sca-1* cuya función es silenciar la SERCA de *C.elegans* codificada por el gen *sca-1*.

El procedimiento para el crecimiento de ambas cepas mutantes es el mismo descrito anteriormente para *E.coli* OP50, con la diferencia de que, en este caso, se utiliza ampicilina 0,3 μ M como seleccionador positivo de las cepas transgénicas. Con ayuda de un espectrofotómetro se calcula la proporción adecuada de *E.coli* SCA1, pues debe ser 10% de SCA1 y 90% de L4440 (datos previos del laboratorio).

Sincronización de gusanos mediante obtención y siembra de huevos

La sincronización de los nematodos es fundamental en los experimentos realizados, ya que se necesita que todos se encuentren en el mismo estadio de desarrollo para la recogida de datos comparables. En el presente estudio se opta por partir de nematodos en fase de huevo para obtener poblaciones muestrales uniformes.

Para ello, es necesario partir de placas con gusanos adultos que porten huevos en el interior de su organismo y seguir los siguientes pasos:

- Se recogen los nematodos en un eppendorf con 1-2 mL de tampón M9, con una pipeta Pasteur de vidrio, ya que se adhieren al plástico.
- Centrifugar 1 minuto a 2000 r.p.m y retirar el sobrenadante.
- Para liberar los huevos del interior de los adultos, primero se realiza una ruptura química de los gusanos añadiendo 250 μ L de tampón M9 y 150 μ L de una mezcla 2:1 de lejía/NaOH 5 M. Posteriormente, se lleva a cabo la ruptura mecánica mediante la agitación de los eppendorf en el vórtex, en intervalos de 20 segundos de agitación cada 2 minutos, durante 10 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 8000 r.p.m y retirar el sobrenadante.
- Lavado de los huevos con 1 mL de tampón M9 y aplicación de un agitado rápido con el vórtex para disgregar el sedimento.
- Centrifugar 1 minuto a 8000 r.p.m y retirar el sobrenadante hasta quedarnos con 100 μ L aproximadamente.
- Resuspensión del sedimento y pipeteo de gotas de aproximadamente 15 μ L en placas nuevas sembradas con la cepa bacteriana de interés.
- Se dejan secar las gotas con los huevos y finalmente se almacenan en el incubador de 20°C, en posición invertida.

Estudios de desarrollo

Para observar el fenotipo que presentan las cepas desde la puesta de huevos hasta su conversión en adulto joven se realizan fotografías de las larvas cada 24 horas, durante los 4 días de su desarrollo, con una cámara acoplada a una lupa binocular Leica a una magnificación de 50X.

Fertilidad

Las placas de agar utilizadas en los experimentos de fertilidad son de tres tipos, todas especificadas en la *Tabla 1*:

- Placas de mantenimiento, sembradas con OP50.
- Placas con IPTG y carbenicilina, con L4440 (control).
- Placas con IPTG y carbenicilina, con SCA1, 10% (tratamiento).

Se estudió el número de huevos que pone cada una de las cepas mutantes AN87, RB1672, GS1894 y la cepa control N2, colocando un individuo en cada uno de los tres tipos de placas, transfiriéndolo a otra nueva cada 24 horas y manteniendo las mismas en la incubadora a 20°C. Dos días después de haber retirado el gusano adulto de cada placa, se realiza un recuento de las larvas existentes.

Con los datos recopilados, se realiza un Análisis de la Varianza (ANOVA) para obtener las curvas de fertilidad con el programa SPSS.

Curvas de mortalidad

Los experimentos de mortalidad de las líneas mutantes AN87, RB1672, GS1894 y la cepa control N2, se realizan sobre placas de Petri de 35 mm de diámetro, en dos condiciones aplicadas en dos etapas del desarrollo de *C.elegans* que se resumen en la siguiente tabla:

	CONDICIÓN CONTROL (L4440)	CONDICIÓN DE ESTUDIO (SCA1, 10%)
Mortalidad nº 1 (01.03.2021)	Desde fase de huevo	
Mortalidad nº 2 (09.03.2021)		
Mortalidad nº 3 (16.02.2021)	Desde adulto joven	
Mortalidad nº 4 (12.04.2021)		
Mortalidad nº 5 (19.04.2021)		
Mortalidad nº 6 (24.05.2021)		

Tabla 2: Resumen de la información relativa a los experimentos de mortalidad.

Cabe destacar, la transferencia de los gusanos con el *asa de pestaña* a su placa correspondiente dos veces; la primera, en su estadio adulto joven, día en el que se inician las mortalidades y la segunda, a día 5, para evitar las alteraciones que podría producir la retirada de las larvas. Además, cada experimento de mortalidad consta de 5 placas de cada cepa por cada condición, con 10-30 nematodos en cada una incubados a 20°C. El rango varía tanto debido a que se hicieron diferentes pruebas para determinar cualitativamente cuál era el tamaño muestral más adecuado.

El procedimiento seguido consistió en anotar y retirar cada día los individuos muertos existentes en cada placa, considerando individuos *censurados* aquellos que salen del agar y se secan o se deslizan debajo del mismo. El experimento finaliza cuando no queda ninguno vivo.

Por último, se utilizan cuatro programas para la obtención de los resultados estadísticos; Excel para la plantilla, Origin pro8.5 y Survival para el tratamiento de los datos y SPSS para la obtención de las curvas de mortalidad a partir del test Klapan-Meier y Log Rank para agruparlos por parejas sobre los estratos.

Electrofaringeograma (EFG)

Para la mejor comprensión de la técnica se procede a describir primero el órgano faríngeo de *C.elegans*, más conocido como faríngeo o *pharynx*, cuya función se basa en el bombeo y triturado de las bacterias para su posterior transporte al intestino (29), *Figura 4*. Es un órgano neuromuscular establecido como modelo simple para el estudio de las redes neuronales. Además, es comparable al corazón, pues ambos se contraen y relajan sincrónicamente y de forma autónoma, coordinado por el sistema nervioso. La faríngeo, se compone de 60 células en total; 20 neuronas, 20 células musculares y 20 glandulares o estructurales, conectadas al resto del sistema nervioso por una única interneurona (30).

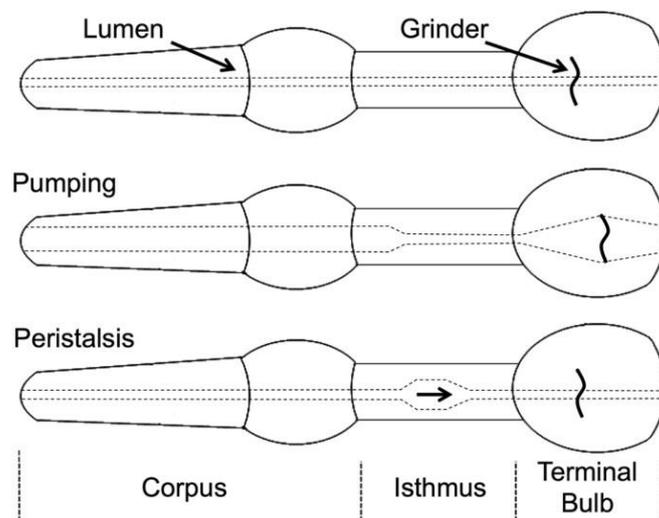
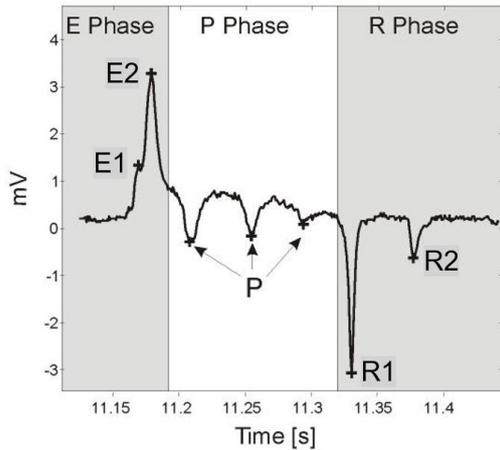


Figura 4: Esquema de las tres partes que componen la faríngeo de C.elegans: cuerpo, istmo y bulbo terminal. El bombeo del pharynx permite la entrada de la comida en el cuerpo, que pasa al istmo favorecido por las ondas peristálticas. Finalmente llega al triturador, 'grinder', (ubicado en el bulbo terminal) cuya función es triturar las bacterias, que son impulsadas al intestino (31).

