



Universidad de Valladolid

EsDUVa

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

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

eat-3* Homólogo de OPA1 en *Caenorhabditis elegans

NICOLÁS GARCÍA MIRALLES

Directores: Dra. Rosalba Fonteriz
Dra. Mayte Montero

Valladolid, Septiembre 2019

Índice

1. Introducción	3
1.1. OPA1	3
1.2. Caenorhabditis elegans	6
1.2.1. Modelo para la investigación	6
1.2.2. Ciclo de vida y desarrollo	6
1.2.3. Sistema muscular	7
1.2.4. Faringe	7
1.2.5. Sistema nervioso	9
1.3. Hipótesis	10
1.4. Objetivos	10
2. Materiales y métodos	11
2.1. Cepas	11
2.2. Preparación de placas de agar	11
2.3. Preparación de placas de agar con FuDR	11
2.4. Sincronización de huevos	12
2.5. Curvas de mortalidad	12
2.6. Electrofaringeograma (EFG)	13
2.6. Ca²⁺ mitocondrial	16
2.7. Materiales y reactivos	17
3. Resultados	19
3.1. Comparativa de desarrollo desde la eclosión del huevo	19
3.2. Mortalidad	20
3.4. Medidas de Ca²⁺ mitocondrial	23
4. Discusión	26
5. Conclusiones	26
6. Bibliografía	27

Abreviaturas:

MMI: Membrana mitocondrial interna

MME: Membrana mitocondrial externa

EI: Espacio intermembrana

AOD: Atrofia óptica dominante

FuDR: 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FuDR)

EFG: Electrofaringeograma

NGM: Nematode growth médium

ADNmt: Acido desoxirribonucleico mitocondrial

RC: Restricción calórica

Palabras clave: *Caenorhabditis elegans*, electrofaringeograma, OPA1, *eat-3*, Ca²⁺ mitocondrial.

1. Introducción

1.1. OPA1

La dinámica mitocondrial está regulada por dos conjuntos de procesos: fusión y fisión, y biogénesis y degradación (incluida la mitofagia), sumándose a ellos el transporte intracelular. Estos procesos mantienen la homeostasis, regulan la forma, el volumen y la función mitocondrial, y son procesos críticos en la respuesta al estrés celular (Meyer et al., 2017).

Las mitocondrias se fusionan en un proceso que requiere de GTPasas de la membrana mitocondrial interna (MMI), externa (MME) y el espacio intermembrana (EI). En los seres humanos, estas proteínas son: OPA1, MMI y EI, y mitofusinas 1 y 2 en MME (Meyer et al., 2017).

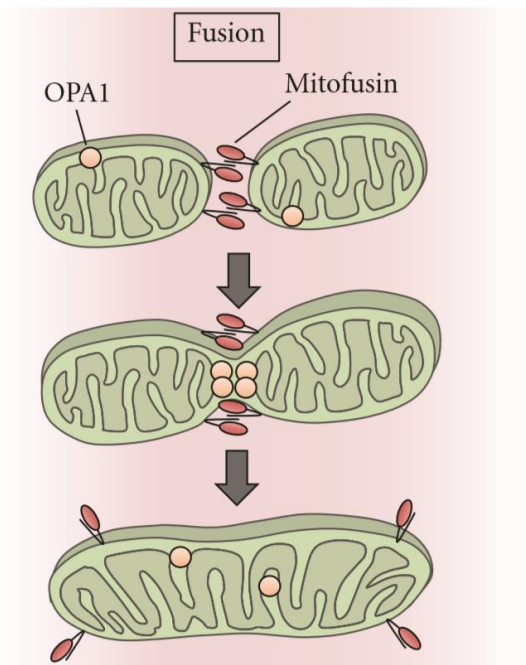


Figura 1: La fusión es impulsada por OPA1 y mitofusinas. Las interacciones entre estas proteínas hacen que se unan dos mitocondrias adyacentes. Las mitofusinas median la fusión de la membrana externa mitocondrial, mientras que OPA1 media la fusión de la membrana interna mitocondrial. (Kanamaru et al., 2012).

OPA1 es una GTPasa relacionada con la proteína mitocondrial dinamina que controla la dinámica mitocondrial, la integridad de las crestas, la energía mitocondrial, el ensamblaje de los supercomplejos de la cadena respiratoria y el mantenimiento del ADN mitocondrial (ADNmt). OPA1 también está implicada en la regulación de la apoptosis mediada por la mitocondria. Se ha demostrado que participa en la regulación de la homeostasis del pH y del Ca^{2+} mitocondrial (Delettre et al., 2002).

El gen *OPA1* abarca más de 90 kb y está compuesto por 29 exones (Delettre et al., 2002). Se ha determinado la presencia en humanos de ocho isoformas diferentes de

OPA1, derivadas del splicing alternativo de los exones 4, 4b y 5b que a su vez se dividen en combinaciones de estructuras largas ancladas a la membrana mitocondrial interna y estructuras cortas solubles, situadas en el espacio intermembrana mitocondrial. Este conjunto de isoformas proporciona la flexibilidad necesaria para configurar la dinámica mitocondrial frente a situaciones metabólicas desfavorables o estrés, que pueden alterar la homeostasis celular (Del Dotto et al., 2017).

Estudios de Northern blot de numerosos tejidos humanos (cerebro fetal, retina, corazón, tiroides, riñón, pulmón, piel, ovario, músculo esquelético, hígado y colon) determinaron que OPA1 se encuentra en todos ellos, diferenciándose en la presencia de unas u otras isoformas de OPA1. Ensayos inmunohistoquímicos revelaron una gran cantidad de proteínas OPA1 en células ganglionares de la retina, debido a la alta concentración de mitocondrias que contienen estas células para hacer frente a la alta demanda energética (Delettre et al., 2002).

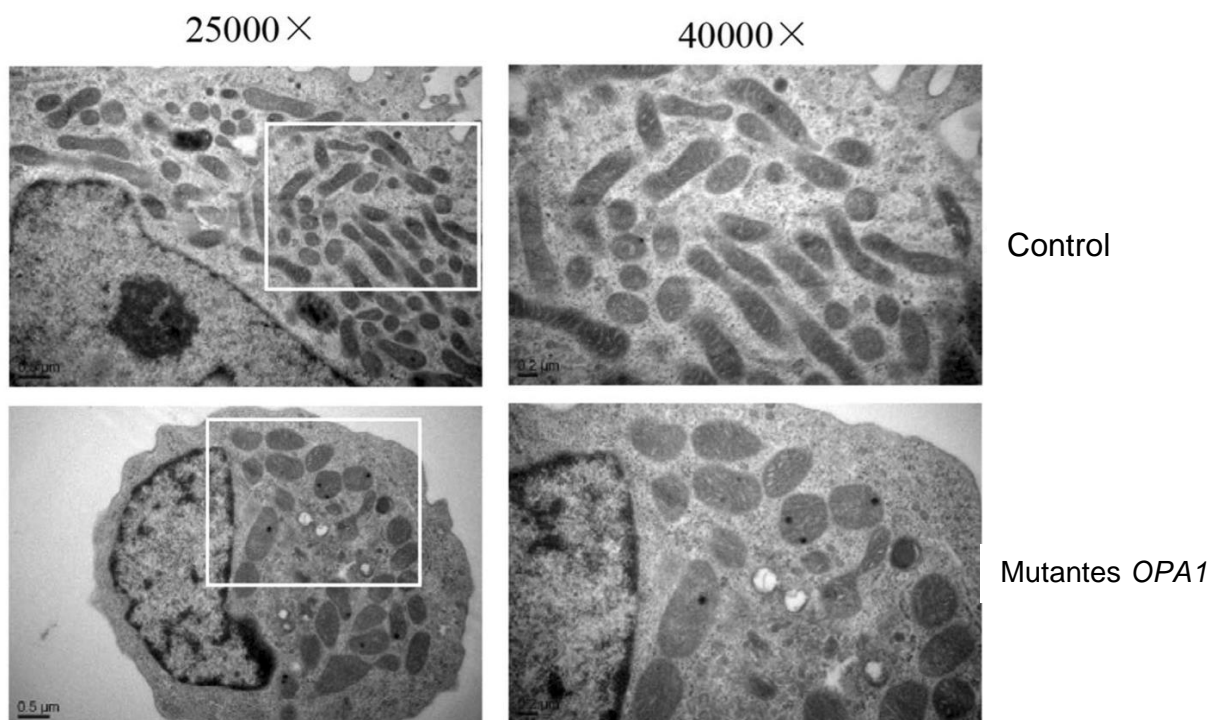


Figura 2: Imagen de microscopía electrónica de linfoblastos humanos donde se observa una distribución irregular de las mitocondrias en los mutantes comparada con las control que se distribuyen tubularmente (Zhang et al., 2017).

Mutaciones en el gen *OPA1*, que codifican proteínas defectuosas, provocan una morfología mitocondrial anormal, afectando a las crestas y mostrando una estructura mitocondrial inflamada, a esto se suma una fragmentación mitocondrial (Fig. 2). Las células con gen *OPA1* mutado exhiben una distribución irregular de mitocondrias. El número de copias de ADNmt en células mutadas es menor que en células control (Zhang et al., 2017). La mayoría de las mutaciones del gen *OPA1* codifican proteínas que carecen de un dominio GTPasa completo (Kushnareva et al., 2016).

La alteración de las crestas mitocondriales, causada por proteínas OPA1 defectuosas genera cambios en los complejos de la cadena de transporte de electrones, que participan en la fosforilación oxidativa, afectando a los niveles de producción de ATP. En estas mismas células, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) disminuye y se produce un aumento de ROS. Los niveles de proteínas relacionadas con la apoptosis PARP y las caspasas 3, 7 y 9 aumenta en células con mutaciones en OPA1(Zhang et al., 2017).

Estudios en pacientes con un diagnóstico de atrofia óptica dominante (AOD) demostraron que hasta un 89% de ellos eran portadores de una mutación en OPA1, siendo estas mutaciones de diversa naturaleza: por delección/inserción de base (37%), mutaciones "missense" (26%), mutaciones "nonsense" (14%) y mutaciones por "splicing" (23%) (Delettre et al., 2002).

La AOD es una de las principales causas de ceguera hereditaria. La AOD es una enfermedad ocular progresiva causada por la degeneración de la capa de células ganglionares de la retina con atrofia ascendente del nervio óptico. La forma más prevalente de AOD está causada por mutaciones heterocigóticas en la proteína OPA1 codificada en núcleo, pero dirigida a mitocondria (Kanazawa et al., 2008). Cursa con escotomas centrales (perdida absoluta o parcial de la visión en una región del campo visual), tritanopia (alteración de la visión cromática que afecta al espectro visible de los tonos azules) y pérdida de agudeza visual de leve a ceguera total (Delettre et al., 2002).

El gen *eat-3* en *C. elegans* codifica un miembro de la familia de las dinaminas mitocondriales homólogo a OPA1 en humanos y MGM1 en levaduras. Mutaciones en el locus *eat-3* de *C. elegans* provocan fragmentaciones en las mitocondrias (Fig. 3). Esto es similar a lo que ocurre en levaduras y mamíferos con mutaciones en OPA1 y *mgm1* (Kanazawa et al., 2008).

