

Universidad de Valladolid



INSTITUTO DE BIOMEDICINA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

MÁSTER EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Posible implicación del receptor de IP3 en el aumento de la longevidad mediada por restricción calórica en los mutantes *eat-3* de *Caenorhabditis elegans*

Marta Calle Sánchez



Tutores:

Dr. Jaime Santo Domingo Mayoral

Dra. Rosalba Inés Fronteriz García

Valladolid, Junio 2023

ÍNDICE

◆ Abreviaturas	Pág 3
◆ Resumen/Abstract	Pág 4
◆ Introducción	Pág 5-12
1. Restricción calórica y envejecimiento	
2. La señalización de calcio y en envejecimiento en <i>Chaenorabditis elegans</i>	
3. Los mutantes <i>eat</i> como modelo de restricción calórica	
4. Hipótesis	
5. Objetivos	
◆ Materiales y métodos	Pág 13-19
1. <i>Chaenorabditis elegans</i> como modelo en investigación	
2. Cepas	
3. Mantenimiento de cepas de <i>C.elegans</i>	
4. Preparación de placas Petri	
5. Siembra de cepas bacterianas OP50, L4440 e IP3	
6. Sincronización de gusanos	
7. Diseño del experimento	
- Curvas de mortalidad	
- Análisis de fertilidad	
- Análisis de movilidad	
- Western Blot de AMPK	
- Estudio de la respiración celular mediante SeaHorse	
- qPCR	
◆ Resultados	Pág 20-25
◆ Discusión	Pág 26-27
◆ Conclusiones	Pág 27
◆ Bibliografía	Pág 28-30

ABREVIATURAS

AAK-2: AMP-activated protein kinase- 2

AKT/PKB: Protein kinase B

AMPK: AMP-activated protein kinase

AOD: Atrofia óptica dominante

CREB: cAMP Response Element-Binding

dsRNA: Double-stranded RNA

FOXA: Forkhead box protein

FOXO: forkhead box transcription factors

FuDR: 5-Fluoro-2' deoxyuridine

GTPasas: Guanosine triphosphatase

IGF: Insulin-like growth factor

INSR: Insuline Receptor

IP₃R: IP₃ Receptor

IPTG: Isopronil—β-D-1- tiogalactopiranósido

iRNA: ARN de interferencia

ISS: Insulin/IGF-1 signaling

ITR-1: Inositol 1,4,5-triphosphate receptor

lcnRNA: Long noncoding RNAs

LGIC: Ligand-gated ion channel

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

mtDNA: DNA mitocondrial

NGM: Nematode growth medium

NRF-2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

OP50: *Escherichia coli* OP50

OPA-1: Optic atrophy type 1

PGC-1α: Pparg coactivator 1 alpha

PHA-4: Pharyngeal development protein 4

PI3K: Phosphoinositol 3- kinasa

PLC: Phospolipase C

PMCA: Plasma membrane Calcium ATPase

RC: Restricción calórica

RE: Retículo endoplásmico

RyR: Receptor de rianodina

ROS: Reactive oxygen species

SERCA: SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase

SIRT-1: Sirtuin 1 protein

SKN-1: Factor de transcripción skinhead-1

TRP: Transient receptor potential channels

UPR: Unfolded protein response

UTX-1: Histone Demethylase

V_{máx}: Velocidad máxima

V_{med}: Velocidad media

VOCC: Voltage-operated calcium channels

RESUMEN/ ABSTRACT

Individualmente, la disfunción tanto del retículo endoplásmico (RE) como de la mitocondria, se ha relacionado con el envejecimiento, pero no está claro como la comunicación entre estos dos orgánulos podría promover la longevidad. Los sistemas de señalización de Ca^{2+} en RE y mitocondria están altamente integrados y la regulación de los procesos de captación y liberación de Ca^{2+} del retículo pueden jugar un papel relevante en la plasticidad de la longevidad, siendo el receptor de IP3 localizado en la membrana del RE, el lugar dónde las mitocondrias captan Ca^{2+} procedente del RE de manera más eficiente. Además, se ha descrito que los puntos de contacto entre RE y mitocondria están regulados por componentes de vías de señalización por nutrientes moduladas por restricción calórica, como mTOR y AMPK. El objetivo del presente trabajo fue comprobar el papel de la liberación de calcio del RE mediada por el receptor de IP3 sobre el aumento de la longevidad inducido por restricción calórica. Para ello, se emplearon los mutantes *eat-3* de *Caenorhabditis elegans* como modelo de restricción calórica y en ellos, se procedió al silenciamiento del gen *itr-1* que codifica para el receptor de IP3 con la finalidad de determinar cómo interviene dicho receptor en la longevidad inducida por restricción calórica. Los resultados mostraron el incremento de la longevidad inducido por restricción calórica en mutantes *eat-3*, no requiere la actividad del receptor de IP3/*itr-1*.

Palabras clave: envejecimiento, longevidad, *Caenorhabditis elegans*, *eat-3*, receptor de IP3, *itr-1*

INTRODUCCIÓN

RESTRICCIÓN CALÓRICA (RC) Y ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso biológico caracterizado por un deterioro progresivo y generalizado de las funciones del organismo junto con una menor capacidad de adaptación al cambio y un mayor riesgo de morbilidad (De la Fuente & Miquel, 2009). Durante el envejecimiento hay una pérdida del mantenimiento de la homeostasis a nivel molecular y subcelular (Anton & Leeuwenburgh, 2013). Las investigaciones sobre la biología del envejecimiento han experimentado un enorme avance en los últimos años con la finalidad de conocer los mecanismos subyacentes a dicho proceso y poder desarrollar estrategias terapéuticas que promuevan un envejecimiento saludable (Kritsilis *et al.*, 2018).

La restricción calórica (RC) o limitación de la ingesta energética procedente de la dieta sin desnutrición, fue la primera intervención capaz de aumentar la longevidad en mamíferos. Esta evidencia sugería que el proceso de envejecimiento era plástico o modulable (McCay *et al.*, 1935). Hoy en día existen diversas intervenciones capaces de retrasar el ritmo de envejecimiento en modelos preclínicos (Ros & Carrascosa., 2020). La restricción calórica es, sin embargo, la única intervención ni genética ni farmacológica conocida para aumentar sustancialmente la longevidad saludable, retrasando la aparición de múltiples patologías relacionadas con la edad en organismos modelo de laboratorio, desde las levaduras hasta los roedores (Anton & Leewenburgh, 2013).

El estudio de estos mecanismos celulares que median la longevidad inducida por restricción calórica en diferentes organismos ha avanzado considerablemente en los últimos años. Los mecanismos de detección de nutrientes parecen jugar un papel esencial, siendo alguno de los más relevantes: 1) Vía de señalización de la insulina/IGF-1, 2) La señalización mediada por la quinasa activada por AMP (AMPK) y 3) La señalización mediada por la kinasa mTOR. Es importante mencionar que a pesar de que estas vías estén parcialmente conservadas a lo largo de la evolución, los mecanismos comprometidos son parcialmente diferentes ante diversas intervenciones de RC (por ejemplo, la restricción calórica intermitente) y en diferentes organismos (Zhang *et al.*, 2020).

♦ **Mecanismos de detección de nutrientes y restricción calórica en *C. elegans* (Figura1)**

Los mecanismos moleculares responsables de la extensión de la vida media en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, se descubrieron por primera vez en el nematodo *C.elegans* y condujeron inicialmente al descubrimiento del papel de la vía de señalización similar a insulina (IGF) en el envejecimiento (Panowski *et al.*, 2009). Estudios posteriores han identificado múltiples genes que aumentan la longevidad en *C.elegans* cuando mutan (Zhang *et al.*2020). Hasta el momento se han identificado más de 50 genes que controlan dicha senescencia, y existen muchos homólogos de estos en otros organismos (Pearson *et al.*, 2008). A continuación, se describen tres mecanismos de sensibilidad a nutrientes que juegan un papel esencial como reguladores de la longevidad en *C.elegans* y que están altamente conservados a lo largo de la evolución.