El EFG es una técnica que mide extracelularmente la actividad eléctrica del bombeo del músculo de la faríngeo. Dichos registros eléctricos se denominan electrofaringeogramas y representan un patrón regular de señales eléctricas que se observan solo cuando la faríngeo está bombeando y que, por tanto, proporciona información acerca de las características del bombeo y de las vías de señalización que pueden estar afectadas en las líneas mutantes (32).

De forma general, cada bombeo describe una serie de picos, que generalmente se conservan. Estos se corresponden con tres fases (30):

- Fase E: de excitación, con dos picos positivos, E1 y E2.
- Fase P: de meseta, compuesto por tres picos negativos, P.
- Fase R: de relajación y repolarización, en forma de dos picos negativos R1 y R2.



- E1:** Excitación de la motoneurona colinérgica MC.
- E2:** Despolarización del músculo y contracción del *pharynx*.
- P:** Liberación de glutamato de la motoneurona inhibitoria M3.
- R1:** repolarización del cuerpo
- R2:** repolarización del músculo del bulbo terminal.

Figura 5: EFG de un bombeo del músculo faríngeo de *C.elegans* y explicación de los picos indicados. Modificado de (30).

En este trabajo, cada electrofaringeograma (registro eléctrico) tiene una duración de 3 minutos. Se decidió utilizar la cepa mutante GS1894 por ser la línea que mayor supervivencia y movilidad presenta en la fase adulta. Como control, se usó N2. Ambos, crecieron en placas con *E.coli* OP50 y al tercer día cuando alcanzan el estadio adulto joven, se transfirieron a una placa con FuDR 15 μ M para evitar el desarrollo de larvas, que interfieren en la técnica EFG. Los EFGs se realizan a día 5 de edad adulta y se procedió de la siguiente forma:

- Los gusanos se recogen en un eppendorf con 1,5 mL de dilución Tween 0,1%-tampón M9. El Tween es un detergente que se adhiere a las membranas bacterianas emulsionándolas, pero no afecta a los gusanos.
- Se llevan a cabo 3 lavados de los nematodos con 1 mL de tampón M9, cada uno seguido de volteo manual y retirada del sobrenadante. De la misma forma, se lleva a cabo un cuarto lavado con 1 mL de una disolución de serotonina 2,3 mM en tampón M9. La serotonina activa el bombeo del *pharynx*.
- Se añade 1 mL de la dilución de serotonina 2,3 mM y se deja reposar 15 minutos.

Los gusanos no pueden pasar más de dos horas en este medio estimulador porque entran en restricción energética, que altera los registros electrofisiológicos.

El electrofaringeograma se realiza en una cámara ScreenChip Cartidge Nemamatrix ubicada sobre un microscopio invertido de la marca Zeiss. Esta se encuentra conectada por un extremo a una bomba de vacío y por el otro a un capilar que se introduce en el eppendorf que contiene los gusanos de interés. Con el sistema de vacío se cargan los nematodos en la cámara o ScreenChip. Además, para facilitar la entrada de los gusanos en el capilar de la cámara y colocarlos correctamente o dar paso al siguiente individuo, se conecta el capilar del eppendorf a una jeringuilla cargada con la solución de serotonina. Cuando termina el registro de un gusano, se impulsa con la jeringuilla la entrada de otro.

El programa utilizado para el registro de los EFG es *NemAcquire*. Con él se obtuvieron datos de 21 gusanos N2 y 17 gusanos GS1894, que posteriormente se analizaron estadísticamente con el programa *NemAnalyse*, del cual se exportaron los resultados a un Excel para, finalmente, realizar un ANOVA, de diferentes variables con SPSS.

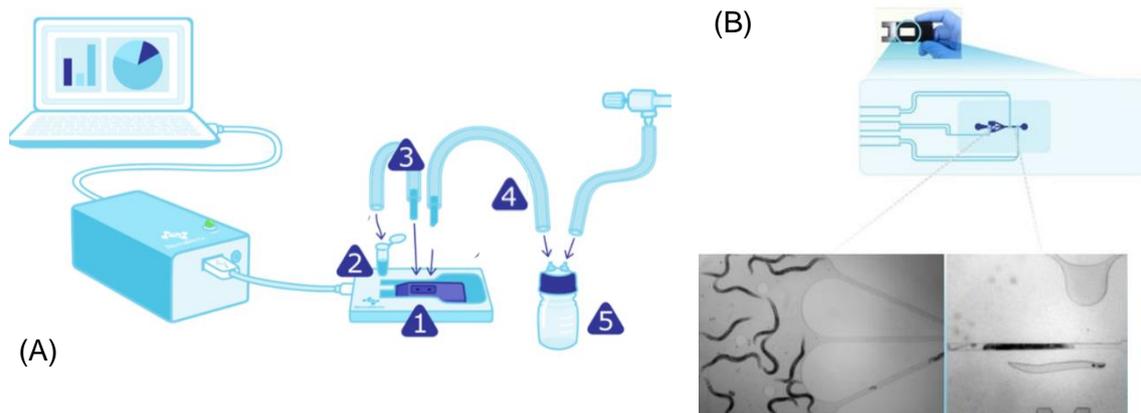


Figura 6: (A) Esquema de los componentes necesarios para realizar un electrofaringeograma. 1) ScreenChip Cartidge Nemametrix. 2) Eppendorf con los gusanos suspendidos en la disolución con serotonina. 3) y 4) capilares de conexión 5) Sistema de vacío. Modificado de (33). (B) Esquema de la cámara ScreenChip, donde los gusanos son colocados entre dos electrodos (34).

Estudios de movilidad

Se utilizaron las placas de Petri de 90 mm de diámetro explicadas en la *Tabla 1* y las cepas GS1894 y N2. Se escogió dicha línea mutante por ser la que presenta mejores resultados de supervivencia.

Primeramente, se sincronizaron los gusanos de cada cepa y se transfirieron a medios con la condición correspondiente (SCA1 y L4440). Se llevaron a cabo experimentos con diferentes tamaños muestrales para determinar cuál era el más adecuado, llegando a la conclusión de poner 55 individuos/placa para la cepa N2 y 65 individuos/placa para GS1894. Se realiza un vídeo de 2 minutos de cada placa, a días 5, 8 y 11 de edad adulta, utilizando para ello una cámara acoplada a una lupa binocular de la marca Leica, a una magnificación de 10X e intentando escoger el campo visual donde mayor número de individuos se encontrasen. Antes del inicio de cada vídeo, se traspasan a una placa nueva para tener un fondo lo más homogéneo posible y así evitar problemas en su posterior análisis informático y se golpea suavemente tres veces la base de la placa en la poyata para activar el movimiento de los gusanos.