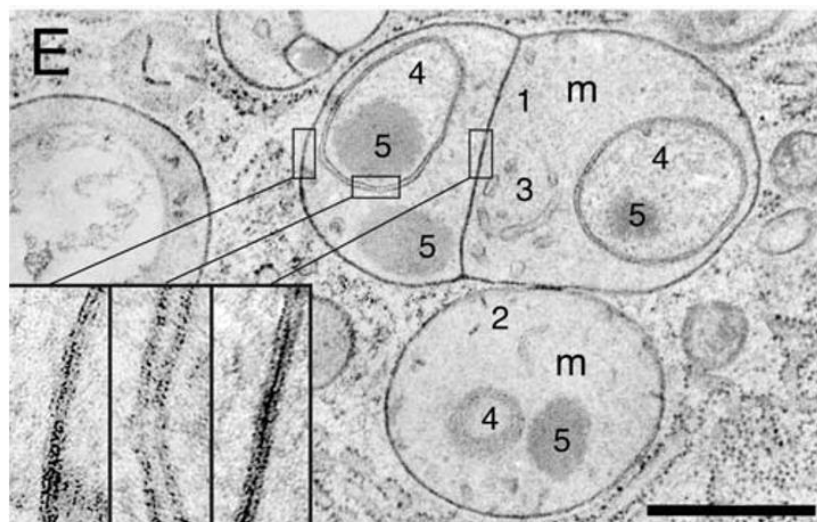


Figura 3: Parte de una célula intestinal de *C. elegans* de la línea *eat-3*, en donde se pueden apreciar estructuras aberrantes en las mitocondrias (m): 1. Septos de membrana interna. 2. Crestas tubulares cortas. 3. Invaginaciones largas de membrana interna. 4. Nuevos compartimentos dentro de la matriz mitocondrial encerrados por una doble membrana. 5. Inclusiones densas de electrones en la matriz mitocondrial (Kanazawa et al., 2008).

Estudiar cómo afecta al desarrollo y fisiología en el *C. elegans* un defecto en una proteína mitocondrial homologa a OPA1, puede ayudarnos a comprender mejor que mecanismos bioquímicos se ven alterados por una mutación en OPA1 en humanos.

1.2. *Caenorhabditis elegans*

1.2.1. Modelo para la investigación

El *Caenorhabditis elegans* es un organismo modelo con unas características que lo hacen muy útil en la práctica de diferentes estudios. Su rápido desarrollo y envejecimiento, su cultivo fácil y su capacidad de manipulación genética hacen de este nematodo un modelo de estudio para la genética molecular, la biología del desarrollo, la neurociencia y la biología celular (Park et al., 2017).

Los ensayos de mortalidad y supervivencia son métodos efectivos para estudiar diversos procesos fisiológicos, como la identificación de distintos factores génicos, que pueden proporcionar información sobre los mecanismos subyacentes en procesos fisiológicos de mamíferos, incluidos los humanos (Park et al., 2017).

El *C. elegans* puede llegar a tener más de 300 descendientes en tres días y tienen la capacidad de autofecundarse. El coste de su mantenimiento es bajo por su pequeño tamaño y sus demandas alimentarias. Su cuerpo transparente, con tejidos y órganos bien definidos, permite realizar estudios de proteínas con marcadores fluorescentes (Park et al., 2017; Kinser & Pincus, 2017).

1.2.2. Ciclo de vida y desarrollo

El ciclo de vida reproductiva incluye cuatro etapas larvales, L1, L2, L3 y L4. Condiciones desfavorables (alta temperatura, aglomeración, baja disponibilidad de alimentos) favorecen el desarrollo hacia el estado "Dauer", un estado de pausa que se caracteriza por movilidad reducida, disminución del tamaño del cuerpo y los órganos, y una cutícula distinta (Ewal et al., 2018) (Fig.4).

La decisión de entrar en estado "Dauer" se toma mientras el gusano se encuentra en L1. Una vez que abandona dicho estado continúa su desarrollo a L4. Este estado "Dauer" le permite sobrevivir en condiciones de ayuno durante muchas semanas (2 a 3 meses), siendo muy resistente al estrés ambiental (Ewal et al., 2018).

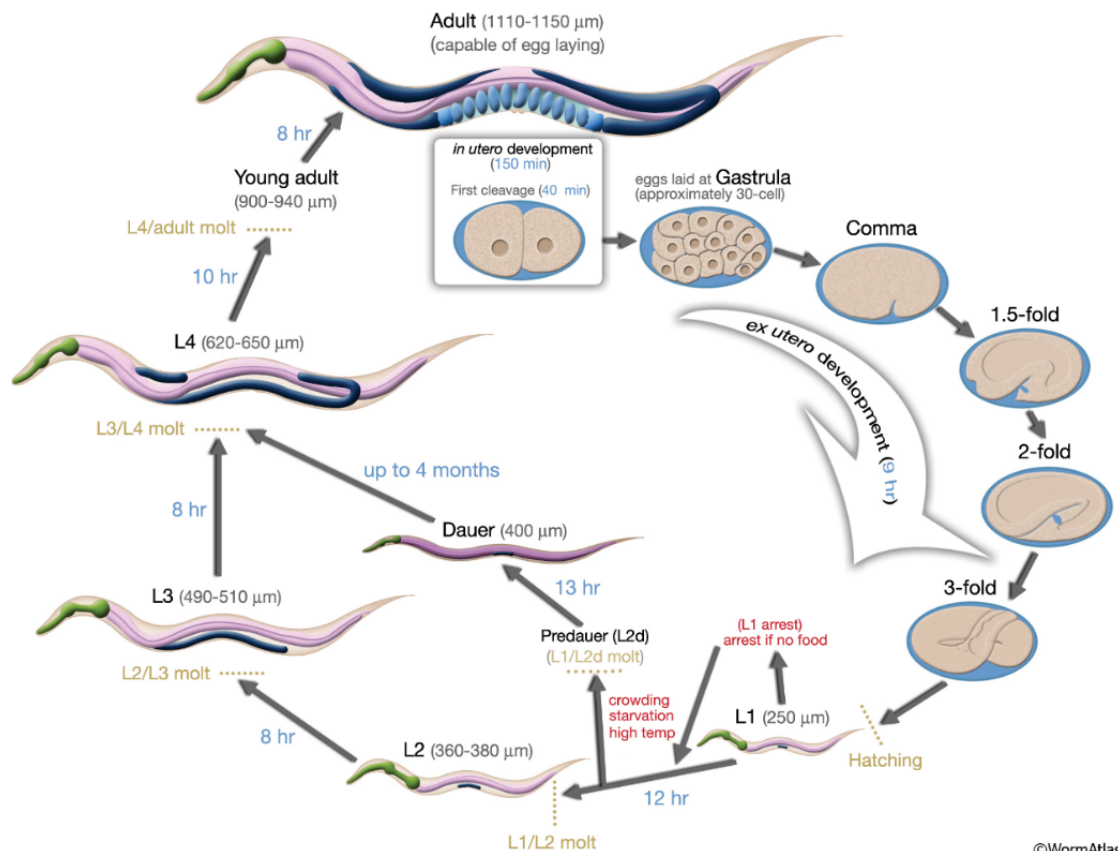


Figura 4: Representación de las distintas etapas del desarrollo y ciclo de vida del *Caenorhabditis elegans* (Altun & Hall, 2009).

1.2.3. Sistema muscular

Está formado por músculos estriados y no estriados. Entre estos últimos se incluyen 20 células musculares faríngeas, 2 músculos estomago-intestinales, un depresor anal, uno del esfínter anal, 8 músculos de la vulva, 8 uterinos y 10 células de la vaina gonadal contráctil (Gieseler et al., 2017).

Los músculos estriados son equivalentes a los músculos esqueléticos de los vertebrados. La estructura general, la composición y la función de la unidad funcional básica del músculo, el sarcómero, está altamente conservada entre nematodos y vertebrados (Gieseler et al., 2017). El músculo funcional de la pared del cuerpo es necesario para el movimiento sinusoidal en superficies semisólidas y para la forma en "c" en medio líquido que adquiere el *C. elegans* (Gieseler et al., 2017).

1.2.4. Faringe

La faringe del *C. elegans* consiste en un músculo no estriado radial dividido en tres partes funcionales, el corpus, próximo a la boca (a su vez dividido en procorpus y metacorus), el istmo, en el centro y el bulbo terminal (Hu et al., 2013; Mango, 2007) (Fig. 5).

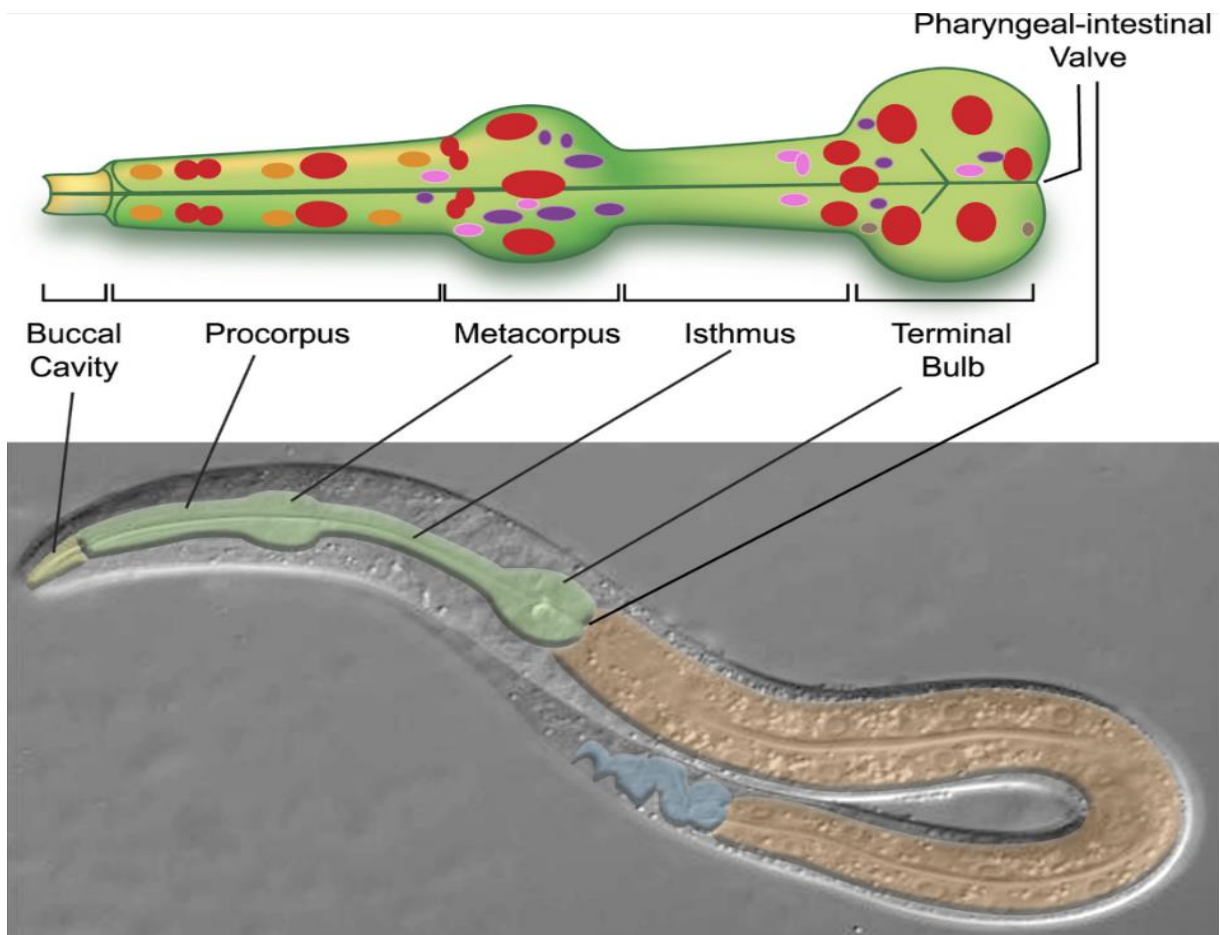


Figura 5: Esquema de la faringe del *C. elegans* con sus respectivas partes (Mango, 2007).