1. Vía de señalización de insulina/IGF-1 (IIS)

Se trata de una de las vías de longevidad más estudiadas (Clancy *et al.*, 2002; Iser & Wolkow., 2007) y consta de cinco componentes clave codificados por los genes: *daf-2*, *age-1*, PDK-1, AKT1/2 y *daf-16*.

Mientras que *daf-2* codifica para un homólogo del receptor de la insulina de mamíferos (INRS) (Murphy & Hu., 2013), *age-1* codifica un homólogo de la subunidad catalítica p110 de la PI3K (Wacott & Ronan., 2016) y *daf-16* codifica para un factor de transcripción homólogo a FOXO en humanos (Murphy & Hu., 2013). Por otro lado, en esta vía de señalización también interviene PDK-1 y AKT-1/2, proteínas quinasas de serina/treonina.

En ausencia de nutrientes disminuye la concentración de péptidos similares a la insulina (ILP). En estas condiciones, el receptor natural de estos péptidos en *C.elegans*, DAF-2, disminuye su actividad. Esta reducción resulta en la inactivación secuencial de AGE-1, PDK-1 y AKT1/2. El sustrato principal de AKT1/2 en esta vía de señalización, el factor de transcripción DAF-16, permanece por tanto esencialmente defosforilado lo que le permite translocarse al núcleo activando genes diana que intervienen en el metabolismo energético y en los mecanismos de protección al estrés. DAF-16 también promueve la expresión del factor de transcripción SKN-1 (homólogo de NRF-2 en humanos) que incrementa la expresión de colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, desencadenando una respuesta al estrés y a la presencia de proteínas mal plegadas (UPR).

2. Señalización mediada por la quinasa dependiente de AMP (AMPK)

La proteína AMPK (Quinasa dependiente de AMP) es un sensor crucial del estado energético y nutricional del organismo. La activación de AMPK ante situaciones de estrés energético derivadas de la restricción calórica juega un papel fundamental en el incremento de la longevidad inducido por este tipo de intervenciones. AMPK relaciona por tanto la disponibilidad de nutrientes con la longevidad, actúa como principal regulador de la homeostasis energética celular y es necesaria para el ajuste metabólico durante la RC en *C.elegans* (Fergusson *et al.*, 2015). El gen que codifica AMPK es *aak-2* en *C.elegans* y la sobreexpresión de AMPK prolonga la vida útil en *C.elegans* (Butler *et al.*, 2010).

Cuando el cociente AMP/ATP se ve incrementado durante una restricción calórica, se activa AMPK. Entre otros sustratos, AMPK se va a unir y fosforilar a un conjunto de coactivadores transcripcionales encaminados a restaurar el balance energético celular y la supervivencia del organismo, incluidos PGC-1alfa, FOXO y SIRT-1 (Gao *et al.*, 2014). DAF-16 también es un sustrato de AMPK en situaciones de restricción calórica (Zhao *et al.*, 2017). De hecho, la longevidad mediada por *aak-2* también implica la regulación a la baja de la vía IIS y la posterior translocación de DAF-16 al núcleo.

3. Señalización mediada por mTOR

Otro elemento que vincula la adaptación a cambios en la disponibilidad de nutrientes con la longevidad es la proteína quinasa de serina/treonina, mTOR. mTOR es la subunidad catalítica de dos complejos proteicos diferentes mTORC1 y mTORC2, cada uno compuesto de diferentes subunidades proteicas que le confieren la capacidad de fosforilar diferentes sustratos. La mayor parte de evidencias sugiere que mTORC1 es el complejo más relevante en la regulación de la longevidad (Green *et al.*, 2002). mTORC1 coordina la respuesta a diversos cambios ambientales como la disponibilidad de aminoácidos, glucosa o colesterol que indican que las condiciones son favorables para activar el metabolismo anabólico.

En este sentido, mTOR regula la biosíntesis de proteínas, lípidos y nucleótidos a diferentes niveles. También juega un papel relevante en la coordinación de los procesos anabólicos con el catabolismo celular, por ejemplo, regulando la autofagia (Liu & Sabatini., 2020).

A nivel mitocondrial, mTOR, regula la expresión de genes que codifican proteínas mitocondriales, mediando la adaptación del metabolismo energético mitocondrial al estado nutricional y energético del organismo (Blackwell *et al.*, 2019). También, estudios recientes muestran que mTOR induce mitofagia, eliminando las mitocondrias defectuosas que se acumulan durante el envejecimiento (Ryu *et al.*, 2016)

Durante la restricción calórica, se suprime la activación de mTOR. En este sentido, diversos estudios en *C.elegans* han demostrado que la inhibición de la actividad de mTOR prolonga la vida útil en el gusano, vinculando por tanto la restricción calórica con el aumento de la longevidad (Tullet., 2015).

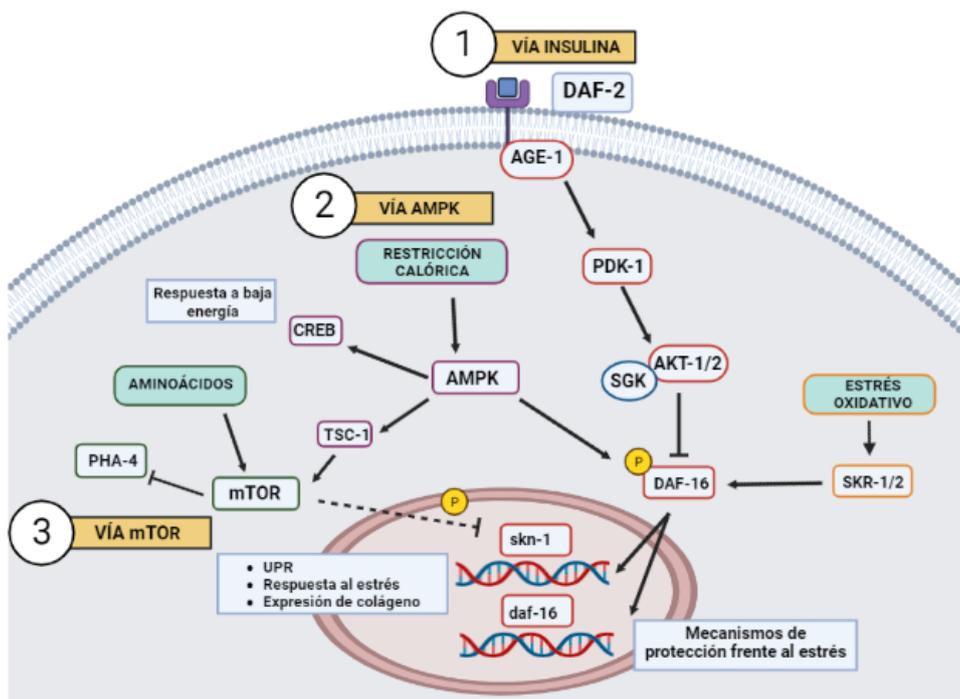


Figura 1. Principales vías y factores de transcripción asociados a la longevidad en *Chaenorhabditis elegans*

LA SEÑALIZACIÓN DEL CALCIO Y EL ENVEJECIMIENTO EN *C.ELEGANS*

La fácil manipulación genética de este nematodo, el ciclo corto de vida, la existencia de tejidos especializados y su transparencia, hacen de este organismo un buen modelo para el análisis integrado de la señalización del calcio en el contexto del envejecimiento (Baylis & Vázquez-Manrique, 2011). La secuenciación del genoma completo en este organismo ha permitido conocer la maquinaria completa de señalización del calcio en este organismo. Así como en otros metazoos, *C.elegans* tiene una amplia gama de canales de calcio que incluyen canales de calcio operados por voltaje (VOCC) (Bargmann., 1998), canales controlados por ligando (LGIC) controlados por neurotransmisores (Bargmann., 1998), canales TRP y canales de Ca^{2+} intracelulares como IP_3R y el receptor de rianodina (Sakube *et al.*, 1993). Además, en *C.elegans* están presentes homólogos de *stim-1* y *orai-1* necesarios para almacenar y controlar la entrada de calcio (Lorin-Nebel *et al.*, 2007) y ortólogos de las bombas de Ca^{2+} como la SERCA y PMCA (Kraev *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2000).