La obtención de los resultados se realiza con el programa *ImageJ*, utilizando el *pluging Wrmtrack* para calcular los datos relativos a la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), área, velocidad media (V_{media}), *body lengths per second* (BLPS), que es otra medida de la velocidad específica de nematodos, y *body bends per second* (BBPS), que mide las veces que el cuerpo de cada individuo se curva con respecto al tiempo.

RESULTADOS

Comparativa del desarrollo de las líneas N2, AN87, RB1672 y GS1894

En las *Tablas 3, 4, 5 y 6* se recogen imágenes tomadas cada 24 horas tras el traspaso de un gusano en estadio adulto joven a cada uno de los medios indicados a continuación; placas sembradas con OP50, L4440 y *sca-1*, con el objetivo de constatar posibles diferencias en cuanto a tamaño y velocidad de desarrollo entre las líneas mutantes en *sel-12* y control. Además, se pretende observar si entre las condiciones OP50 y L4440 existen diferencias, puesto que ambas se utilizan como controles.

Todas las fotos se tomaron mediante una cámara incorporada a una lupa binocular Leica, con una magnificación total de 50X (*Tablas 3, 4, 5 y 6*). Las flechas rojas señalan la estructura en forma de media luna blanca, característica del estadio L4, mientras que las amarillas indican la protusión vulvar común en los mutantes en *sel-12*, sobre todo, en la línea AN87.

	CONDICIÓN	DÍA 1 (24h)	DÍA 2 (48h)	DÍA 3 (72h)	DÍA 4 (96h)
N2	OP50				
	L4440				
	SCA1 (10%)				

Tabla 3: Imágenes del desarrollo de la cepa N2, tomadas cada 24 horas.

	CONDICIÓN	DÍA 1 (24h)	DÍA 2 (48h)	DÍA 3 (72h)	DÍA 4 (96h)
AN	OP50	-			
	L4440	-			
	SCA1 (10%)	-			

Tabla 4: Imágenes del desarrollo de la cepa AN87, tomadas cada 24 horas.

	CONDICIÓN	DÍA 1 (24h)	DÍA 2 (48h)	DÍA 3 (72h)	DÍA 4 (96h)
RB	OP50	-	-		
	L4440	-			
	SCA1 (10%)	-			

Tabla 5: Imágenes del desarrollo de la cepa RB1672, tomadas cada 24 horas.

	CONDICIÓN	DÍA 1 (24h)	DÍA 2 (48h)	DÍA 3 (72h)	DÍA 4 (96h)
GS	OP50				
	L4440				
	SCA1 (10%)				

Tabla 6: Imágenes del desarrollo de la cepa GS1894, tomadas cada 24 horas.

En la *Figura 7.A)* del Anexo, se muestra la comparación cuantitativa del tamaño de las diferentes cepas, con la condición correspondiente, a lo largo del tiempo. Los datos se obtienen tras el análisis del área con el programa *ImageJ*.

Primeramente, se puede observar un retraso temporal en la puesta de huevos de las líneas AN87 y RB1672, en comparación con la cepa control, N2. Sin embargo, la puesta no se corresponde con el tamaño de las larvas control post-eclosión. Así mismo, se observa un adelanto del desarrollo de todas las líneas en presencia de *sca-1*, visible por la estructura de media luna mencionada anteriormente, que caracteriza el estadio L4.

En cuanto a las condiciones estudiadas; OP50, L4440 y *sca-1*, se opta por comparar el tamaño de las diferentes cepas a día 4, cuando naturalmente se alcanzaría el estadio adulto joven, correspondiente al de mayor envergadura, *Figura 7*. En las cuatro cepas, el mayor tamaño se alcanza en presencia de *sca-1*, seguido de L4440 y, por último, OP50. No es posible analizar las diferencias ya que solo se tomó una imagen por cepa.

Finalmente, se destaca que con L4440, los individuos presentan un tamaño mayor que con OP50.

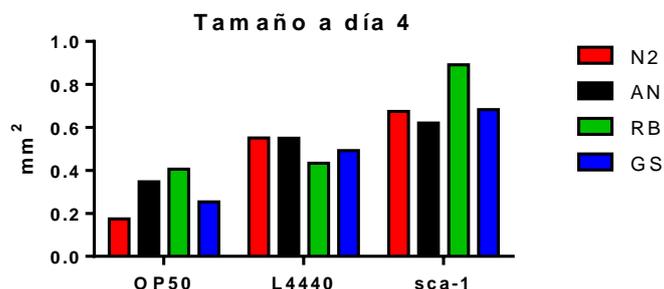


Figura 7: Comparativa del tamaño (mm²) de las cepas estudiadas en diferentes condiciones.

Fertilidad

Se llevaron a cabo 3 experimentos de fertilidad por cada línea y para cada condición.

Se tomaron los datos correspondientes a la condición control OP50 para realizar la comparación de la fertilidad de las cepas mutantes en *sel-12* y la cepa control, tanto de la puesta por día de cada uno de los gusanos como de la puesta total, *Figura 8 (A)* y *(B)*, respectivamente. En ellas se representa que las tres cepas mutantes AN87, RB1672 y GS1894 ponen significativamente menor cantidad de huevos (al día y totales) con respecto a la línea control, N2. Por el contrario, no existen diferencias significativas en la puesta total entre las cepas mutantes.

Además, se observa que las líneas AN87 y RB1672 no ponen huevos hasta día 2 y 3, respectivamente, *Figura 8 (A)*.

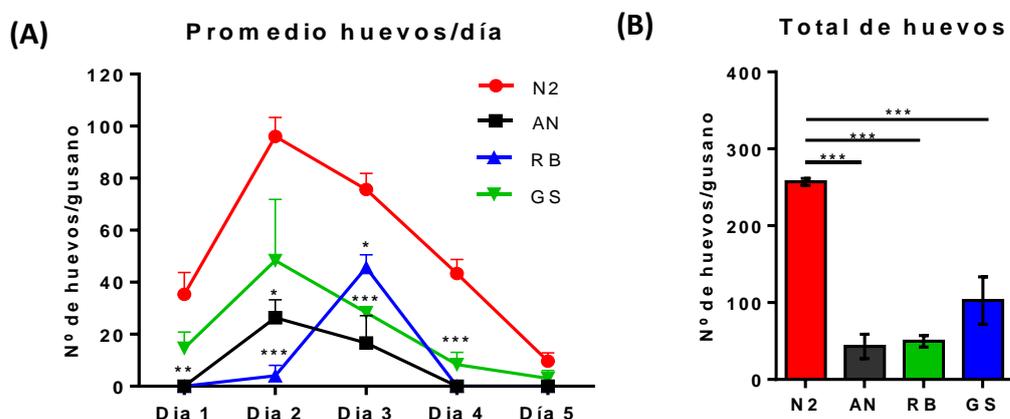
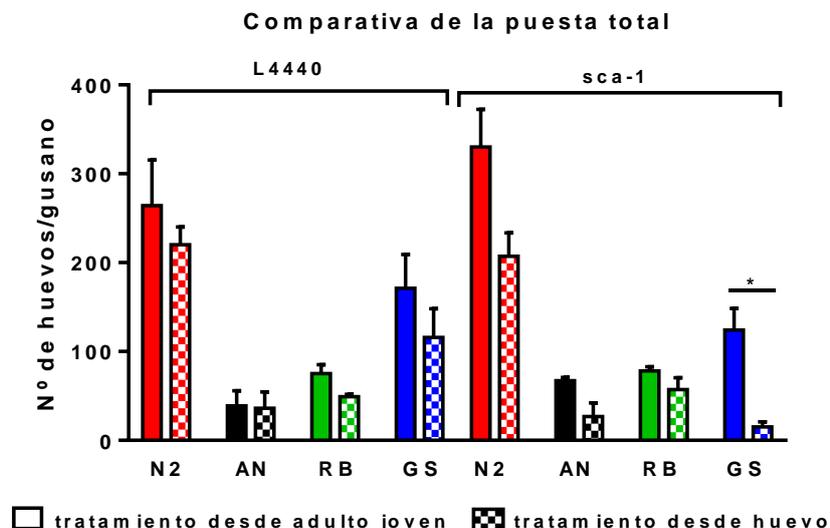