La faringe realiza dos movimientos para cumplimentar su función de captar el alimento, machacarlo e introducirlo al interior del gusano. El primer movimiento es un bombeo, que consiste en una contracción del corpus, istmo y bulbo terminal, seguida, tras 200ms, de una relajación de estas tres partes. Cada ciclo de contracción/relajación corresponde a un potencial de acción generado por las células musculares (Fig.6). El segundo movimiento es una peristalsis del istmo, posterior a cada 3-5 bombeos. Con este movimiento las bacterias atrapadas en el istmo pasan al bulbo terminal donde serán trituradas. (Raizen & Avery, 1994; Avery & You, 2012).

La faringe se encuentra formada por un total de 60 células entre las que destacan 20 células musculares y 20 neuronas. El resto es un conjunto de células estructurales y glandulares. Las neuronas de la faringe constituyen un sistema nervioso casi autónomo. Las células musculares forman parte del epitelio y se encuentran polarizadas con orientación radial. Sus zonas basales están en contacto con la lámina basal mientras que su región apical se encuentra recubierta por una cutícula enfrentada al lumen (Raizen & Avery, 1994).

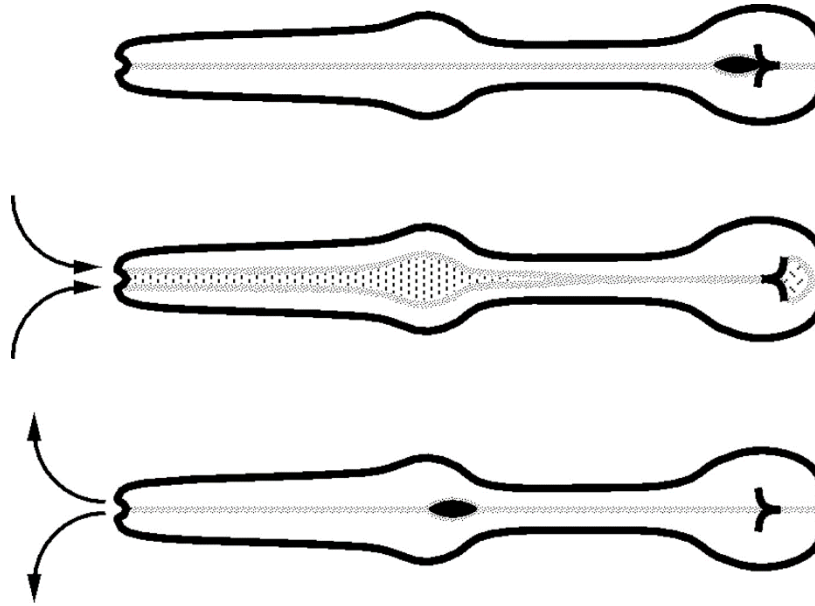


Figura 6: Esquema de la faringe de *C. elegans* en el que se representa el bombeo y como intervienen sus diferentes partes. El bombeo consta de una contracción, que aspira líquidos y bacterias, y una relajación que expulsa los líquidos dejando las bacterias en el interior (Avery & You, 2012).

El bombeo neuromuscular de la faringe tiene similitudes con el corazón de vertebrados e invertebrados. La faringe, al igual que el corazón en otros organismos, bombea durante toda la vida del gusano (Trojanowski et al., 2016).

1.2.5. Sistema nervioso

El sistema nervioso es simple y comparte vías celulares y neurotransmisores como la dopamina o la serotonina con otros organismos superiores. Es un buen modelo para el estudio de daños por toxinas neurodegenerativas, ya que en él inducen efectos similares a los que se visualizan en mamíferos. (Dexter et al., 2012).

Las 302 neuronas que contiene un *C. elegans* hembra adulta se organizan en cuerpos neurales y disponen desde la cabeza a la cola pasando por el cordón ventral. (Sulston & Horvitz, 1977).

No posee potenciales de acción convencionales al carecer de canales de Na^+ dependientes de voltaje que faciliten una despolarización y propagación de la conducción nerviosa. (Lockery et al., 2009). Sin embargo, sí que se han cuantificado numerosos canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en sus células musculares (Gao & Zhen, 2011) (Fig. 7).

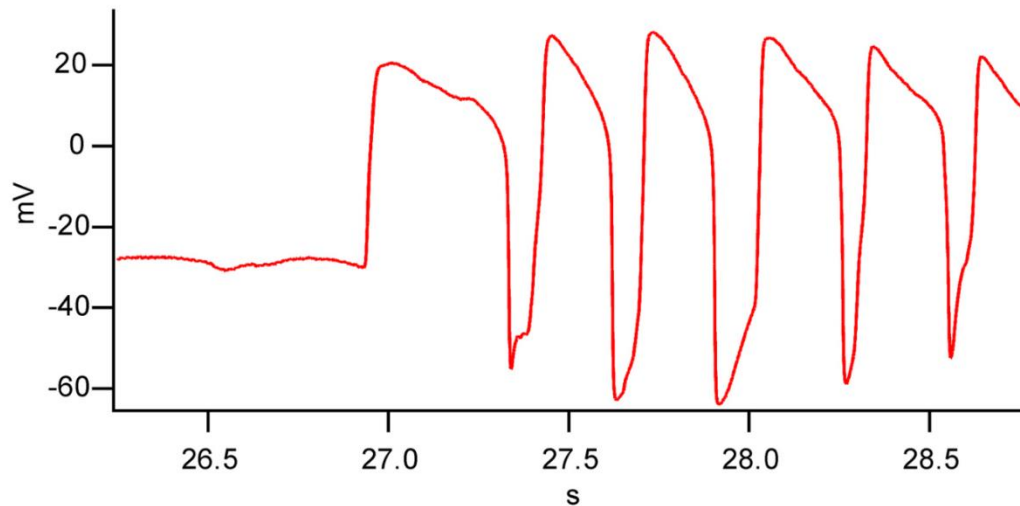


Figura 7: Conjunto de potenciales de acción faríngea (Avery & You, 2012).

1.3. Hipótesis

La revisión bibliográfica sobre el mutante *eat-3* (Kanazawa et al., 2008) nos muestra que la mutación en un gen que codifica a una proteína mitocondrial homologa de OPA1 provoca cambios en sus mitocondrias. Estos cambios mitocondriales pueden afectar al desarrollo, esperanza de vida, bombeo de la faringe y a los registros de Ca^{2+} mitocondrial en el mutante *eat-3*.

1.4. Objetivos

El objetivo general del estudio es encontrar y comparar las diferencias entre los *C. elegans* controles N2 y los mutantes *eat-3*, que tienen una mutación en la proteína mitocondrial homologa a OPA1. Para ello nos centraremos en varios objetivos específicos que son:

1. Diferencias en el desarrollo
2. Esperanza de vida entre ambas cepas
3. Posibles diferencias en el bombeo de la faringe
4. Diferencias en los registros de Ca^{2+} mitocondrial en faringe

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas

En los estudios realizados en desarrollo, mortalidad y electrofaringeograma se han utilizado dos líneas de *C. elegans*: la control, N2, y la línea mutante *eat-3*.

La línea *eat-3* se caracteriza por tener un gen mutado que codifica una proteína homóloga a OPA1 en humanos (Kanazawa et al., 2008). Esto nos permitirá estudiar las alteraciones que genera una mutación puntual sobre este gen, con la finalidad de extrapolar en un futuro los resultados obtenidos en *C. elegans* a humanos.

Para los experimentos de Ca^{2+} se utilizaron las líneas AQ3055 y AQ3055/*eat-3*. Estas dos cepas de *C. elegans* son homologas a las líneas N2-Control y *eat-3*, respectivamente, siendo AQ3055-Control una cepa con la sonda fluorescente YC3.60 mitocondrial en células de la faringe. AQ3055/*eat-3* fue obtenido mediante cruces entre AQ3055 y *eat-3*. La sonda fluorescente YC3.60 nos permitirá realizar mediciones de Ca^{2+} mitocondrial y observar posibles diferencias entre control y mutante.

2.2. Preparación de placas de agar

Para el mantenimiento del nematodo se preparan placas de agar NMG (Nematode Growth Medium Agar), que les proporciona un medio óptimo donde vivir.

En botellas de 500ml se añaden los siguientes compuestos: 0.75g NaCl, 4.25g de agar y 0.625g de peptona. Se disuelven en 250ml de agua desionizada. Una vez disueltos se autoclava. Tras aproximadamente 120 minutos a 120°C, retiramos las botellas del autoclave y se dejan reposar en un baño maría a 55°C durante 15 minutos.

Posteriormente retiramos la botella del baño y, en un ambiente estéril, añadimos en el siguiente orden: 250µl de colesterol (5mg/ml), 250µl de $CaCl_2$ 1M, 250µl de $MgSO_4$ 1M y 6,25ml de buffer KPO_4 . Se agita bien para evitar los precipitados.

Finalmente, el contenido de la botella se vierte en placas petri de 90mm de diámetro y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Tras la solidificación ocurrida durante la noche, se añaden 250µl de *E. coli* OP50 como alimento para el *C. elegans*.

2.3. Preparación de placas de agar con FuDR

Al realizar los experimentos de mortalidades, electrofaringeogramas y medidas de Ca^{2+} necesitamos que los gusanos estén sincronizados, es decir, que todos los gusanos que participan en el experimento tengan los mismos días de desarrollo. Para evitar confusiones debemos evitar que los gusanos adultos que participan en los experimentos pongan huevos. Para ello utilizamos el compuesto de FuDR

(Fluorodesoxiuridina). Se trata de un inhibidor de la síntesis de ADN que bloquea la división celular y por tanto el desarrollo de los huevos sin afectar al metabolismo de los gusanos adultos (Mitchell et al., 1979).

El FuDR se añade durante el proceso de elaboración de placas de agar NMG. Si queremos preparar placas con FuDR, se añadirán 125µl de FuDR (30µM) antes de verter el contenido de las botellas a las placas petri. Tras la solidificación del agar en las placas petri, se añade OP50.