El retículo endoplásmico (RE) es el sistema de orgánulos con membrana más extenso de las células y alberga una gran variedad de funciones críticas, como el procesamiento y tráfico de proteínas o el mantenimiento de la homeostasis de calcio intracelular (Schwarz *et al.*, 2016).

De forma similar a las células de mamíferos, en *C. elegans* SERCA/*sca-1* es la ATPasa encargada de mantener elevadas concentraciones de Ca^{2+} en el lumen del orgánulo, mediante el bombeo de Ca^{2+} desde el citosol al lumen, mientras que RyR/*unc-68* e IP3R/*itr-1* participan en la liberación de ese Ca^{2+} en respuesta a estímulos. Evidencias recientes sugieren de manera directa e indirecta que la regulación de los procesos de captación y liberación de calcio del retículo pueden jugar un papel relevante en la plasticidad de la longevidad en este nematodo (García-Casas *et al.*, 2018; Burkewitz *et al.* 2020; García Casas *et al.*, 2021; Romero-Sanz *et al.*, 2023).

Por otro lado, las mitocondrias cumplen un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis energética celular. Conforme avanza la edad cronológica, disminuye la flexibilidad metabólica y la eficiencia energética mitocondrial, lo que contribuye al deterioro celular y pérdida de homeostasis característica del envejecimiento (Barja *et al.*, 2005). Además, las mitocondrias juegan un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular del Ca^{2+} , funcionando como tampones transitorios de calcio. Además, el Ca^{2+} mitocondrial regula la activación energética mitocondrial y la liberación de factores pro-apoptóticos (Hajnóczky *et al.*, 2006).

De forma similar a las células de mamíferos, en *C. elegans* el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial promueve la entrada de Ca^{2+} al orgánulo, mientras que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, del que existen 10 isoformas, cataliza la liberación. Evidencias recientes sugieren que la alteración de estos dos mecanismos promueve longevidad en *C. elegans*, aunque los mecanismos subyacentes han sido solo pobremente estudiados (García-Casas *et al.*, 2019; Burkewitz *et al.*, 2020; García-Casas *et al.*, 2021; Jackson *et al.*, 2022)

Los sistemas de señalización de Ca^{2+} en retículo endoplásmico y mitocondria están altamente integrados. La evidencia actual sugiere que la captación de Ca^{2+} de forma eficiente por parte de las mitocondrias solo tiene lugar en la cercanía de los receptores de IP₃ de la membrana del retículo (Hajnóczky *et al.*, 2006). Además, un número considerable de evidencias soportan la idea de que los puntos de contacto entre mitocondria y retículo están regulados por componentes de las vías de señalización de nutrientes como las moduladas por restricción calórica (Ureshino *et al.*, 2014). Dado que tanto la modulación de la maquinaria de señalización de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE) como la de las mitocondrias se ha relacionado de forma individual con los mecanismos que promueven longevidad es posible especular con la idea de que la comunicación entre estos dos orgánulos actúa para promover o modular la longevidad a nivel de la transmisión de la señal de calcio.

◆ Receptor de IP₃ (IP₃R) en *C. elegans*

El receptor de IP₃ es de uno de los principales canales de liberación de calcio intracelular que se localiza en el retículo endoplásmico. *C. elegans*, tiene un solo gen que codifica para dicho receptor llamado *itr-1*. Este gen, tiene una gran variedad de regiones de *splicing* así como una región promotora compleja (Gower *et al.*, 2001). La proteína IP₃R, ITR-1 tiene aproximadamente un 40% de identidad con la de los mamíferos (Baylis *et al.*, 1999) y posee la misma estructura general que otros IP₃R, también tiene una gran variedad de residuos conservados con funciones conocidas, así como la unión de ligandos o la actividad del canal (Baylis *et al.*, 1999). Además, *C. elegans* tiene cinco genes PLC y un homólogo a la proteína similar a PLC catalíticamente inactiva (PLL-1) (Gower *et al.*, 2005) (Figura 2).

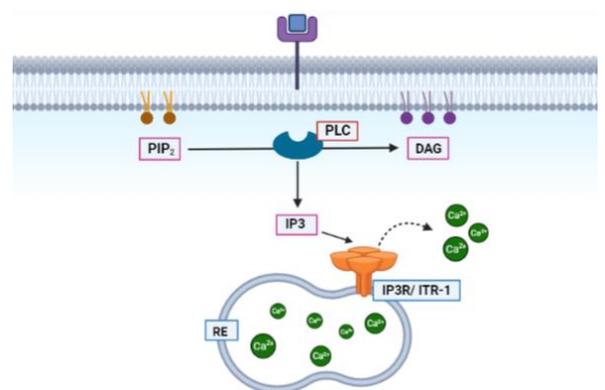


Figura 2. Cascada de señalización de IP₃R

LOS MUTANTES *EAT* COMO MODELO DE RESTRICCIÓN CALÓRICA

Los mutantes *eat* de *C.elegans* presentan defectos en la función faríngea. Estas mutaciones afectan a la fuerza o a la secuencia de contracciones y relajaciones de los diversos músculos del *pharynx* y esto los lleva a una disminución en la ingesta de alimentos (Avery., 1993). Además, se ha demostrado que la ingesta de alimentos está linealmente relacionada con la tasa de bombeo, de manera que la duración de la vida de los gusanos se correlaciona con la gravedad del defecto en la alimentación (Lakowski & Hekimi, 1998). Dichos defectos a la hora de ingerir los alimentos simulan un modelo de restricción calórica (RC) en este nematodo, que se puede emplear para estudiar el aumento de la esperanza de vida como consecuencia de la reducción de la ingesta calórica.

◆ *Eat-3* homólogo de *opa-1* en *C.elegans*

Las mitocondrias no solamente existen como orgánulos aislados, sino también como redes altamente interconectadas, cambiando constantemente entre dos estados a través de un equilibrio entre fuerzas opuestas de fusión y fisión (Saotome *et al.*, 2014) (**Figura 3**). Esta capacidad de transición entre estos dos estados es esencial para el funcionamiento mitocondrial y regula: 1) El mantenimiento de una bioenergética celular óptima, 2) La dinámica del calcio intracelular y 3) Las respuestas al estrés celular (Byrne *et al.*, 2019).

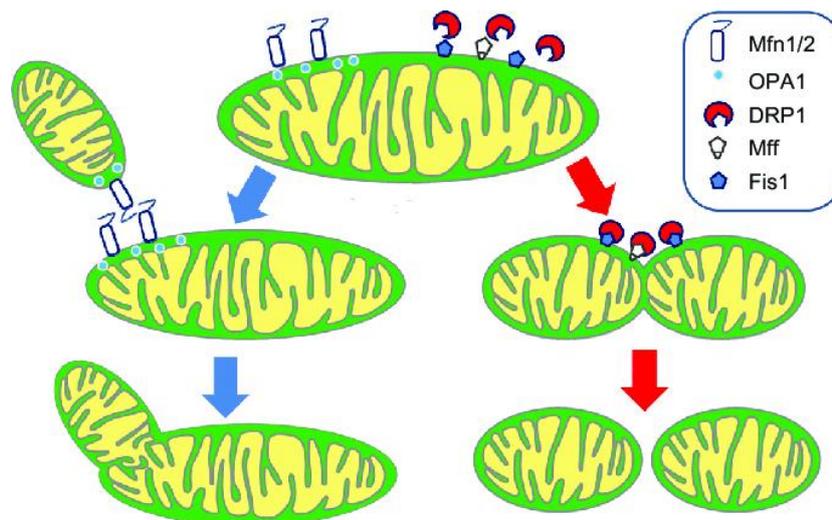


Figura 3. Dinámica mitocondrial. Fusión impulsada por OPA1 y mitofusinas y fisión impulsada por DRP1, Mff y Fis 1. (Saotome *et al.*, 2014)

La fusión mitocondrial requiere dos eventos de fusión de membranas, la fusión de la membrana mitocondrial externa (MME) y la fusión de la membrana mitocondrial interna (MMI). Estos dos eventos están coordinados y ocurren simultáneamente. En el proceso de fusión intervienen tres proteínas GTPasas en mamíferos con homólogos conocidos en *C.elegans*: 1) Mitofusina 1/FZO-1, 2) Mitofusina 2/FZO-1 y 3) OPA1/EAT-3 (Wai & Langer., 2016). Durante la fusión mitocondrial, la proteína localizada en la MMI, atrofia óptica 1 (OPA-1) interactúa con las proteínas localizadas en la MME (Mfn1 y Mfn2) para formar complejos proteicos intermembrana que acoplan la fusión de las membranas externas con las internas. Entre otras posibles funciones, la fusión mitocondrial permite a las mitocondrias dañadas mitigar el estrés mezclando sus contenidos como una forma de complementación funcional, diluyendo las mutaciones acumuladas en el ADN mitocondrial y las proteínas oxidadas (Ono *et al.*, 2001).