Figura 8: (A) Número de huevos al día y (B) Puesta total de un gusano de cada cepa estudiada en la condición control OP50 (n=3). *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: \pm error estándar.

Por otro lado, se analizó la puesta total mediante el test ANOVA, con el objetivo de ver si *sca-1* rescata la función reproductora alterada en los mutantes. Se concluye que no se restaura la fertilidad en ninguna de las líneas, *Figura 9*, aunque sí se mantienen las diferencias entre las cepas mutantes y control.

Posteriormente, se llevaron a cabo experimentos en los que se comparó la presencia de *sca-1* desde la fase de huevo con su administración desde el estadio adulto joven.

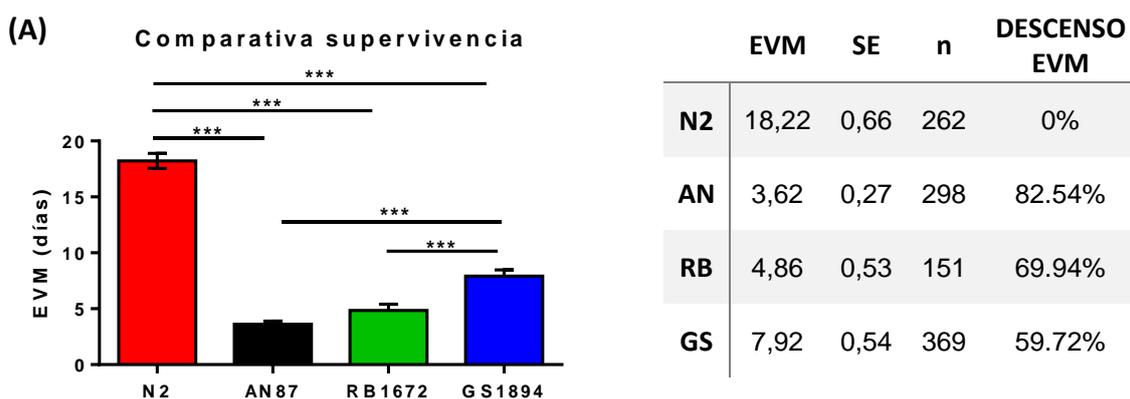
En ellos, se encontraron diferencias significativas para la línea GS194, en la que el tratamiento con *sca-1* desde la fase de huevo disminuía aún más la puesta, *Figura 9*.



*Figura 9: Gráfica comparativa de la puesta total de cada cepa bajo la aplicación del tratamiento con *sca-1* desde adulto joven o desde fase de huevo, (n=3). *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: ± error estándar.*

Curvas de mortalidad

Se realizaron 6 experimentos de mortalidad para cada cepa, con un tamaño de muestra total de 3.691 individuos, (n=3.691). En todos ellos se confirma que la supervivencia de las tres cepas mutantes es significativamente menor que la de la cepa control, N2. Así mismo, entre las líneas mutantes, GS1894 es la que presenta una esperanza de vida significativamente mayor, no existiendo diferencias entre AN87 y RB1672, *Figura 10*.



*Figura 10: (A) Esperanza de vida media (EVM) de las cepas N2, AN87, RB1672 y GS1894 en condiciones control, L4440. (B) Tabla del estudio estadístico y cálculo del descenso de la esperanza de vida media de las cepas mutadas con respecto al control. *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: ± error estándar (SE).*

En los ensayos de mortalidad se evaluaron las condiciones: iRNA *sca-1* al 10% y L4440 (control), desde el estadio de adulto joven o desde fase de huevo, con el fin de determinar la posibilidad de rescate fenotípico de los mutantes. Los resultados de AN78

y RB1672 con iRNA *sca-1* no mostraron señales de recuperación con respecto a la cepa control, N2.

Sin embargo, sí se observó un aumento significativo de la supervivencia de la línea GS tratada desde el estadio adulto joven con iRNA *sca-1*, en comparación con la condición control, *Figura 11 A) y B)*. Los mismos resultados se vieron en la línea control, N2, *Figura 11 C)*. La mortalidad representada en la *Figura 11 D)*, sufrió una contaminación en *E.coli* SCA1 y por ello muestra resultados contradictorios.

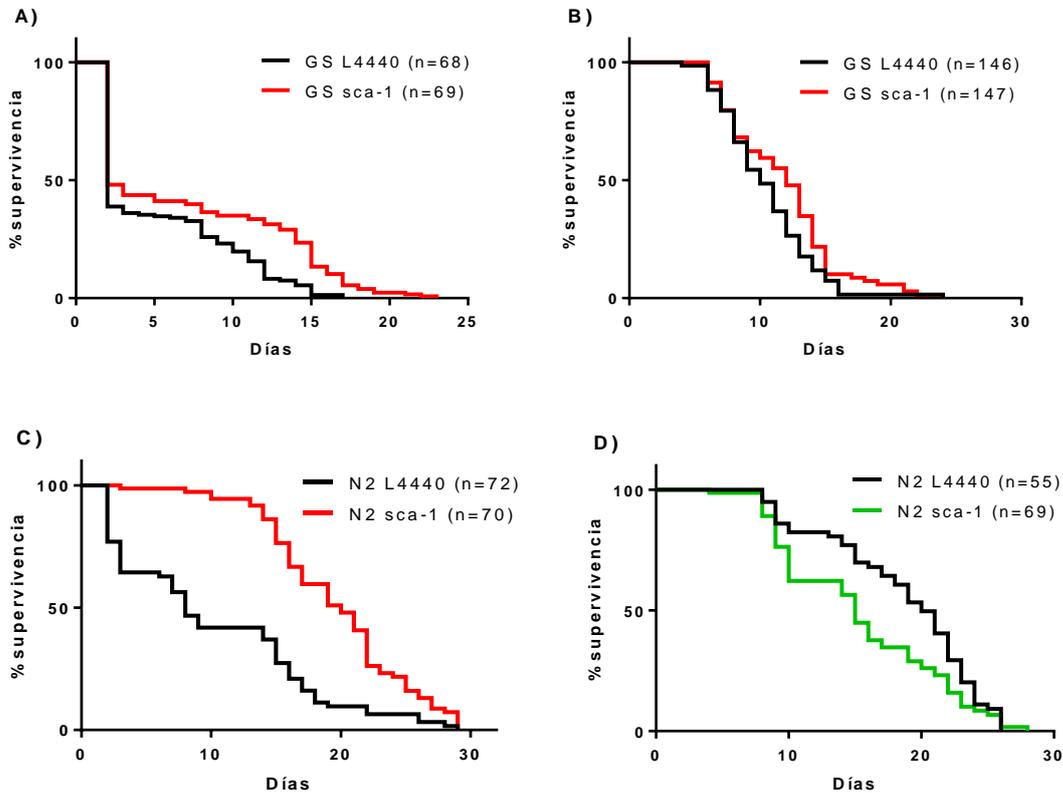


Figura 11: A) y B) Curvas de supervivencia de la cepa GS1894 y C) y D) de la cepa N2, en las condiciones sca-1 y L4440 aplicadas desde el estadio adulto joven.