2.4. Sincronización de huevos

En los experimentos necesitamos que los gusanos tengan los mismos días de vida. Para ello debemos obtener huevos, que nos permitirá tener muchos gusanos de la misma edad.

Cogemos placas con gusanos adultos sin comida que debido a ello retienen los huevos en su interior. Añadimos 1,5ml de agua destilada a la placa con gusanos. Con una pipeta pasteur de vidrio los recogemos y los pasamos a un eppendorf. Los centrifugamos a 2000rpm durante 1 minuto. Retiramos el sobrenadante y añadimos 250µl de buffer M9 y 150µl de NaOH/lejía comercial (NaOH 5M: lejía 1:2).

Cada 2 minutos durante 10 minutos pondremos los eppendorf sobre el vortex unos 10-15 segundos. Así conseguiremos que el cuerpo del gusano se rompa y se liberen los huevos que resisten el tratamiento. Tras el vortex, centrifugamos durante 1 minuto a 8000rpm. Retiramos el sobrenadante y añadimos 1ml de buffer M9. Volvemos a centrifugar 1 minuto a 8000rpm.

Por último, retiramos el sobrenadante y cogemos el pellet que tiene los huevos con una pipeta pasteur de vidrio para pasarlo a placas petri sembradas con OP50. A temperatura ambiente dejamos que se seque y una vez seco introducimos la placa petri al incubador a 20°C, en posición invertida.

2.5. Curvas de mortalidad

Para realizar las curvas de mortalidad necesitaremos sincronizar huevos para que los gusanos lleguen al estado adulto/joven (tras la etapa L4) al mismo tiempo. En este ensayo realizaremos la sincronización de huevos de *eat-3* un día antes que los N2 control, ya que la cepa mutante *eat-3* tarda un día más en desarrollarse que la cepa control como se detallará más adelante.

Una vez que tenemos sincronizados los gusanos, todos ellos adultos/joven, picamos alrededor de 100 gusanos de cada una de las cepas, repartidos en 10 placas petri de 40mm de diámetro, con FuDR y sembradas con OP50. En total se utilizaron alrededor de 600 gusanos para las tres curvas de mortalidad realizadas.

Las placas petri se introducen en el incubador a 20°C y a días alternos se cuentan los gusanos. Anotaremos en una plantilla los vivos, los muertos y los censurados (gusanos que se van de la placa o tienen protusión de vulva). Consideramos que un

gusano está muerto cuando deja de mover la cabeza y se encuentra estático en posición de media luna o en forma de palillo. Cuando mueren se retiran de la placa.

Las curvas se obtienen introduciendo los datos en el programa Origin pro 8.5. una vez que han muerto todos los gusanos. En las curvas se comparan control N2 con mutante eat-3.

2.6. Electrofaringeograma (EFG)

Las contracciones musculares rítmicas son clave en muchos aspectos de la fisiología o el comportamiento del organismo. La faringe del *C. elegans* es, en ciertos aspectos, similar al corazón de vertebrados e invertebrados. Ambos están formados por células musculares que generan un bombeo a lo largo de toda la vida. Sin embargo, también existen diferencias claras entre corazón y faringe, un ejemplo es el receptor de Ryanodina, crítico para la función cardíaca de vertebrados y poco importante para la función de la faringe del nematodo (Trojanowski et al., 2016).

El estudio de la faringe mediante electrofaringeograma (EFG) nos permite monitorizar el ritmo de bombeo y visualizar la frecuencia y duración del ciclo de contracción/relajación. El EFG puede ser útil para comprender cómo afectan ciertas mutaciones o fármacos al comportamiento del nematodo (Hu et al., 2013).

Una señal típica de EFG contiene picos llamados e, E, P, R y r comprendidos entre las fases de contracción, meseta y relajación. La fase de contracción muscular excitatoria contiene el pico positivo e y un pico mayor E. La señal continúa con una fase de meseta que alberga picos negativos P generados por la actividad de neuronas motoras glutamatérgicas. Por último, la fase de relajación comprende los picos R y r. El primero se debe a la repolarización simultánea que sufre el corpus y el istmo, R, seguida por la repolarización del bulbo terminal, r (Hu et al., 2013) (Fig. 8).

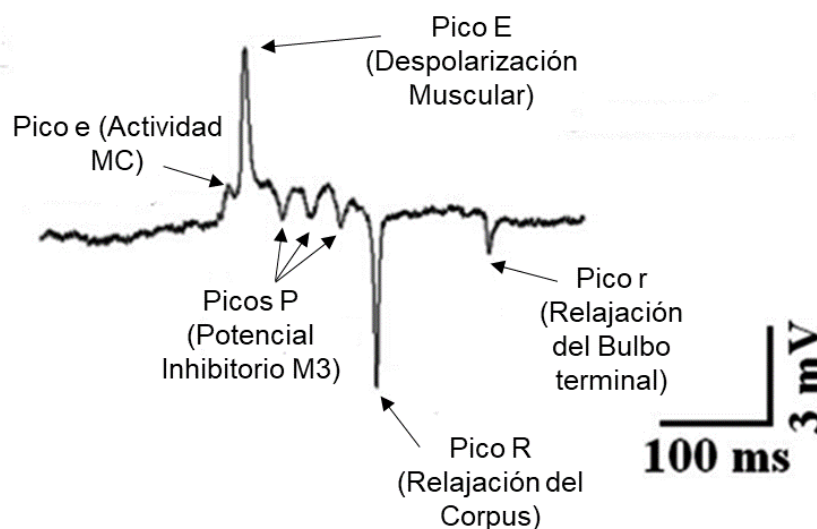


Figura 8: Ejemplo de una señal típica de EFG, mostrándose las diferentes fases con sus respectivos picos (Hu et al., 2013).

Los picos E y R son útiles para estudiar la excitabilidad muscular, y los picos e y P son útiles para estudiar funciones sinápticas excitatorias e inhibitorias, respectivamente (Hu et al., 2013).

La despolarización de las células musculares faríngeas se refleja en el EFG como un pico positivo, mientras que la repolarización produce picos negativos. Las corrientes de los potenciales de acción se producen en las membranas basales de las células musculares faríngeas, mientras que las membranas apicales son pasivas (Raizen & Avery, 1994).

Los experimentos los hemos llevado a cabo con gusanos de días 3 y 4 de estado adulto tanto en los N2 como en los *eat-3*. Para ello sincronizamos los gusanos, es decir, obtenemos huevos y cuando llegan a edad adulta los pasamos a placas con FuDR.

Vertemos 750µl de M9 buffer + Tween 0,1% (el Tween es un detergente que elimina las bacterias) sobre la placa con gusanos, los recogemos en un eppendorf con una pipeta pasteur de vidrio y centrifugamos. Retiramos el sobrenadante y añadimos 750µl de M9 buffer para lavar el Tween. Volvemos a centrifugar y repetimos este proceso otras tres veces. Tras el lavado, retiramos el M9 buffer sobrenadante y añadimos al eppendorf 1ml de serotonina 2,3mM. La serotonina es un activador de bombeo faríngeo endógeno (Son & Avery, 2012). Esperamos alrededor de 15 minutos a que la serotonina haga efecto.

Introducimos los gusanos en la cámara Screen Chip Cartridge de la compañía Nemametrix (Fig. 9).

Con el programa NemaAcquire registramos el bombeo de la faringe durante 5 minutos. Debemos tener en cuenta si el gusano entra en el capilar de la cámara de cabeza o de cola, ya que el registro de bombeos será distinto.

El programa NemAnalysis nos permitirá analizar los experimentos realizados para elaborar una comparación entre la amplitud, la frecuencia y la duración de los bombeos de las dos cepas de gusanos.

En este trabajo se utilizaron 55 gusanos N2-Control y 85 de la cepa *eat-3*. Se eliminaron algunos de los registros por la presencia de ruido durante el desarrollo del experimento.

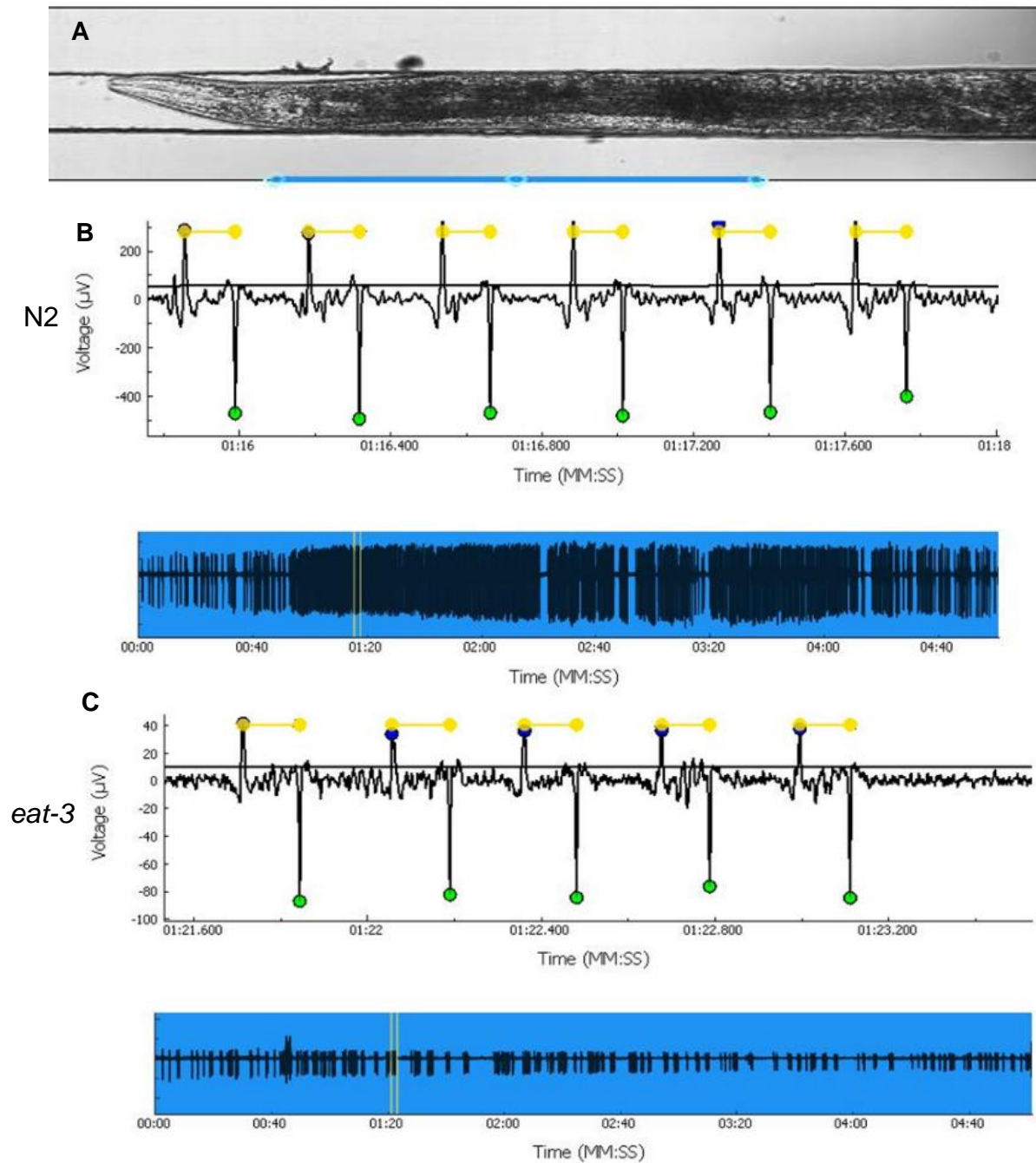


Figura 9: A) Capilar de la cámara Screen Chip Cartridge, donde se introduce el *C. elegans* para el posterior registro de la amplitud, frecuencia y duración del bombeo de la faringe; B) Registro de la amplitud frente a tiempo del bombeo de la faringe en N2-Control; C) Registro de la amplitud frente a tiempo del bombeo de la faringe en *eat-3*. Nótese que los registros de la amplitud se han obtenido con la misma escala temporal a diferente escala de voltaje.