Por otro lado, la fisión mitocondrial está mediada por la proteína GTPasa DRP1. La activación de DRP1 por diversas señales intracelulares promueve su reclutamiento desde el citosol en la MME con la ayuda de los factores de fisión mitocondrial (Mffs y Fis1). La formación de complejos en la MME permite la formación de una espiral alrededor de las mitocondrias que se contrae para completar la ruptura de las MMI y MME (Byrne *et al.*, 2019).

Además de su papel en la fusión de membranas mitocondriales, OPA-1 parece estar involucrada en el mantenimiento de la integridad de las crestas mitocondriales, el ensamblaje de los supercomplejos de la cadena respiratoria y el mantenimiento del ADN mitocondrial (mitDNA). También, se ha demostrado que regula la apoptosis mediada por la mitocondria y la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial (Lenaers *et al.*, 2012). Mutaciones en el gen *opa-1*, provocan una morfología mitocondrial anormal, afectando a las crestas y mostrando una estructura mitocondrial alterada junto con una mayor fragmentación mitocondrial.

Este fenotipo está acompañado de una disminución del potencial de membrana mitocondrial y un aumento de la producción de ROS (Zhang *et al.*, 2017). Mutaciones en OPA-1 están asociadas al desarrollo de atrofia óptica dominante (AOD). La AOD se trata de una enfermedad ocular progresiva causada por la degeneración de la capa de células ganglionares de la retina con atrofia ascendente del nervio óptico (Kanazawa *et al.*, 2008).

El gen *eat-3* en *C.elegans* codifica un miembro de la familia de las dinaminas mitocondriales homólogo a OPA-1 en humanos. Mutaciones en el locus *eat-3* generan: 1) Fragmentación mitocondrial, 2) Mitocondrias con MMI desorganizadas y 3) MMI dividida en gran cantidad de crestas, sugiriendo que su función está conservada en *C.elegans*. Además, la pérdida de *eat-3* en *C.elegans* también tiene efectos sobre el crecimiento y el tamaño de la puesta en gusanos. Los gusanos portadores de mutaciones con pérdida de función en el gen *eat-3* se caracterizan por tener una progenie viable pero reducida, un menor tamaño y un retraso en el desarrollo. Al igual que el resto de mutantes *eat*, los gusanos con pérdida de función del gen *eat-3*, muestran defectos en el bombeo faríngeo desarrollando restricción calórica y extendiendo su longevidad considerablemente (33 días frente a los 20 de gusanos WT) (Takayuki *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS

Recientemente se han demostrado evidencias de que el transporte de calcio entre RE y mitocondria mediado por el receptor de IP₃ juegan un papel esencial en modelos de longevidad inducida por estrés de retículo a través de ATF-6 (Burkewitz *et al.*, 2020). Estas evidencias nos llevan a hipotetizar que la remodelación de la señal de calcio entre mitocondria y retículo puede formar parte de los mecanismos moleculares que median otros paradigmas de envejecimiento saludable, como por ejemplo la restricción calórica.

OBJETIVOS

Para verificar esta hipótesis, en este trabajo estudiaremos el papel de la liberación de calcio del retículo endoplásmico mediada por el receptor de IP₃ sobre el aumento de longevidad inducido por restricción calórica. Los objetivos específicos son los siguientes:

- ◆ Verificación del silenciamiento por RNAi del gen *itr-1* (homólogo del receptor de IP₃ en humanos) mediante qPCR
- ◆ Estudio del estado funcional de p-AMPK mediante Western Blot para verificar el estado de restricción calórica del modelo *eat-3*
- ◆ Estudiar la esperanza de vida y movilidad como readout de longevidad saludable en gusanos wild type, gusanos wild type deficientes en *itr-1*, gusanos con pérdida de función en *eat-3* y gusanos con pérdida de función en *eat-3* deficientes en *itr-1*
- ◆ Estudio de la implicación del receptor de IP₃ sobre la fertilidad en gusanos wild type, gusanos wild type deficientes en *itr-1*, gusanos con pérdida de función en *eat-3* y gusanos con pérdida de función en *eat-3* deficientes en *itr-1*
- ◆ Realizar medidas de respiración mitocondrial en gusanos *wild type* y gusanos deficientes en *itr-1* para estudiar la influencia de *itr-1* sobre el estado bioenergético mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

C.ELEGANS COMO MODELO PARA ESTUDIAR EL ENVEJECIMIENTO

C.elegans es un pequeño nematodo de 1mm de largo de vida libre que se alimenta de microorganismos. En el laboratorio se cultiva en céspedes de *Escherichia coli* sembrados sobre placas Petri de agar. Tiene un ciclo de vida relativamente simple y rápido (**Figura 4**), por lo que se puede mantener fácilmente. La mayoría de los individuos adultos son hermafroditas con un juego de cromosomas sexuales XX. Los machos (XO) ocurren con una frecuencia de alrededor del 0,1% debido a una disyunción aleatoria del cromosoma X. En el hermafrodita adulto, se forman los ovocitos y son fertilizados por esperma derivado del propio hermafrodita o por un macho. Del huevo eclosiona una larva L1 que pasa por cuatro estadios diferentes (L1 a L4). Después de la etapa L2, los gusanos pueden progresar a L3 o a larva *dauer*, que se trata de un estado de latencia que les permite resistir al estrés (Corsi *et al.*, 2015).

Si bien la facilidad y el bajo coste del cultivo de *C.elegans* suponen una gran ventaja, también hay que mencionar el amplio y detallado conocimiento que se tiene de muchos aspectos de este animal. Por un lado, se conoce todo el linaje celular (959 células somáticas), así como la localización de dichas células y la historia progenitora de cada una de ellas.

Por otro lado, este animal es transparente y nos permite observar su anatomía, así como el uso de determinados marcadores fluorescentes. Además, presenta una anatomía relativamente simple con tejidos y órganos bien definidos (Park *et al.*, 2017; Kinser & Pincus, 2017).

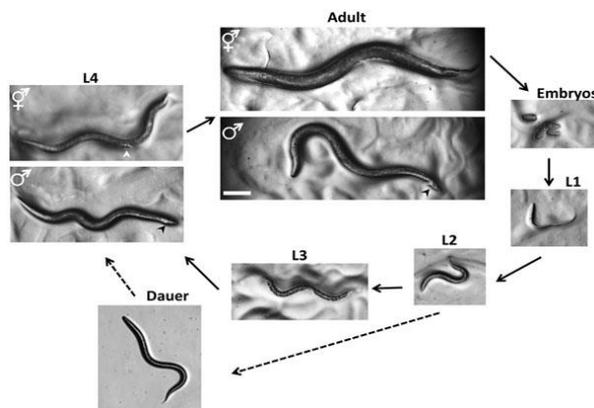


Figura 4. Ciclo de vida del nematodo *C.elegans* (<http://www.wormbook.org/>)

Centrándonos en la anatomía de *C.elegans* (**Figura 5**), debemos destacar algunos órganos y sistemas relevantes como el sistema muscular, la faringe y el sistema nervioso. Con respecto al **sistema muscular**, está formado por músculos estriados y no estriados. Entre estos últimos se incluyen 20 células musculares faríngeas y 10 células de la vaina gonadal contráctil (Gieseler *et al.*, 2017). Los músculos estriados son equivalentes a los músculos esqueléticos en los humanos y la unidad básica es el sarcómero que está altamente conservado entre nematodos y vertebrados (Gieseler *et al.*, 2017). Si nos centramos en la **faringe**, consiste en un músculo no estriado radial que realiza dos tipos de movimientos para cumplimentar su función de captar el alimento, machacarlo e ingerirlo. La faringe se encuentra formada por un total de 60 células entre las que destacan 20 células musculares y 20 neuronas, el resto lo constituyen células estructurales y glandulares (Raizen & Avery, 1994). El bombeo neuromuscular de la faringe tiene similitudes con el corazón de vertebrados (Trojanowski *et al.*, 2016).