Finalmente, los ensayos de mortalidad con presencia de iRNA *sca-1* y L4440 desde la fase de huevo, *Figura 12*, mostraron una disminución significativa de la supervivencia de N2 con iRNA *sca-1* con respecto a su control, coincidiendo con los resultados bibliográficos previos.

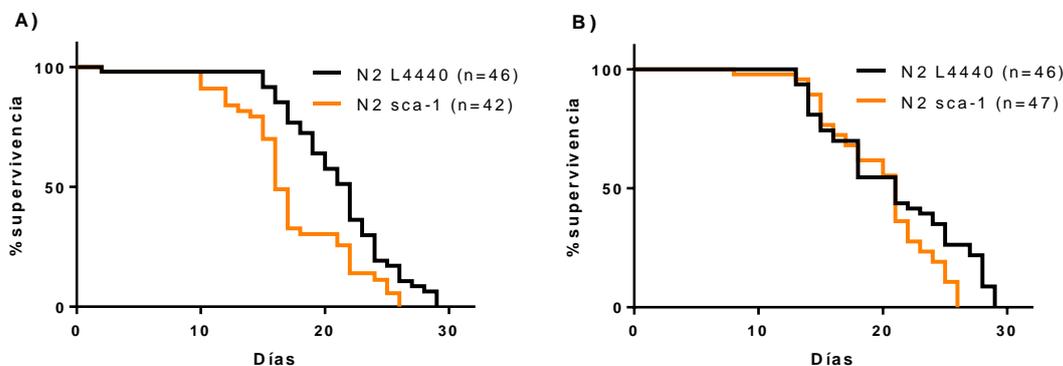


Figura 12: A) y B) Curvas de supervivencia de la cepa N2, en las condiciones sca-1 y L4440 desde la fase de huevo.

Electrofaringeograma (EFG)

Se realizó un experimento EFG por cada línea, con un tamaño muestral de 21 gusanos para N2 y 17 para GS1894, *Figura 13*. Se escogió la cepa mutante GS1894 por ser la línea que mayor supervivencia y movilidad presenta en la fase adulta.

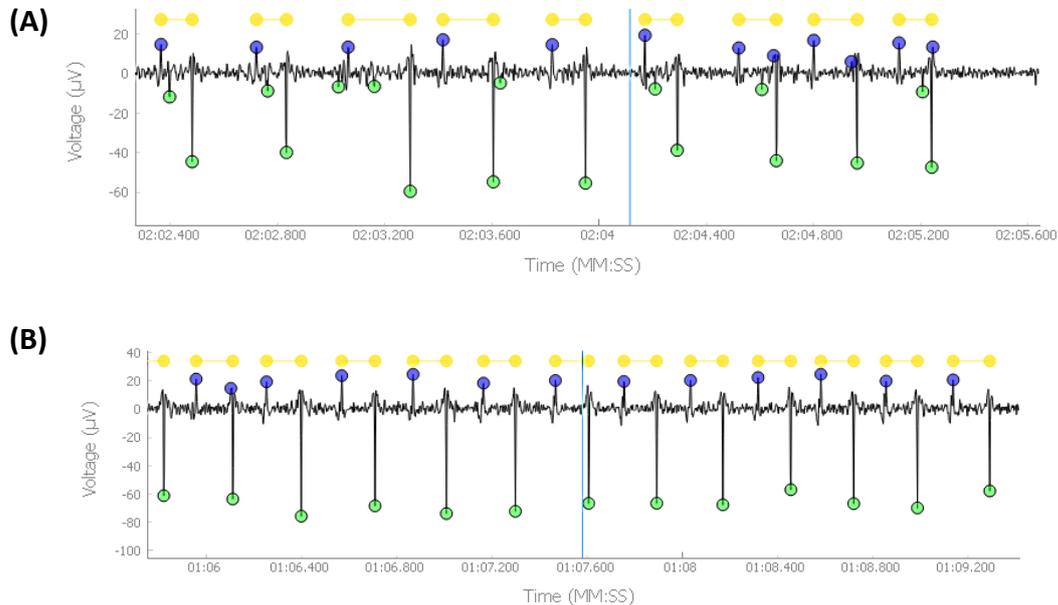
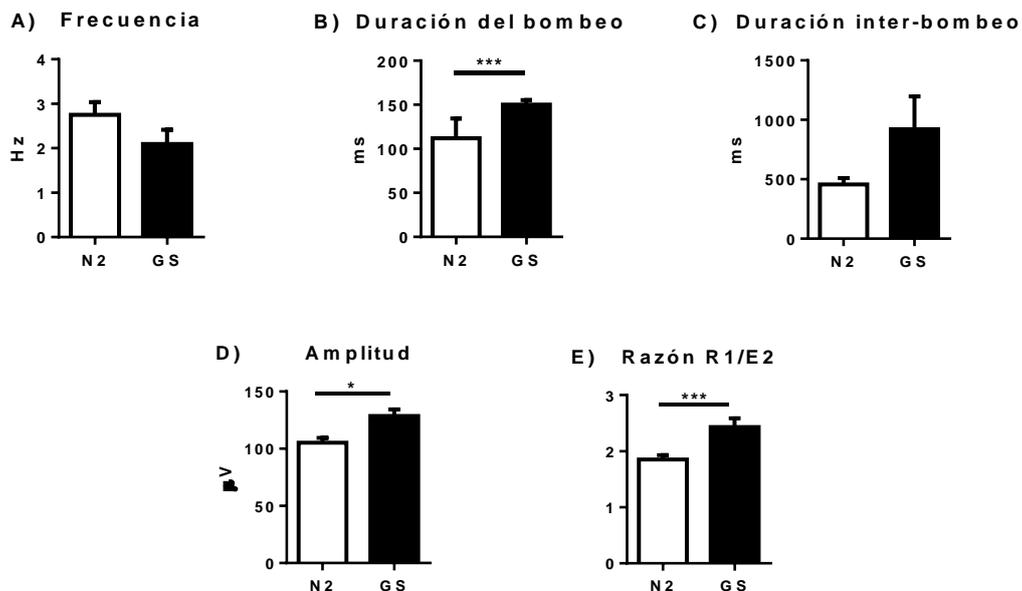


Figura 13: Registros del cambio de voltaje durante los bombeos faríngeos a lo largo de 3 segundos de (A) N2 y (B) GS1894.