2.6. Ca²⁺ mitocondrial

Realizamos los experimentos de Ca²⁺ mitocondrial con gusanos a día 3 y 4 de estado adulto, mismo tiempo de desarrollo que el utilizado durante el EFG. A diferencia de los otros experimentos, en este caso, utilizaremos las cepas de gusano AQ3055 y AQ3055/*eat-3* que expresan el colorante YC3.60 sensible a Ca²⁺ dirigido a la mitocondria.

Para hacer los experimentos de medida de Ca²⁺ mitocondrial los gusanos tienen que ser pegados a una superficie de agar, y para ello pesamos 0,04g de agar no fluorescente y lo disolvemos en M9 buffer para obtener una concentración al 2%. Para que no se solidifique lo dejamos reposar en un termobloque a 70°C.

Recortamos las esquinas del cubreobjetos, para que posteriormente quepa en la camarita del microscopio, y lo dejamos calentar sobre el termobloque. Cogemos una gota de agar y la ponemos en el centro de un cubreobjetos. Encima de la gota colocamos otro cubreobjetos, también recortado. La gota de agar se extenderá entre los dos cubreobjetos. Lo dejamos enfriar a temperatura ambiente. Separamos ambos cubreobjetos, quedándonos con el que contenga la fina capa de agar llamada "pad". Pasamos el cubreobjetos a la camarita donde pegaremos el gusano.

Bajo la lupa, pasaremos un gusano con un "hair pick" al "pad" de la camarita y procederemos a inmovilizarlo con el pegamento Dermabond®. Tendremos que pegar al gusano por un único lado y sin tapar la boca, ya que queremos que durante el experimento el gusano quede inmóvil pero que su faringe pueda seguir bombeando.

Una vez pegado añadimos sobre la camarita 250 µl de serotonina 2,3mM para estimular el bombeo de la faringe. Finalmente ponemos la camarita sobre el microscopio de fluorescencia invertido Zeiss Axiovert 200® y procedemos a medir la fluorescencia de la faringe.

Se hace incidir un haz de luz de una longitud de onda de 430nm de excitación y se obtienen imágenes a longitudes de ondas de 480nm y 535nm de emisión cada 200ms. Se registran simultáneamente las dos longitudes de onda y de ellas se obtiene la ratio. Esta última se obtiene del cociente de las dos longitudes de onda (535nm/480nm). La medida de la ratio nos permite diferenciar entre picos reales, debidos a un aumento de la concentración del calcio, y el ruido de fondo o artefactos. A 535nm la fluorescencia aumenta a una mayor concentración de calcio, visualizándose en un pico ascendente, mientras que a 480nm la fluorescencia disminuye cuando aumenta la concentración de calcio, dando lugar a un pico descendente (Fig.10).

La duración de cada experimento es de 30 minutos y se utilizaron unos 30 gusanos AQ3055 y 30 gusanos AQ3055/*eat-3*.

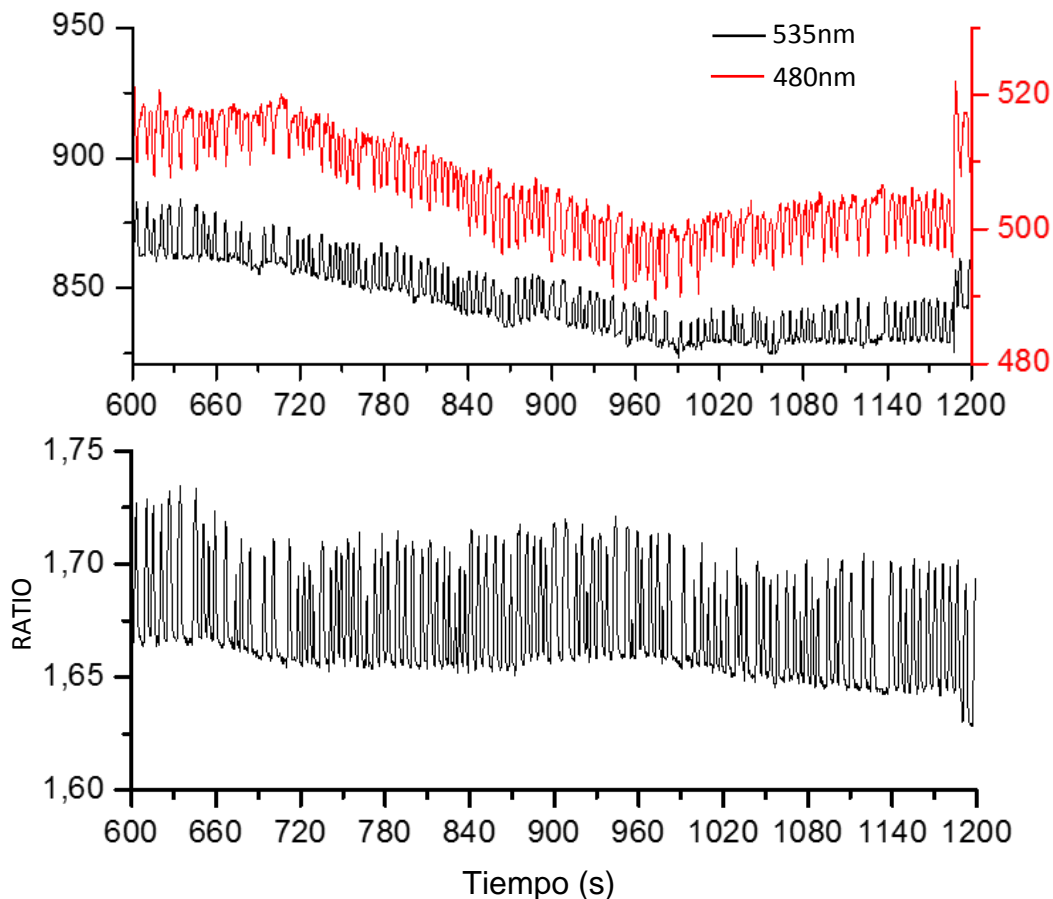


Figura 10: Gráficas del ratio (arriba) y longitudes de onda (abajo) a 480nm y 535nm obtenidos en uno de los experimentos, donde se pueden observar los picos de calcio. Comprenden de 600 a 1200 segundos del experimento. Ambas gráficas pertenecen a un mismo gusano AQ3055.

2.7. Materiales y reactivos

10% Tween20, Bio-Rad (1662404).

Adhesivo tópico para la piel Dermabond®, Johnson & Johnson.

Agar, Calbiochem (12177-1Kg).

Agarose de alta gelificación (imagen), Fisher (BP164-100).

Clorhidrato de serotonina, Alfa-Aesar (B21263).

Cloruro de calcio, MERCK (A935182914).

Cloruro sódico, EMSURE (K46991504540).

Colesterol, Sigma-Aldrich (C8503-25G).

FuDR 5'-fluoro-2'-deoxiuridina, Alfa-Aesar (L16497).

Peptona bacteriológica, PRONADISA (1616.00).

Pipeta Pasteur 230-250, FisherBrand (1156-6963).

Placas petri 90mm y 40mm, Deltalab (200201).

Sulfato de magnesio, Sigma-Aldrich (M2643-500G).

M9 buffer

- Cloruro sódico, EMSURE (K46991504540).
- Fosfato monopotásico, MERCK (A999073905).
- Fosfato disódico, Sigma-Aldrich (S0876-1KG).
- Sulfato de magnesio, Sigma-Aldrich (M2643-500G).

Buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4

- Fosfato de hidrógeno dipotásico, MERCK (A0026704927).
- Fosfato monopotásico, MERCK (A999073905).

3. Resultados

3.1. Comparativa de desarrollo desde la eclosión del huevo

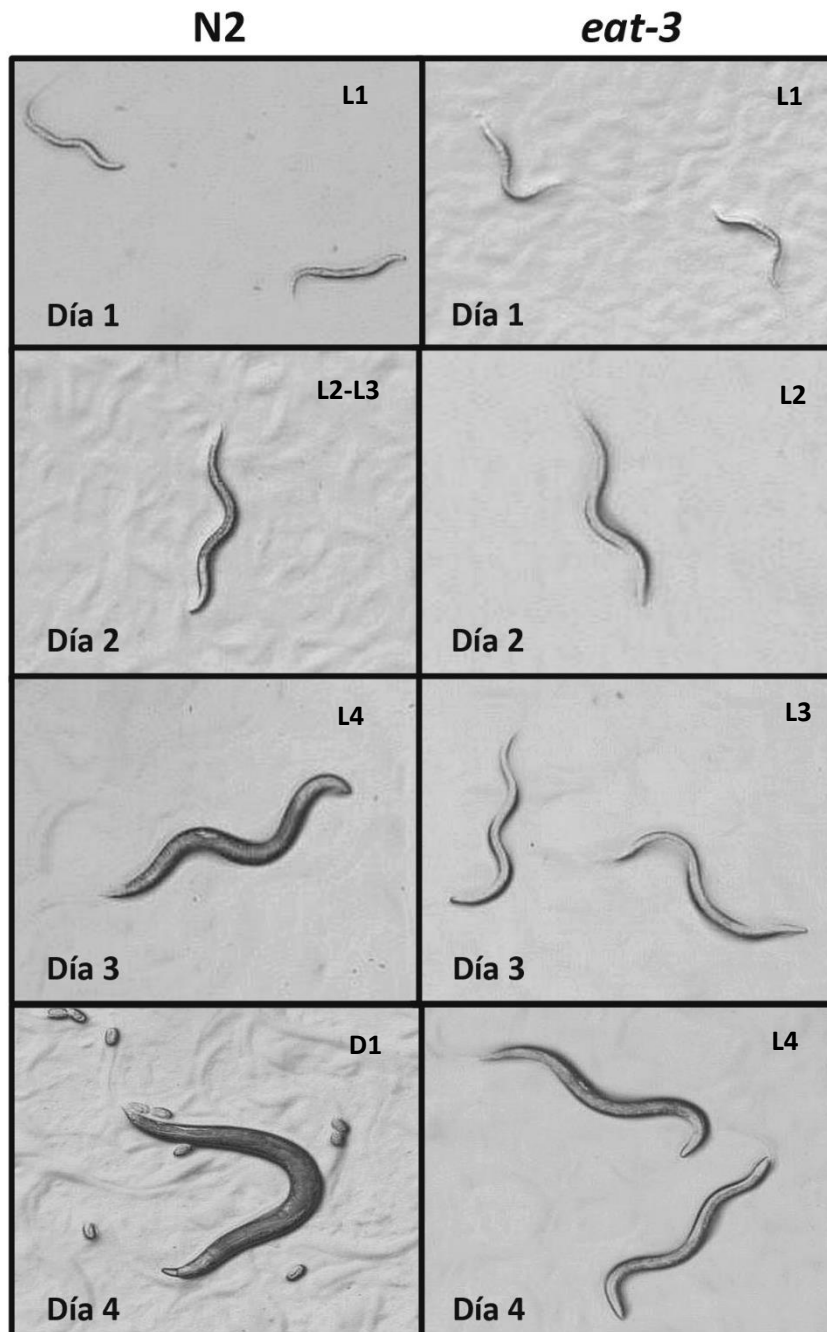


Figura 11: Fotos del desarrollo de las cepas de *C. elegans* N2 y *eat-3* tomadas en paralelo, durante 4 días tras la eclosión, mediante cámara acoplada a la lupa binocular Leica®.