Finalmente, el **sistema nervioso** es simple y comparte vías celulares y neurotransmisores con otros organismos superiores (Dexter *et al.*, 2012). Tiene 302 neuronas que se agrupan en cuerpos neuronales desde la cabeza a la cola pasando por el cordón ventral y no posee potenciales de acción convencionales al carecer de canales de Na⁺ dependientes de voltaje que faciliten la conducción nerviosa (Lockery *et al.*, 2009).

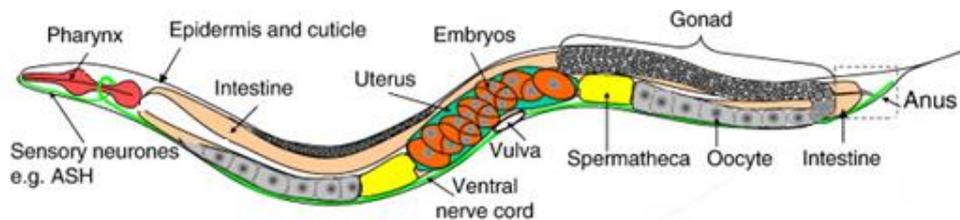


Figura 5. Anatomía de *C.elegans*

Los *C.elegans* envejecidos muestran una disminución de sus características anatómicas y funcionales, incluida la integridad de los tejidos, y la motilidad. Los principales cambios dependientes de la edad a nivel tisular incluyen cambios en los sistemas reproductivo, nervioso y muscular. La tasa de reproducción disminuye, el tamaño y la calidad de ovocitos se deteriora y existe una pérdida de la integridad muscular dando lugar a una motilidad alterada y apariencia anormal (Podshivalova *et al.*, 2017).

◆ **Ventajas de *C.elegans* como modelo experimental en envejecimiento**

C.elegans es un excelente organismo modelo utilizado para la investigación del envejecimiento debido a ciertas características: 1) Facilidad de mantenimiento en el laboratorio, 2) cuerpo transparente que nos permite observar su anatomía, 3) Alta homología con humanos, 4) Disponibilidad de la secuencia del genoma completo, 5) Respuestas biológicas moleculares conservadas, 6) Altas tasas de fecundidad y 7) Disponibilidad de ciertas herramientas de biología molecular como el RNA de interferencia. Además, su corta vida útil y su pequeño tamaño son favorables para el estudio de fármacos anti-envejecimiento (Matsunami., 2018).

◆ **Limitaciones de *C.elegans* como modelo experimental en envejecimiento**

A pesar de las múltiples ventajas, también nos encontramos con ciertas limitaciones a la hora de estudiar el envejecimiento en *C.elegans*. En primer lugar, carece de características anatómicas fundamentales propias de mamíferos, así como el sistema de transporte de la sangre o la barrera hematoencefálica (Weinhouse *et al.*, 2018). Además, en *C.elegans* no existe la metilación del DNA así como la regulación transcripcional de largo alcance, características epigenéticas básica en los mamíferos.

CEPAS

En los experimentos realizados en el siguiente trabajo se han empleado dos líneas de *C.elegans*:

- ◆ **Cepa N2:** Se trata de la cepa silvestre actualmente consolidada como línea control (Sterken *et al.*, 2015)
- ◆ **Cepa *eat-3*:** Como se ha mencionado anteriormente, se trata de una línea caracterizada por presentar una mutación en el gen *eat-3* que codifica para una proteína homóloga a OPA-1 en humanos. Estos gusanos presentan defectos en la función faríngea lo que les conduce a una absorción insuficiente de los alimentos (modelo de RC) (Avery., 1993). Este modelo nos permitirá estudiar los efectos que origina dicha mutación sobre determinados parámetros medibles del gusano.

MANTENIMIENTO DE CEPAS DE *C.ELEGANS*

Las dos cepas de *C.elegans* anteriormente nombradas, N2 y *eat-3*, se mantienen sobre placas de agar. Dichas placas de agar han sido sembradas previamente con un césped bacteriano de *Escherichia coli* (OP50) que les proporcionará el alimento necesario para sobrevivir. Una vez que se han preparado estas placas, se conservan en incubadores a 20°C, garantizando las condiciones adecuadas de humedad, temperatura y concentración de oxígeno para que estos nematodos se desarrollen en condiciones óptimas (Corsi *et al.*, 2015). Empleamos tres métodos para el mantenimiento de los gusanos, garantizándoles disponibilidad de alimento y condiciones ambientales adecuadas:

1. **Transferencia de gusanos mediante medio tampón M9.** Con una pipeta se recogen los nematodos en un eppendorf con 1-2mL de M9. Posteriormente, centrifugamos 1 minuto a 2000 r.p.m (centrifugado suave que mantiene vivos a los gusanos) para que los gusanos precipiten, eliminamos el sobrenadante y pipeteamos el precipitado dónde se encuentran los gusanos sobre placas de agar nuevas.
2. **Chunck.** En este procedimiento con una espátula previamente flameada con etanol 70°, se obtiene un cuadrado de agar de la placa donde tenemos sembrados los gusanos asegurándonos que contiene gusanos y lo transferimos a una placa nueva de manera que los gusanos queden en contacto directo con ambas capas de agar.
3. **Sincronización de huevos** (Véase apartado sincronización de huevos)

PREPARACIÓN DE PLACAS DE AGAR

Para cultivar los gusanos vamos a emplear placas Petri de agar que contienen NGM (*Nematode Growth Medium*) que les proporciona las condiciones óptimas para vivir. La preparación de estas placas tiene una fase del protocolo común independiente de los experimentos para los que se vayan a emplear:

- En una botella de 500ml se pesan: 0,75 g de NaCl, 4,25 g de agar (8,5g/L) y 0,625g de peptona (1,3g/L) y disuelveos en 250ml de agua desionizada.
- Una vez preparado, se autoclava a 125°C durante 55 minutos y posteriormente se pasa a un baño a 55°C durante 15 minutos.
- En la cabina de flujo laminar, se añaden por orden y agitando después de cada compuesto: 250 µL de una disolución de colesterol en etanol 5mg/mL, 250 µL de CaCl₂, 250 µL de MgSO₄ y 6,25ml de tampón KPO₄

Una vez finalizados los siguientes pasos, se van a añadir unos compuestos u otros en función del experimento que vayamos a realizar:

	MORTALIDAD	FERTILIDAD	MOVILIDAD
FuDR 15 μM	125 μ L	-	125 μ L
IPTG 30μM	250 μ L	250 μ L	250 μ L
Carbenecilina 0,2 μM	250 μ L	250 μ L	250 μ L

La fluorodesoxiuridina (FuDR) se trata de un inhibidor de la síntesis de ADN que bloquea la división celular de manera que impide el desarrollo de huevos sin afectar a los gusanos adultos (Mitchell *et al.*, 1979). El isopronil— β -D-1- tiogalactopiranósido (IPTG) es un compuesto inductor de la expresión de los operones de los vectores plasmídicos de las bacterias transformadas (Marbach & Bettenbrock., 2012) y la carbenecilina es un antibiótico que funciona como selector positivo de las bacterias transgénicas.