Las variables representadas en la *Figura 14* se registran con el programa NemAnalyse. Posteriormente se someten a un ANOVA, por medio del cual se observa que la línea mutante GS1894 presentan los valores correspondientes a la duración del bombeo, amplitud y razón R1/E2 significativamente más altos que la cepa control, N2.

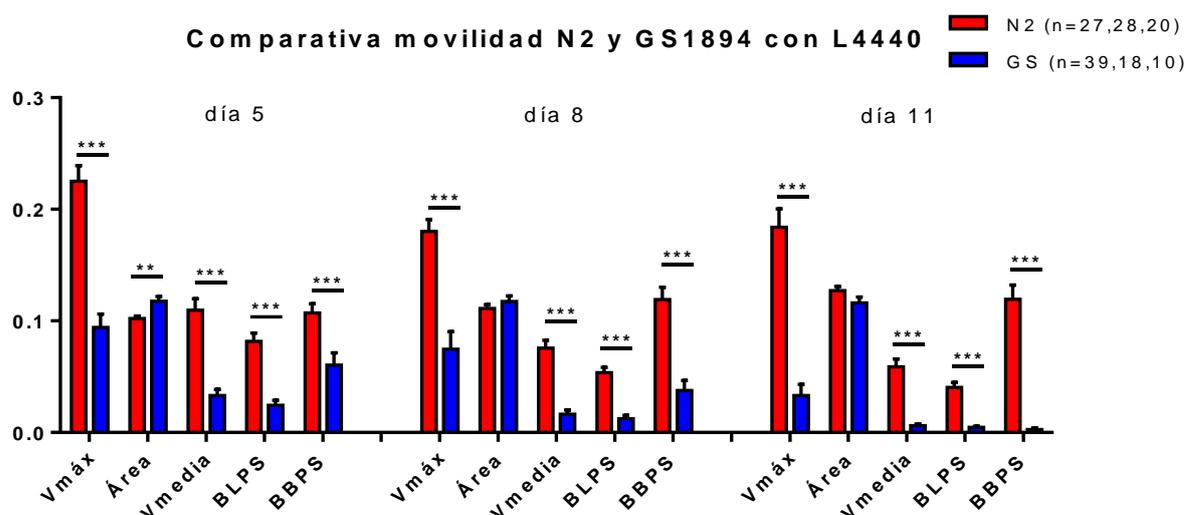


*Figura 14: Comparación de las variables (A) Frecuencia, (B) Duración del bombeo, (C) Duración inter-bombeo, (D) Relación entre el pico de repolarización R1 y el pico de despolarización E2 y (E) Amplitud, de las cepas GS1894 (n=17) y N2 (n=21). *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: \pm error estándar.*

Movilidad

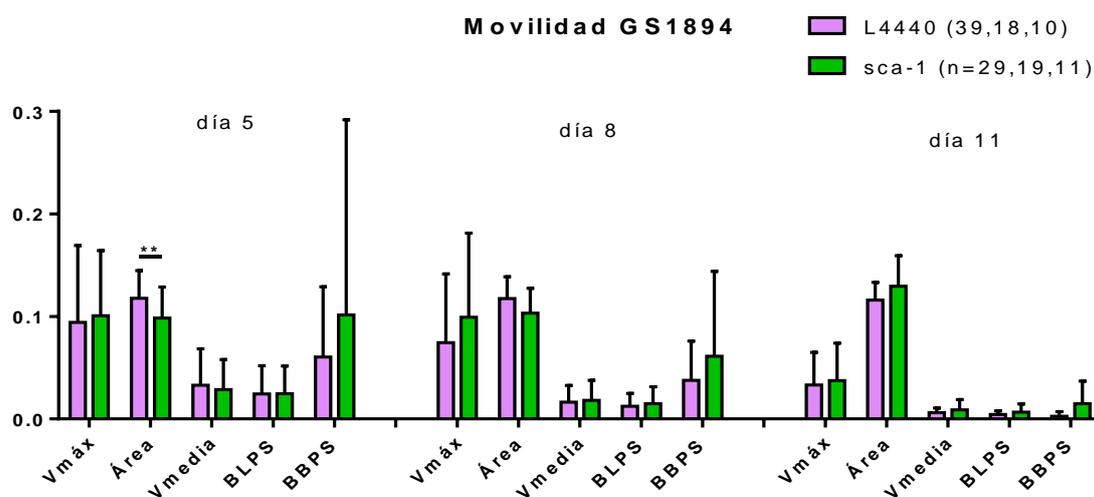
Los experimentos de movilidad hacen referencia a la calidad de vida de los gusanos. Se decidió analizar los mutantes GS1894 de las tres cepas alteradas en *sel-12* por ser los que mayor esperanza de vida presentan, así como una mejor función locomotora aparente.

Se analizaron vídeos de 2 minutos de las cepas GS1894 y N2 en la condición control L4440, a 5, 8 y 11 días de fase adulta, con el programa *ImageJ* (*plugging Wrmtrack*) para calcular los datos relativos a diversas variables de velocidad, tamaño y giro, *Figura 15*. Se observa que la línea mutante GS1894 presenta todas las variables de movilidad analizadas disminuidas significativamente con respecto a la cepa salvaje, N2, excepto en el área, pues es mayor en los mutantes a día 5 y no significativa a día 8 y 11.



*Figura 15: Gráfica comparativa de las variables de movilidad a días 5, 8 y 11 de N2 y GS con L4440. *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: ± error estándar.*

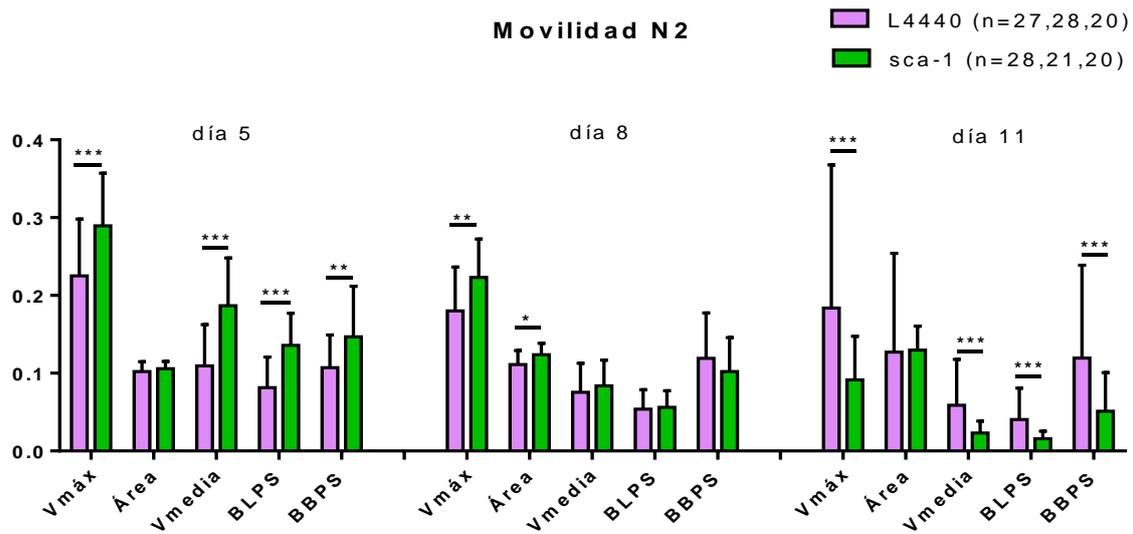
A continuación, se realizaron los mismos experimentos con iRNA *sca-1* desde la fase de adulto joven, con el fin de observar rescate en el fenotipo de GS1894, *Figura 16*.