Se realizaron fotografías durante 4 días seguidos para estudiar posibles diferencias en el desarrollo de las cepas N2 control y *eat-3*. Las fotografías fueron tomadas mediante una cámara acoplada a la lupa binocular Leica®

Los gusanos se encontraban en una placa con medio de agar y en condiciones favorables de alimento y sin inducirlos a estrés.

Ambas cepas de *C. elegans* N2 y *eat-3* tienen un desarrollo muy similar desde la eclosión hasta el día 2, siendo casi indistinguibles tanto en estadio corporal como en transparencia. Al alcanzar el día 3 ya son más notables las diferencias. En día 3 la cepa N2 ya ha alcanzado el estadio L4 por la distinguible forma en media luna que presenta en su abdomen. La cepa *eat-3*, sin embargo, no alcanza el estadio L4 hasta día 4 (Fig. 11).

Podemos ver que la cepa N2 alcanza el estadio adulto/joven el día 4. Su cuerpo se ha oscurecido y como se puede observar ya ha puesto huevos. Paralelamente la cepa *eat-3* alcanza el estadio de L4 el día 4 y no pone todavía huevos (Fig. 11). Por tanto, esto indica un retraso en el desarrollo de la cepa *eat-3*.

3.2. Mortalidad

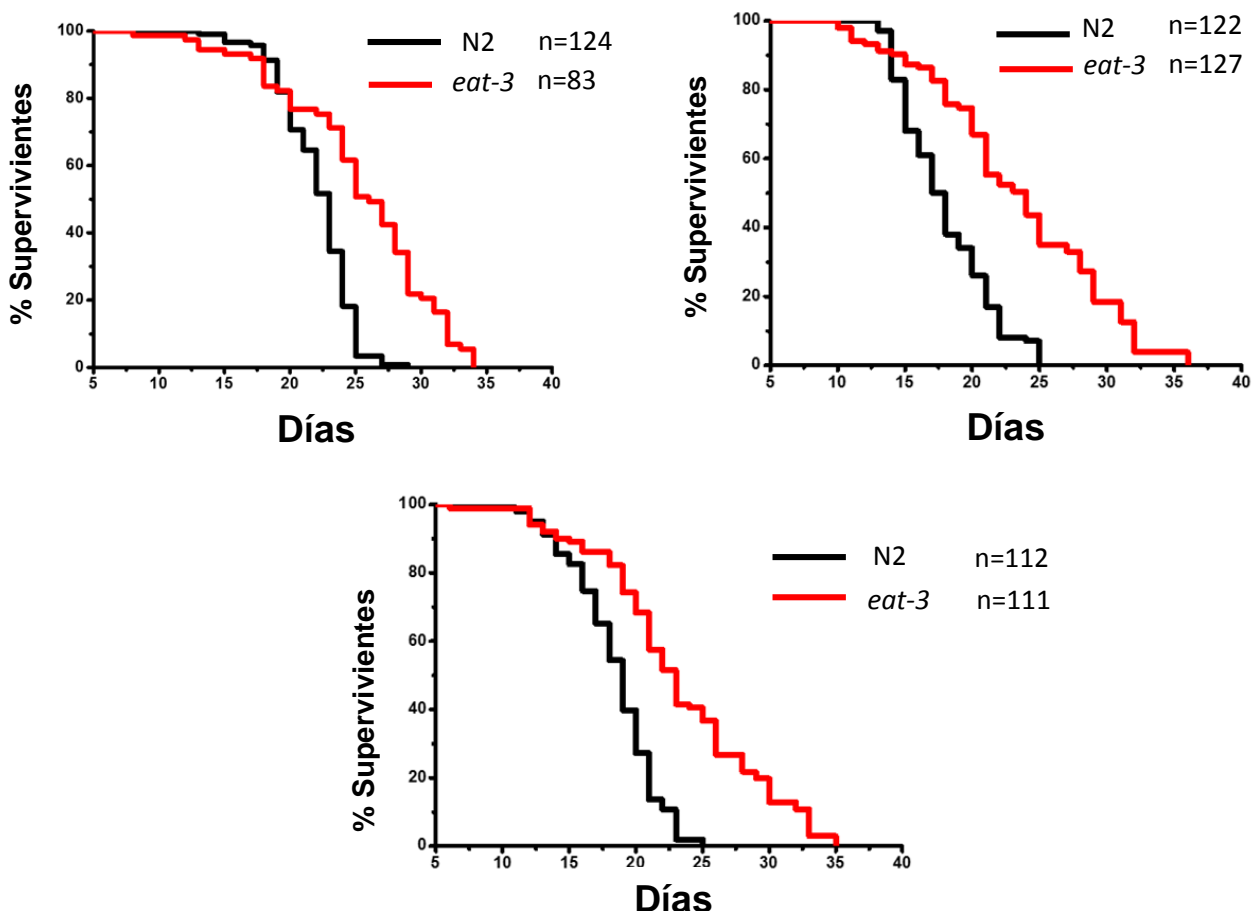


Figura 12: Curvas de mortalidad de tres experimentos distintos. En ellas se compara la esperanza de vida de las cepas N2 control y *eat-3*. Los N2 control llegan a una esperanza de vida en torno a 25 días. mientras que los *eat-3* a 35 días.

Comienzo	N2-Control		<i>eat-3</i>		Incremento Lifespan %	p-Valor	Incremento Medio Lifespan %
	Estimación Lifespan	Cont./Total n	Estimación Lifespan	Cont./Total n			
16/11/2018	22,097	116/124	25,431	73/83	15,088	<0,001	24,019
25/01/2019	17,974	100/122	23,440	103/127	30,410	<0,001	
03/05/2019	18,408	103/112	23,188	101/111	25,966	<0,001	

Figura 13: Tabla del estudio estadístico de las mortalidades en donde se expresa el comienzo de cada experimento, la estimación de la esperanza de vida, el n total y contabilizado de los gusanos, el incremento de la esperanza de vida, la significancia y el incremento medio de la esperanza de vida.

Se realizaron tres tandas de mortalidad separadas en el tiempo con alrededor de 100 gusanos por cepa, siendo la n final en torno a los 300 gusanos por cepa (N2 n=344, *eat-3* n=303).

Las curvas de mortalidad indican claramente una mayor esperanza de vida para los gusanos de la cepa *eat-3* sobre los N2-Control (Fig. 12). En las tres curvas la significancia fue de $p \leq 0,001$ y se obtuvo una media de incremento de la esperanza de vida del 24,019%.

3.3. Electrofaringeograma (EFG)

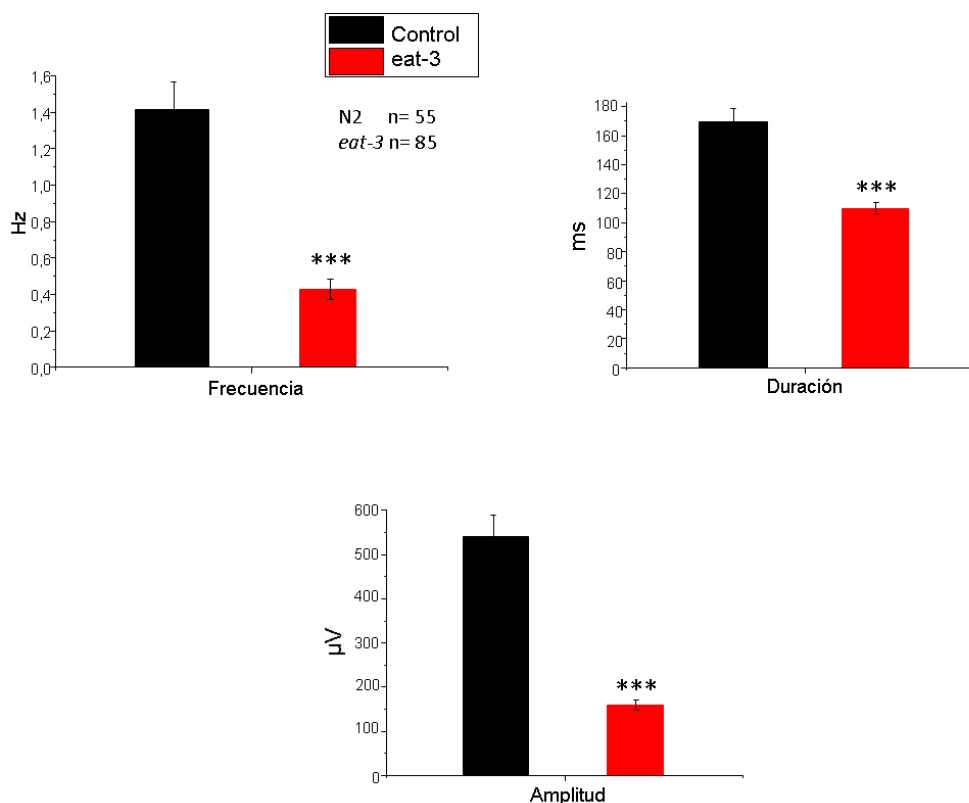


Figura 14: Diagrama de barras en donde se aprecian las medias de la frecuencia, la duración y la amplitud de los bombeos de la faringe en N2-Control y *eat-3*.

Se realizaron EFG de gusanos N2 y *eat-3* a día 3 y 4 de edad adulta.