- Finalmente se vierte el contenido de la botella en placas Petri con una pipeta de 50mL. En el caso de los experimentos de mortalidad se echarán 4 mL por cada placa de 35mm de diámetro y en el resto de experimentos, (movilidad y fertilidad) se verterá un volumen de 10mL por cada placa de 90mm de diámetro. Se deja solidificar a temperatura ambiente durante toda la noche.

IRNA COMO HERRAMIENTA DE GENÉTICA INVERSA

El iRNA ofrece un enfoque rápido y fácil de aplicar para probar la función de un gen y se ha utilizado para probar la función de una gama de genes de señalización de calcio (Yin *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Lorin *et al.*, 2007). Existen tres propiedades del iRNA en *C.elegans*: 1) es inducido por la introducción de dsRNA (RNA de doble cadena), 2) es sistémico, de modo que la introducción de iRNA en una ubicación del animal conduce a una respuesta en otros tejidos (Hunter *et al.*, 2006) , 3) es ambiental por lo que los gusanos pueden absorber dsRNA del medio ambiente cuando ingieren bacterias (Hunter *et al.*, 2006). El iRNA ha revolucionado los estudios de genes a fenotipos y se ha utilizado ampliamente para estudiar la función de *itr-1* (Gower *et al.*, 2005).

◆ Siembra de cepas bacterianas OP50, L4440 e IP3

Tras la solidificación del agar se procede a sembrar las placas con las bacterias. La bacteria que se emplea como alimento para *C.elegans* es *Escherichia coli* y la cepa que se utiliza convencionalmente para el mantenimiento del nematodo se denomina OP50. De manera que las placas de Petri que se vayan a emplear para el mantenimiento del gusano se siembran con 250 μ L de *E.coli*.

Las cepas bacterianas utilizadas para el estudio con ARN de interferencia (RNAi) son L4440 e IP₃. Son transgénicas y ambas portan el vector plasmídico L4440. La cepa bacteriana control, L4440, contiene el plásmido vacío mientras que la cepa IP₃ tiene el RNAi para IP3 cuya función es silenciar el gen *itr-1* de *C.elegans*. El procedimiento de siembra es el mismo descrito anteriormente para *E.coli* OP50, sembramos cada placa de Petri con 250 μ L de la cepa bacteriana correspondiente.

SINCRONIZACIÓN DE GUSANOS

La sincronización de *C.elegans* es un requerimiento en los diferentes experimentos a desarrollar puesto que se necesita que todos los gusanos se encuentren en el mismo estadio de desarrollo. Existen diferentes métodos para sincronizar a los gusanos, pero en este caso vamos a emplear el método de la obtención y siembra de huevos. A continuación, se expone el protocolo de obtención para el que es necesario tener gusanos adultos que contentan huevos en su interior:

- Se recogen los gusanos en un eppendorf con 1,5mL de tampón M9 con una pipeta pasteur de vidrio y se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm para que los gusanos precipiten. Posteriormente, se retira el sobrenadante dejando unos 100 μ L.
- Para liberar los huevos del interior de los gusanos adultos se emplea una mezcla 2:1 de lejía/NaOH, para ello, en el eppendorf se añade 150 μ L de una mezcla 2:1 de lejía/NaOH 5M y 250 μ L de tampón M9.
- Se agita en intervalos de tiempo de 15 segundos cada 2 minutos durante 10 minutos en el vórtex para que se produzca la ruptura mecánica y se liberen los huevos al exterior. Pasados los 10 minutos, se centrifuga 1 minuto a 8000rpm y se decanta el sobrenadante dejando 100 μ L y se resuspende el pellet en ese mismo volumen.
- Se añade 1 mL de tampón M9 para lavar y eliminar el exceso de lejía y NaOH y se centrifuga durante 1 minuto a 8000rpm. Tras está centrifugación se observa un pellet en cola que corresponde a los huevos de los gusanos, decantamos el sobrenadante dejando 100 μ L y resuspendemos el pellet.
- Se pipetea gotas de aproximadamente 15 μ L en placas de agar sembradas con la cepa bacteriana de interés. Dejamos secar las gotas e incubamos las placas a 20°C en posición invertida.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este estudio se emplearon dos cepas de *C.elegans*, N2 que es la línea WT y *eat-3*. En cada una de estas líneas de gusanos, se silencia el gen *itr-1* que codifica para el receptor de IP₃ (IP₃R) mediante RNAi al 100%, empleando la cepa bacteriana IP₃ (Véase apartado “siembra de cepas bacterianas”), de manera que tendríamos dos grupos experimentales: 1) *eat-3* con el gen *itr-1* silenciado (*eat-3 itr-1*) y 2) N2 con el gen *itr-1* silenciado (*N2 itr-1*). Con respecto a los grupos control, se siembran los gusanos N2 y *eat-3* sobre bacterias de la cepa bacteriana L4440 (Véase apartado “siembra de cepas bacterianas”) que a diferencia de la cepa IP₃ contiene el plásmido vacío, de manera que no se produce silenciamiento del gen de interés. Los dos grupos control son: 1) N2 sin silenciamiento en *itr-1* (**N2 Control**) y *eat-3* sin silenciamiento en gen *itr-1* (**eat-3 Control**) (Figura 6).

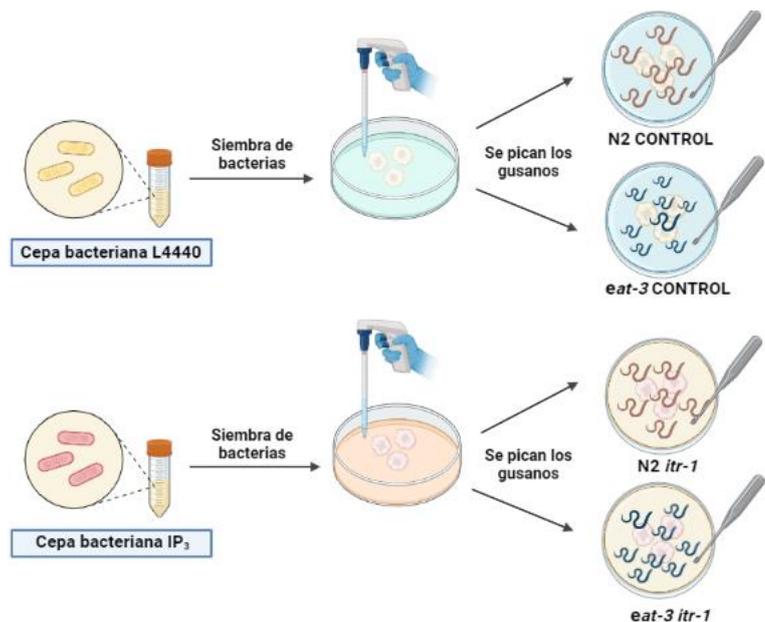


Figura 6. Esquema del diseño experimental

Con cada uno de estos grupos experimentales se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

◆ Curvas de mortalidad

Los experimentos de mortalidad se realizaron sobre placas de Petri de 35 mm de diámetro. Para realizar las curvas de mortalidad hay que sincronizar los gusanos (*Según protocolo “sincronización de gusanos”*) de forma que todos ellos estén a día 1 de estado adulto (tras etapa L4). Debido a que los gusanos *eat-3* tardan un día más en desarrollarse que los N2 (Takayuki *et al.*, 2008), se prepararan los huevos de *eat-3* un día antes que los de N2, de manera que tres días después de la eclosión en el caso de N2 y cuatro días en el caso de *eat-3*, alcanzarían el estadio adulto.

Una vez que tenemos los gusanos sincronizados en estado adulto, se pican alrededor de 100 gusanos para cada una de las cuatro condiciones experimentales (N2 *itr-1*, N2 Control, *eat-3 itr-1* y *eat-3* Control), repartidos en 10 placas Petri de 35mm de diámetro con FuDR (10 gusanos/placa), unas sembradas con la cepa bacteriana L4440 para los grupos *eat-3* y N2 control y otras sembradas con la cepa IP₃ para los grupos *eat-3* y N2 *itr-1*. En total se utilizaron alrededor de 1200 gusanos (600 *eat-3* y 600 N2) para las tres curvas de mortalidad realizadas (**Figura 7**).