*Figura 16: Comparativa de las variables de movilidad de GS1894 a días 5, 8 y 11 con L4440 y *sca-1*. *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: ± error estándar.*

De forma subjetiva, en los experimentos anteriores sí parecía existir una mejoría de la línea mutante tratada con *sca-1*, con respecto a L4440. Sin embargo, el análisis estadístico muestra lo contrario, presentando las mismas diferencias significativas que en el experimento control, *Figura 16*. Los resultados observados difieren tanto de los esperados, que se plantea la búsqueda de otros métodos como herramienta de evaluación futura de la movilidad de los gusanos.

Por último, se destaca que la cepa control N2 con *sca-1* sí presenta efectos significativamente positivos en relación a la movilidad el día 5, mientras que con el paso del tiempo dichas mejoras se pierden, empeorando significativamente la movilidad a día 11, *Figura 17*.



*Figura 17: Comparativa de las variables de movilidad de N2 a días 5, 8 y 11 con L4440 y sca-1. *p-valor < 0,05, ** p-valor < 0,01, ***p-valor < 0,005; Barras de error: ± error estándar.*

DISCUSIÓN

El estudio descriptivo de tres cepas con diferentes mutaciones en el gen *sel-12* en *C.elegans* muestra notables diferencias fenotípicas con respecto a la línea utilizada como control. El gen *sel-12* es ortólogo al gen PSEN2 de humanos, codificante para la presenilina 2, una aspartil proteasa cuyas mutaciones están estrechamente relacionadas con los casos de Alzheimer familiar y de origen temprano.

Las líneas mutantes AN87, RB1672 y GS1894 presentan diferentes alteraciones en *sel-12*. A lo largo del presente trabajo se han evaluado diferentes funciones fisiológicas a través de diversos experimentos con el fin de llevar a cabo un estudio fisiopatológico de dichas líneas. Además, de forma paralela a los ensayos realizados, se ha estudiado el comportamiento de las mismas cepas bajo el tratamiento con iRNA *sca-1*, iRNA silenciador de la SERCA probado en este estudio como posible terapia frente a los efectos descritos en la bibliografía de dicha mutación génica.

Las cepas AN87 y RG1672, crecen de forma más lenta que GS1894 y N2 (control), *Tablas 3, 4, 5 y 6*, aunque el tamaño de AN87 y RB1672 no se retrasa con respecto a GS y N2, lo que se sugiere que su desarrollo se mantiene en el interior de la madre más tiempo. Además, el tratamiento con iRNA *sca-1* reveló un mayor tamaño aparente de los gusanos en todas las cepas.

Con relación a la fertilidad, las líneas mutantes en *sel-12* tienen una puesta de huevos significativamente menor que la cepa control, *Figura 8*, lo que sugiere que las cepas modificadas tienen alterada la función reproductora, que es coherente con el papel descrito para este gen en la bibliografía como partícipe en la oviposición. Además, se muestra que las líneas AN87 y RB1672 no ponen huevos hasta día 2 y 3, respectivamente, *Figura 8 (A)*, que corresponde con los datos obtenidos en los experimentos de crecimiento. Así mismo, se determina la ausencia de reversión de la fertilidad tras el tratamiento con iRNA *sca-1* en diferentes fases del desarrollo de *C.elegans*.

Los efectos de la mutación de *sel-12* también afectan a la esperanza de vida de los nematodos, pues AN87, RB1672 y GS1894 disminuyen la supervivencia un 83%, 70% y 60% aproximadamente, con respecto a N2. Del mismo modo, AN87 y RB1672 también presentan una esperanza de vida menor que GS1894. La aplicación de iRNA *sca-1* en los ensayos de mortalidad, supuso mejoras significativas en GS1894, que aumentó la supervivencia en comparación con el tratamiento control, aunque sin llegar a la reversión fenotípica completa. También, iRNA *sca-1* aumentó la esperanza de vida de la línea salvaje control, *Figura 11 (A) y (B)*.

El estudio electrofisiológico está alterado en la cepa GS1894 con respecto al control, pues la primera presenta valores significativamente más altos en la duración del bombeo, amplitud y razón R1/E2, *Figuras 13 y 14*. El aumento de la razón R1/E2 se correlaciona con el incremento de la amplitud de cada bombeo, entendiendo esta como la suma en valor absoluto de la despolarización E2 y repolarización R1. Además, es frecuente que el aumento de la amplitud y ratio R1/E2 incrementen la duración del bombeo.

Otro efecto de la mutación en *sel-12* se relaciona con alteraciones en la locomoción de los gusanos. Las líneas mutantes tienen afectada su movilidad de forma notable. La que mejor estado presenta en este aspecto es GS1894, e incluso ésta, tiene deficiencias significativas con respecto a N2 en todos los parámetros móviles estudiados, *Figura 15*. Ni siquiera el tratamiento con *sca-1* revierte las consecuencias de la alteración génica. Sin embargo, el iRNA sí presenta efectos positivos a corto plazo en el control N2, que se vuelven perjudiciales con el paso del tiempo, *Figura 17*.