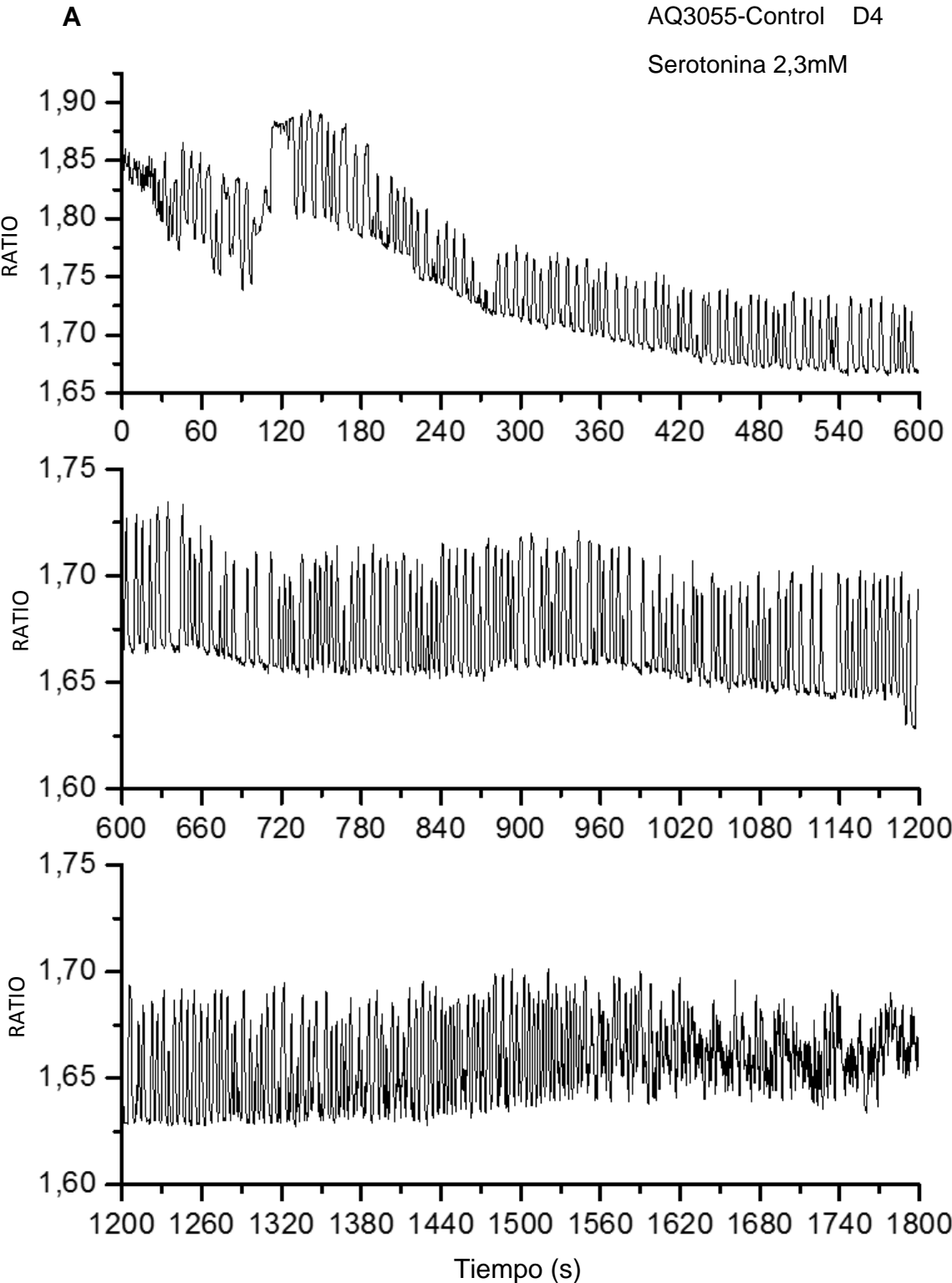
Se analizaron todos los experimentos realizados para el EFG con el programa NemAnalysis. Comparamos la frecuencia, la duración y la amplitud del bombeo de la faringe en las dos cepas para la búsqueda de diferencias significativas.

El EFG nos muestra que existe una clara diferencia en la frecuencia, amplitud y duración de los bombeos entre N2- Control y *eat-3* (Fig. 14). La frecuencia media de los controles se sitúa en los 1,416Hz mientras que la de los mutantes en 0,427Hz, siendo más del triple en controles que en mutantes. La diferencia es menor si nos fijamos en la duración del bombeo siendo de 169,337ms en controles y 110,098 en mutantes. Finalmente, las mediciones de las amplitudes también nos mostraron una diferencia entre controles, de 541,253 μ V, y mutantes, de 160,271 μ V. En los tres casos se obtuvo una significancia de $p \leq 0,001$ (Fig. 15).

	n	Frecuencia (Hz)			Duración Bombeo (ms)			Amplitud (μ V)		
		Media	p-valor	Desv. Estandar	Media	p-valor	Desv. Estandar	Media	p-valor	Desv. Estandar
N2- Control	55	1,416	<0,001	0,147	169,337	<0,001	9,018	541,253	<0,001	47,748
<i>eat-3</i>	85	0,427		0,056	110,098		3,733	160,271		11,663

Figura 15: Tabla del estudio estadístico del EFG donde se expresan las medias, significancias y desviaciones estándar de la frecuencia, duración y amplitud de los bombeos para N2 y *eat-3*.

3.4. Medidas de Ca²⁺ mitocondrial



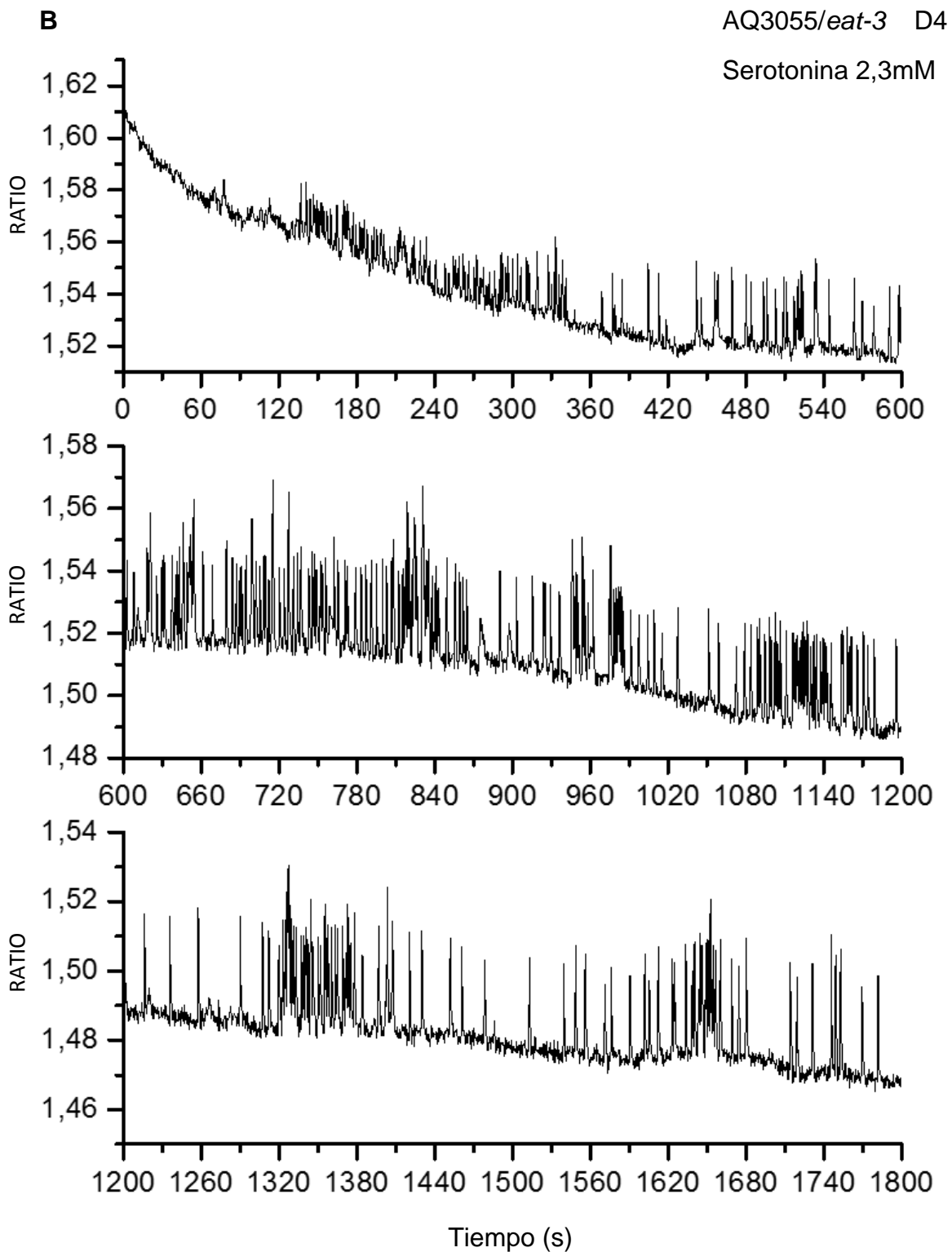


Figura 16: Trazados de experimentos tipo de medida de Ca^{2+} mitocondrial en AQ3055-Control vs AQ3055/*eat-3* durante 30 minutos. A) Ratio de picos de Ca^{2+} en gusano AQ3055-Control durante 1800s de experimento. B) Ratio de picos de Ca^{2+} en gusano AQ3055/*eat-3* durante 1800s de experimento. En ambos casos se estimuló con serotonina.

Los experimentos de Ca^{2+} mitocondrial en faringe, con las cepas AQ3055-Control y AQ3055/*eat-3*, se realizaron a día 3 y 4 de estado adulto. Para establecer una comparación entre ambas cepas nos fijamos en la anchura del pico, anchura $\frac{1}{2}$ del pico a mitad de altura, altura y frecuencia de los picos. Se han utilizado los picos de anchura media menor de 10s (más del 99% del total) para hacer la estadística.

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en anchura del pico, anchura $\frac{1}{2}$ del pico, altura y frecuencia de los picos entre AQ3055-Control y AQ3055/*eat-3* (Fig. 17 y 18).