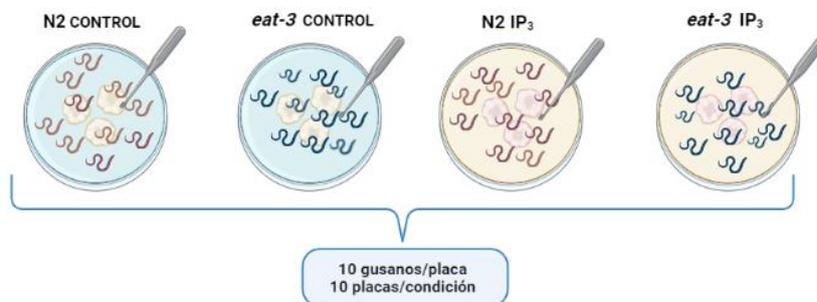


Figura 7. Esquema del diseño de los experimentos de mortalidad

Una vez que los gusanos han sido picados en sus respectivas placas, se introducen en el incubador a 20°C y se procederán a contar en los días próximos, de manera que se anotarán en una plantilla cuántos de ellos permanecen vivos, cuántos de ellos han muerto y cuántos de ellos han sido censurados (gusanos que se van de la placa o tienen protrusión vulvar). Se considera que un gusano está muerto cuando permanece estático en forma de media luna o de palillo y no mueve la cabeza. Finalmente, las curvas de mortalidad se obtienen introduciendo los datos en el programa Origin pro 8.5 una vez que han muerto todos los gusanos.

◆ Análisis de la fertilidad

Para estudiar la fertilidad de los cuatro grupos experimentales, al igual que en las curvas de mortalidad, se requiere dos tipos de placas Petri de 90mm de diámetro sin FuDR: unas sembradas con la cepa bacteriana L4440 para N2 y *eat-3* control (sin silenciamiento del gen *itr-1*) y otras sembradas con la cepa bacteriana IP₃ para N2 y *eat-3 itr-1* (con silenciamiento del gen *itr-1*). En cada una de las placas Petri se pica un gusano en L4 de cada cepa (N2 y *eat-3*), de manera que tenemos cuatro placas, una por cada condición experimental (N2 *itr-1*, N2Cont, *eat-3 itr-1* y *eat-3* Cont). Cada 24 horas y durante 5 días, se transferirá cada gusano a una placa nueva y se irán contando el número de larvas que van poniendo por cada día (**Figura 8**). Con los datos recopilados, se realizará un Análisis de la Varianza (ANOVA) para obtener las gráficas de fertilidad con el programa SPSS.

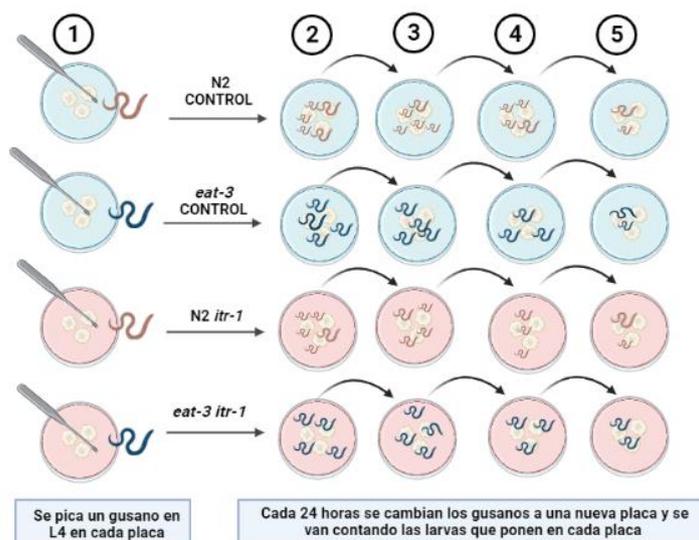


Figura 8. Esquema del diseño de los experimentos de fertilidad

◆ Análisis de la movilidad

Primeramente, se sincronizaron los gusanos de cada cepa (Según protocolo “sincronización de gusanos”) y se transfirieron entre 55-60 gusanos a día 1 de estado adulto a cada placa Petri de 90mm con FuDR con la condición correspondiente (IP3 y L4440). Se incuban a 20°C y se graban vídeos de 1 minuto de cada placa a día 1,2,3,4 y 5 de edad adulta, utilizando una cámara acoplada a una lupa binocular a una magnificación de 10X. Posteriormente, se realiza el análisis de los vídeos con el programa *ImageJ*, utilizando el *pluging Wormtrack* y se analizan los siguientes parámetros: velocidad media (V_{media}), velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), *Body length per second* (BLPS) y *Body bends per second* (BBPS), que mide las veces que el cuerpo de cada individuo se curva con respecto al tiempo.

◆ Western Blot (WB) de p-AMPK

Homogeneización de gusanos

- Para el experimento de WB se requieren unos 400 gusanos adultos a día 3-4 de cada cepa (N2 y *eat-3*). Primeramente, se recogen los gusanos de las placas con 1mL del buffer M9 y se centrifugan 1 minuto a 2000rpm. Posteriormente, se realizan tres lavados más con M9 para eliminar restos de OP50 y se vuelve a centrifugar, eliminando el sobrenadante.
- Se añade 100µL de Ripa buffer (100 µL de inhibidor de fosfatasa (*Phosphostop*) y 40 µL del inhibidor de proteasas (*Complete*)) a las muestras.
- Seguidamente, se sonicen las preparaciones durante 10 seg ON/10 seg OFF (Amplitud 60) durante tres veces. Se repite este ciclo tres veces más y se observa al microscopio si quedan restos de cutícula.
- Finalmente, se centrifuga a 16000g, a 4°C durante 15 minutos y nos quedamos con el sobrenadante. Se congelan las muestras a -80°C.

Cuantificación de proteínas mediante BCA

Para conocer la concentración de proteínas que tenemos en cada muestra se emplea un kit comercial de ácido biocinonínico (BCA), cuyo ensayo se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} en condiciones alcalinas (Smith, 1985).

Los iones Cu^+ se unen al BCA y forman un compuesto coloreado que absorbe luz a 562nm, de manera que la absorbancia va a ser directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en nuestra solución y puede ser estimada por comparación con una curva patrón de albúmina a unas concentraciones conocidas (Johnson, 2012).

Electroforesis SDS-PAGE e inmunotransferencia (Figura 9)

Las preparaciones de proteínas se ajustaron a 25µg/ml y se añadió tampón Laemmli+ β-mercaptoetanol antes de hervir las muestras a 95°C durante 5 minutos. Se carga un volumen de 20µl en cada pocillo de un gel de acrilamida al 10% para la separación mediante SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa y se bloquearon con BSA al 5% antes de la incubación con anticuerpos primarios anti de Thr172-AMPK durante toda la noche y a 4°C en una concentración 1:1000. Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-T y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario de conejo conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron en un sistema Gel Doc (Bio Rad) usando el reactivo de revelado. Las bandas se cuantificaron con el software de análisis de imagen Fiji. Los resultados se normalizaron con respecto a la cantidad de proteína total y se analizaron mediante un t-test.