CONCLUSIONES

1. Las líneas AN87 y RB1672 con alteraciones en *sel-12* presentan un retraso en el crecimiento con respecto a la cepa, también mutante, GS1894 y N2 (control), pero no en el tamaño extra-uterino. Además, el tratamiento con iRNA *sca-1* aumenta el área de cada individuo en todas las líneas.
2. La tasa de fertilidad de las tres líneas mutantes es significativamente menor que la de la cepa salvaje. Además, las cepas AN87 y RB1672 no ponen huevos los primeros dos días posteriores tras alcanzar estadio adulto joven.
3. También se ve disminuida la supervivencia de las tres líneas mutantes en comparación con el control, siendo significativamente mayor la de GS1894 que la de AN87 y RB1672.
4. En el EFG, la duración del bombeo, amplitud y relación R1/E2 están significativamente aumentadas en GS1894 con respecto a N2.
5. La movilidad de las cepas mutantes está visiblemente alterada. La línea GS1894 tiene valores disminuidos significativamente en todas las variables estudiadas, relacionadas con la locomoción del gusano, comparados con N2.
6. El tratamiento iRNA *sca-1* no rescata el fenotipo relativo a la fertilidad o movilidad de las líneas alteradas. Sin embargo, sí aumenta la esperanza de vida de la cepa GS1894 e incluso de la línea control, N2. Además, *sca-1* mejora la movilidad a corto plazo en los adultos N2, pero la empeora a medida que pasa el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD. 2016.
2. Demencia [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Brody H, Grayson M, Mandavilli A, Scully T, Haines N. Alzheimer's disease. Vol. 475, Nature. 2011.
4. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. Vol. 14, International Journal of Nanomedicine. Dove Medical Press Ltd.; 2019. p. 5541–54.
5. Aisen PS, Cummings J, Jack CR, Morris JC, Sperling R, Frölich L, et al. On the path to 2025: Understanding the Alzheimer's disease continuum. Vol. 9, Alzheimer's Research and Therapy. BioMed Central Ltd.; 2017.
6. Silva MVF, Loures CDMG, Alves LCV, De Souza LC, Borges KBG, Carvalho MDG. Alzheimer's disease: Risk factors and potentially protective measures. J Biomed Sci. 2019 May 9;26(1).
7. Duncan T, Valenzuela M. Alzheimer's disease, dementia, and stem cell therapy. Stem Cell Res Ther. 2017 May 12;8(1):1–9.
8. Fedeli C, Filadi R, Rossi A, Mammucari C, Pizzo P. PSEN2 (presenilin 2) mutants linked to familial Alzheimer disease impair autophagy by altering Ca²⁺ homeostasis. Autophagy. 2019 Dec 2;15(12):2044–62.
9. Cai Y, An SSA, Kim S. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. Clin Interv Aging. 2015;10:1163–72.
10. P49810 | SWISS-MODEL Repository [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P49810?csm=A927EEC623468116>
11. Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, et al. Presenilins Form ER Ca²⁺ Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations. Cell. 2006 Sep 8;126(5):981–93.
12. Shen P, Yue Y, Park Y. A living model for obesity and aging research: *Caenorhabditis elegans*. Vol. 58, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 741–54.
13. Peña ZM, Vazquez DMP, Sánchez MG, Olivo LAS, Tipacamú GA, Carbajal FA. El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo para evaluar el potencial antihelmíntico de extractos de plantas. Rev Mex Ciencias Pecu. 2017 Jul 1;8(3):279–89.
14. Griffin EF, Caldwell KA, Caldwell GA. Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*. Vol. 8, ACS Chemical Neuroscience. American Chemical Society; 2017. p. 2596–606.
15. Gene: PSEN2 (ENSG00000143801) - Orthologue alignment - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 104 [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Ortholog/Alignment?db=core;g=ENSG00000143801;g1=WBGene00004769;hom_id=161461912;r=1:226870184-226927726
16. sel-12 - Presenilin sel-12 - *Caenorhabditis elegans* - sel-12 gene & protein [Internet]. [cited 2021 Jun 30]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprot/P52166#function>
17. sel-12 (gene) - WormBase : Nematode Information Resource [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from:

- https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004769#0-9f6-10
18. Sarasija S, Laboy JT, Ashkavand Z, Bonner J, Tang Y, Norman KR. Presenilin mutations deregulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and metabolic activity causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Elife*. 2018 Jul 10;7.
 19. Zwaal RR, Van Baelen K, Groenen JTM, Van Geel A, Rottiers V, Kaletta T, et al. The Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase Is Required for Development and Muscle Function in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43557–63.
 20. AN87 (strain) - WormBase : Nematode Information Resource [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00000196#03--10
 21. RB1672 (strain) - WormBase : Nematode Information Resource [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00032365#03--10
 22. Wu G, Hubbard EJA, Kitajewski JK, Greenwald I. Evidence for functional and physical association between *Caenorhabditis elegans* SEL-10, a Cdc4p-related protein, and SEL-12 presenilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15787–91.
 23. GS1894 (strain) - WormBase : Nematode Information Resource [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: https://wormbase.org/species/c_elegans/strain/WBStrain00008029#03--10
 24. Sterken MG, Snoek LB, Kammenga JE, Andersen EC. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. Vol. 31, *Trends in Genetics*. Elsevier Ltd; 2015. p. 224–31.
 25. Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2015;200(2):387–407.
 26. Wang H, Zhao Y, Zhang Z. Age-dependent effects of floxuridine (FUdR) on senescent pathology and mortality in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Feb 12;509(3):694–9.
 27. Marbach A, Bettenbrock K. Lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *J Biotechnol*. 2012 Jan;157(1):82–8.
 28. Arata Y, Oshima T, Ikeda Y, Kimura H, Sako Y. OP50, a bacterial strain conventionally used as food for laboratory maintenance of *C. elegans*, is a biofilm formation defective mutant. *microPublication Biol*. 2020;2020.
 29. Trojanowski NF, Raizen DM, Fang-Yen C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Sci Rep*. 2016 Mar 15;6.
 30. Dillon J, Andrianakis I, Bull K, Glautier S, O'Connor V, Holden-Dye L, et al. AutoEPG: Software for the analysis of electrical activity in the microcircuit underpinning feeding behaviour of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2009;4(12).
 31. Trojanowski NF, Raizen DM, Fang-Yen C. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Sci Rep*. 2016 Mar 15;6(1):1–10.
 32. Raizen DM, Avery L. Electrical activity and behavior in the pharynx of *caenorhabditis elegans*. *Neuron*. 1994;12(3):483–95.
 33. ScreenChip System Setup.
 34. (No Title) [Internet]. [cited 2021 Jun 21]. Available from: <https://invivobiosystems.com/wp-content/uploads/2017/04/Experiment-guide-NemaMetrix.pdf>

ANEXOS

Comparativa del desarrollo de las líneas N2, AN87, RB1672 y GS1894

Representación cuantitativa del tamaño de los *C.elegans* con respecto al tiempo, desde huevo, pasando por su desarrollo larvario; L1-L2-L3-L4, hasta el estadio de adulto joven.

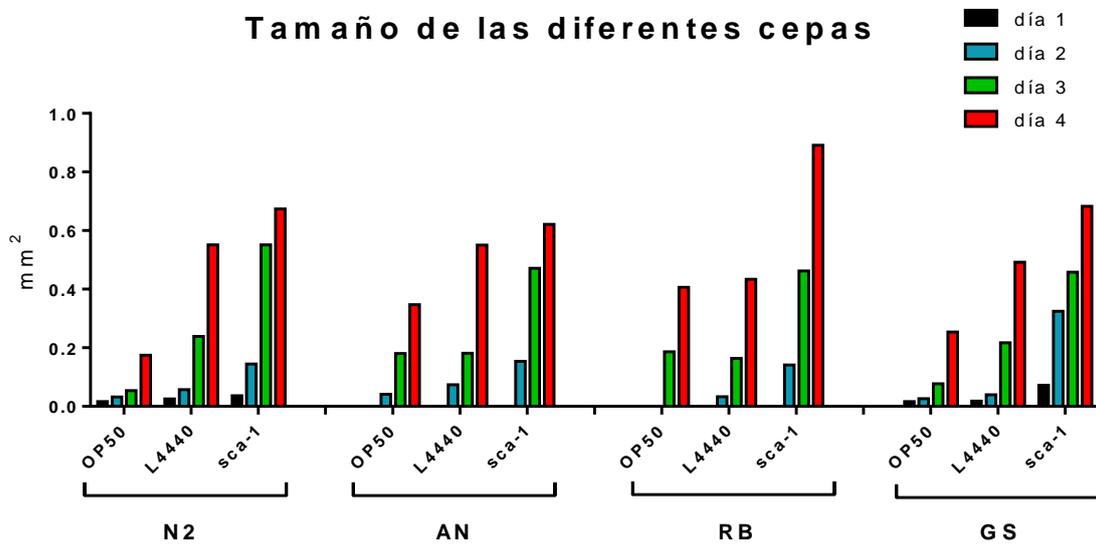


Figura 7.A): Gráfica comparativa del tamaño (mm^2) de las 4 líneas estudiadas en las condiciones OP50, L4440 y sca-1, a lo largo del tiempo.