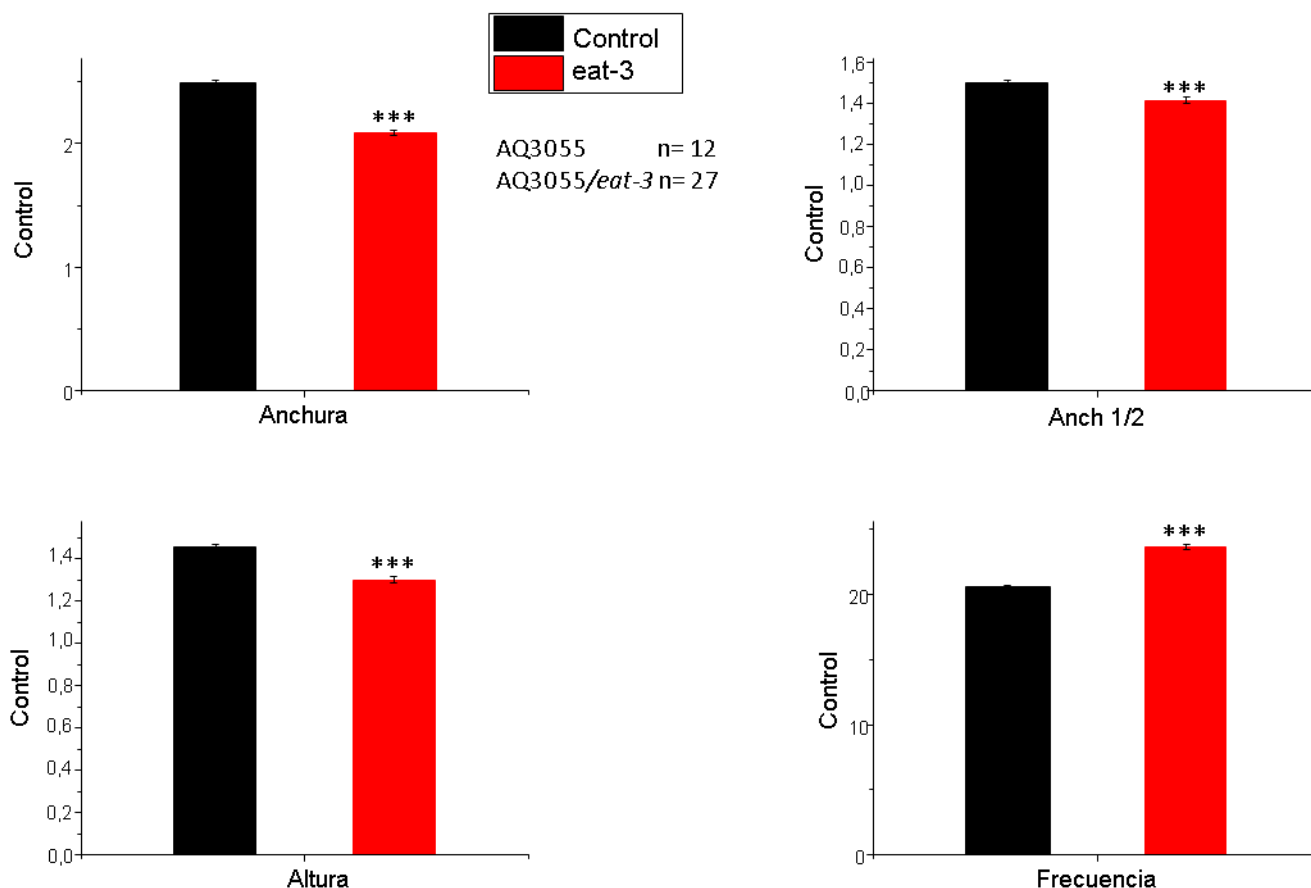


Figura 17: Gráficos de barras comparativos entre AQ3055-Control y AQ3055/*eat-3* de las anchuras, anchuras $\frac{1}{2}$, alturas y frecuencias medias de los picos de Ca^{2+} mitocondrial en faringe.

Cepa	Picos de Ca^{2+} <10s				Día 3 y 4			
	Anchura	p-valor	Anchura $\frac{1}{2}$	p-valor	Altura	p-valor	Frecuencia	p-valor
AQ3055-N2	2,493	<0,001	1,500	<0,001	1,458	<0,001	20,560	<0,001
AQ3055/ <i>eat-3</i>	2,085		1,414		1,299		23,680	

Figura 18: Tabla del estudio estadístico de la anchura media de los picos, la anchura $\frac{1}{2}$ media de los picos, las alturas medias y la frecuencia media de los picos de Ca^{2+} junto con la significancia entre las cepas AQ3055-Control y AQ3055/*eat-3* a día 3 y 4.

4. Discusión

Como se puede observar en las figuras 11 y 12 la cepa mutante *eat-3* que codifica una proteína homóloga a OPA1 tiene un desarrollo más lento y una esperanza de vida mayor. El desarrollo del *eat-3* tiene un retraso de 24 horas respecto a N2-Control. Este día de más que necesitan los *eat-3* para alcanzar el estado de L4 fue lo que nos llevó a realizar la sincronización de huevos para los experimentos un día antes que los N2, para así tener ambas cepas en D1 el día del experimento. Durante los experimentos se observó que los mutantes *eat-3* son morfológicamente más finos que los controles N2. Los *eat-3* se encuentran más estáticos y con poco movimiento una vez que alcanzan el estado adulto/joven o adulto.

Los *eat-3* se alimentan mucho menos que los N2 controles, esto los induce a encontrarse en restricción calórica. La restricción calórica (RC) es una reducción en la ingesta de calorías sin malnutrición. En diversos estudios publicados se habla de que determinados organismos, entre ellos el nematodo *C. elegans*, alcanzan un estado de restricción calórica, retrasando su envejecimiento, siendo una vía de enfoque para el desarrollo de nuevos fármacos para un envejecimiento más lento (Calvert et al., 2016; Kapahi et al., 2017).

La mutación en la proteína mitocondrial OPA1 que tienen los *eat-3*, provoca que las mitocondrias tengan un funcionamiento anómalo generando una energía insuficiente en sus células, por lo que la faringe no podrá desempeñar su función de una manera normal. Esta disfunción de la faringe hace que los *eat-3* se alimenten menos, causándoles RC. La RC explicaría el desarrollo lento y la mayor esperanza de vida de los *eat-3*.

Los datos del EFG sugieren que los *eat-3* tienen una menor amplitud, frecuencia y duración de los bombeos de la faringe que los controles. Los registros de calcio mitocondrial nos muestran que la anchura, anchura $\frac{1}{2}$ y altura de los picos de calcio en *eat-3* son menores a los de los N2-Control, exceptuando la frecuencia. Esto también puede ser explicado por la disfunción de la faringe causada por una falta de energía en sus células y explicaría la menor ingesta y por tanto la entrada en estado de RC.

5. Conclusiones

1. Los mutantes *eat-3* tienen un desarrollo más lento que los controles, de 24h de diferencia. Los *eat-3* morfológicamente son más finos que los controles y se alimentan menos, entrando en un estado de restricción calórica.
2. La esperanza de vida es mayor en los *eat-3*, llegando a tener un incremento del 24,019%.
3. La frecuencia, duración y amplitud de los bombeos de la faringe de los *eat-3* fue significativamente menor que la registrada en los controles.
4. Se encontraron diferencias significativas en las alturas de los picos de Ca^{2+} mitocondrial en faringe, siendo más bajas en AQ3055/*eat-3* que en control.

6. Bibliografía

1. Altun F & Hall DH. **2009**. Introduction. *WormAtlas*
<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html>
2. Avery L & Shtonda BB. **2003**. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *Journal of Experimental Biology*. 206(0 14): 2441–2457.
3. Avery L & You YJ. **2012**. *C. elegans* feeding. *WormBook*. 21:1-23.
http://www.wormbook.org/chapters/www_feeding/feeding.html
4. Calvert S, Tacutu R, Sharifi S, Teixeira R, Ghosh P & de Magalhães JP. **2016**. A network pharmacology approach reveals new candidate caloric restriction mimetics in *C. elegans*. *Aging Cell*. (2):256-66.
5. Del Dotto V, Mishra P, Vidoni S, Fogazza M, Maresca A, Caporali L, McCaffery JM, Cappelletti M, Baruffini E, Lenaers G, Chan D, Rugolo M, Carelli V & Zanna C. **2017**. OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Reports*. 19(12):2557-2571.
6. Delettre C, Lenaers G, Pelloquin L, Belenguer P & Hamel CP. **2002**. OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*. 75(2):97-107.
7. Dexter PM, Caldwell KA & Caldwell GA. **2012**. A predictable worm: application of *Caenorhabditis elegans* for mechanistic investigation of movement disorders. *Neurotherapeutics*. 9(2):393-404.
8. Ewald CY, Castillo-Quan JI & Blackwell TK. **2018**. Untangling longevity, dauer, and healthspan in *Caenorhabditis elegans* insulin/IGF-1-signalling. *Gerontology*. 64(1): 96–104.
9. Gao S & Zhen M. **2011**. Action potentials drive body wall muscle contractions in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(6): 2557-2562.
10. Gieseler K, Qadota H & Benian GM. **2017**. Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook*. 1-59.
http://www.wormbook.org/chapters/www_bodywallmuscle/bodywallmuscle.html
11. Hu C, Dillion J, Kearn J, Murray C, O'Connor V, Holden-Dve L & Morgan H. **2013**. NeuroChip: A Microfluidic Electrophysiological Device for Genetic and Chemical Biology Screening of *Caenorhabditis elegans* Adult and Larvae. *PLoS One*. 8(5).
12. Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H & Takeda K. **2012**. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. *Journal of Signal Transduction*. 2012:931215.
13. Kanazawa T, Zappaterra MD, Hasegawa A, Wright AP, Newman-Smith ED, Buttler KF, McDonald K, Mannella CA & van der Blik AM. **2008**. The *C. elegans* OPA1 Homologue *eat-3* Is Essential for Resistance to Free Radicals. *PLOS Genetics*. 4(2).

14. Kapahi P, Kaeberlein M & Hansen M. **2017**. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Research Reviews*. 39:3-14.
15. Kinser HE & Pincus Z. **2017**. High-throughput screening in the *C. elegans* nervous system. *Molecular and cellular neurosciences*. 80: 192–197.
16. Kushnareva Y, Seong Y, Andreyev AY, Kuwana T, Kiosses WB, Votruba M & Newmeyer DD. **2016**. Mitochondrial dysfunction in an OPA1(Q285STOP) mouse model of dominant optic atrophy results from OPA1 haploinsufficiency. *Cell Death & Disease*. 7.
17. Lockery SR, Goodman MB & Faumont S. **2009**. First report of action potentials in a *C. elegans* neuron is premature. *Nature Neuroscience*. 12(4):365-6
18. Mango SE. **2007**. The *C. elegans* pharynx: a model for organogenesis. *WormBook*. 22:1-26.
http://www.wormbook.org/chapters/www_organformation/organformation.html
19. Meyer JN, Leuthner TC & Luz AL. **2017**. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity Submitted for consideration for the Special Issue of Toxicology on “Chemical Mitochondrial Toxicity”. *Toxicology*. 391: 42–53.
20. Mitchell DH, Stiles JW, Santelli J & Sanadi DR. **1979**. Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of Gerontology*. 34(1):28-36.
21. Park HEH, Jung Y & Lee SJV. **2017**. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells*. 40(2): 90–99.
22. Patten DA, Wong J, Khacho M, Soubannier V, Mailloux RJ, Pilon-Larose K, MacLaurin JG, Park DS, McBride HM, Trinkle-Mulcahy L, Harper ME, Germain M & Slack RS. **2014**. OPA1-dependent cristae modulation is essential for cellular adaptation to metabolic demand. *The EMBO Journal*. 33(22): 2676–2691.
23. Raizen DM & Avery L. **1994**. Electrical Activity and Behavior in the Pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*. 12(3): 483–495.
24. Song BM & Avery L. **2012**. The pharynx of the nematode *C. elegans*: A model system for the study of motor control. *Worm*. 2:1.
25. Sulston JE & Horvitz HR. **1977**. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*. 56(1):110-56.
26. Trojanowski NF, Raizen DM & Fang-Yen C. **2016**. Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Scientific Reports*. 6:22940.
27. Zhang J, Liu X, Liang X, Lu Y, Zhu L, Fu R, Ji Y, Fan W, Chen J, Lin B, Yuan Y, Jiang P, Zhou X & Guan MX. **2017**. A novel ADOA-associated OPA1 mutation alters the mitochondrial function, membrane potential, ROS production and apoptosis. *Scientific Reports*. 7: 5704.