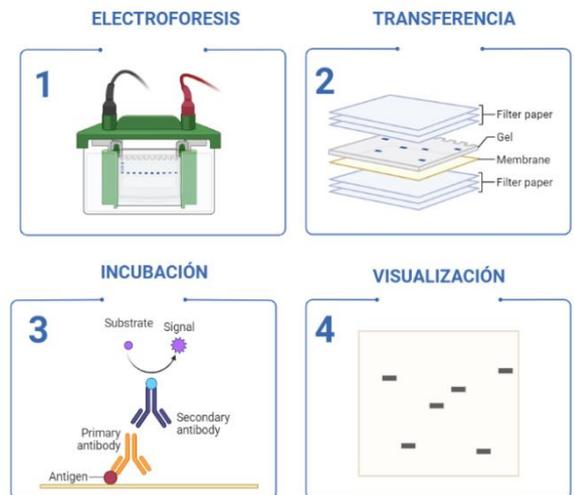


Figura 9. Protocolo Western Blot

♦ SeaHorse (Figura 10)

Para determinar el consumo de oxígeno en *C.elegans*, se siguió el protocolo publicado por Koopman *et al.*, 2016, empleando un analizador metabólico XFe24. Inicialmente, se lavan las poblaciones de gusanos sincronizadas a día 5 adultos durante dos veces con M9 y se transfieren a una placa de cultivo de tejidos (SeaHorse, Agilent) con una densidad de 15-30 gusanos por pocillo. Las tasas de respiración se midieron cada 5 minutos utilizando el siguiente protocolo de medición: 2 minutos de mezcla, 30 segundos de espera y 2 minutos de medición. El experimento se realizó a 25°C y se añadieron moduladores de la cadena respiratoria (FCCP 10µM; Azida de sodio 50mM) para determinar la respiración máxima y basal.

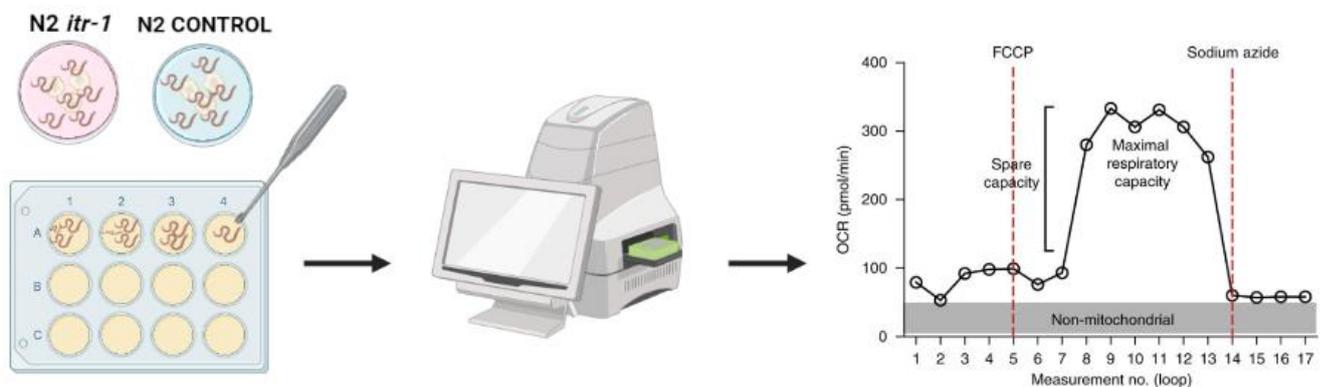


Figura 10. Protocolo SeaHorse

◆ **RT-qPCR de los mutantes *itr-1***

Para poder comprobar que la expresión del gen *itr-1* estaba eficazmente silenciada en los nematodos expuestos a RNAi, se llevó a cabo una RT-qPCR utilizando los siguientes cebadores, *forward*: CCATCATATGGCCGGGTTTCG y *reverse*: GGCCGTCGTTTCGTTTTTCGT.

El ARN total se obtuvo mediante congelación/descongelación y homogeneización y luego se extrajo el ARN con el mini kit RNeasy, tratado con RNasas-Free DNase Set (Qiagen) y luego se precipitó con etanol y se resuspendió con agua. Las concentraciones y la calidad del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro NanoDrop. Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa con el iScript cDNA Synthesis Kit utilizando cebadores aleatorios y finalmente se realizó la RT-qPCR utilizando el sistema de PCR LightCycler 480.

RESULTADOS

♦ El tratamiento con RNAi para el receptor de IP3/*itr-1* disminuye de forma eficiente los niveles de mRNA de *itr-1*.

Con el objetivo de estudiar la importancia de la señalización por calcio vía receptor de IP3 en la longevidad inducida por restricción calórica, decidimos perturbar nuestro sistema biológico disminuyendo la expresión del receptor de IP3/*itr-1* mediante RNAi. La cuantificación mediante qPCR de los niveles de RNAm para *itr-1* en cultivos de nematodos expuestos a *itr-1* RNAi respecto a nematodos expuestos a RNAi sin diana, muestran que los niveles de RNAm para *itr-1* disminuyeron en un 69% tras la exposición a *itr-1* RNA (Figura 11). Concluimos que la exposición de los nematodos a *itr-1* RNAi disminuye de forma significativa la expresión de *itr-1*.

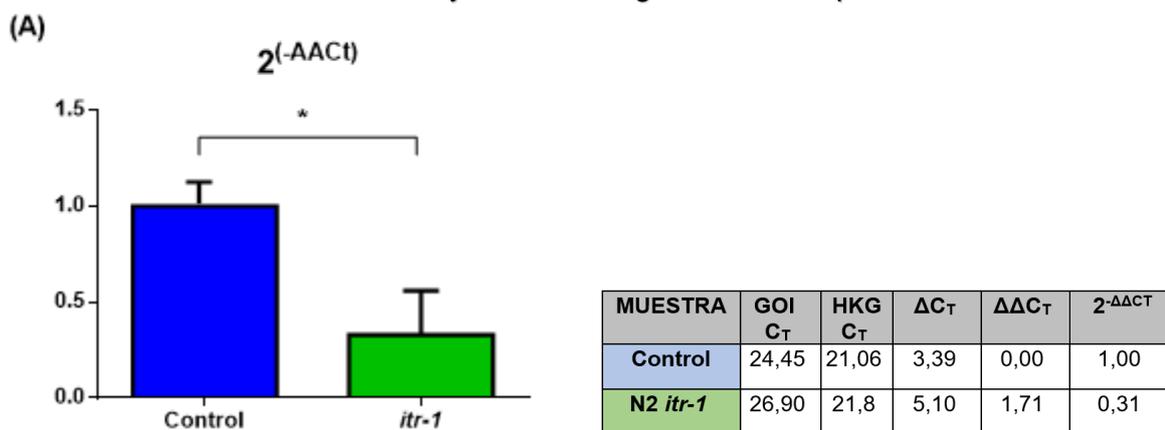


Figura 11. qPCR del gen *itr-1* en la cepa N2 (A) Expresión del gen *itr-1* en gusanos N2 con silenciamiento en *itr-1* y en gusanos N2 control representado mediante $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$. Barras de error: error estándar.

♦ La actividad de AMPK está significativamente estimulada en los mutantes *eat-3*

La activación de la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) juega un papel clave en la regulación de los mecanismos celulares de adaptación desencadenados por la restricción calórica (Greer *et al.*, 2007). El mecanismo de activación canónica de AMPK en respuesta a una elevación de los niveles de AMP implica la autofosforilación de la Thr-172 de AMPK α (Steinberg *et al.*, 2022). Por tanto, es posible utilizar el estado de fosforilación de Thr-172 AMPK α como medida del grado de actividad del enzima. Para verificar el estado de restricción calórica de los mutantes *eat-3*, decidimos cuantificar el estado de fosforilación de la Thr-172 de AMPK α mediante western-blot tanto en mutantes *eat-3* como en nematodos control (N2).

Las imágenes de los western-blot reveladas con un anticuerpo dirigido exclusivamente contra p-Thr-172 AMPK mostraron una sola banda, que además era compatible con el tamaño de AMPK α (62 KdA) (Figura 12A). Las bandas fueron cuantificadas y normalizadas por la cantidad total de proteína estimada con rojo ponceau (Figura 12B). Los mutantes *eat-3* muestran un incremento en los niveles de Thr-172 AMPK α fosforilada con respecto al control (N2) ($p < 0,0001$) (Figura 12). Estos resultados indican un aumento de actividad AMPK en los mutantes *eat-3*. Esta activación compensatoria de los mutantes *eat-3* es consistente con una producción de ATP disminuida, consecuencia del estado de restricción calórica en el que se encuentran dichos mutantes.

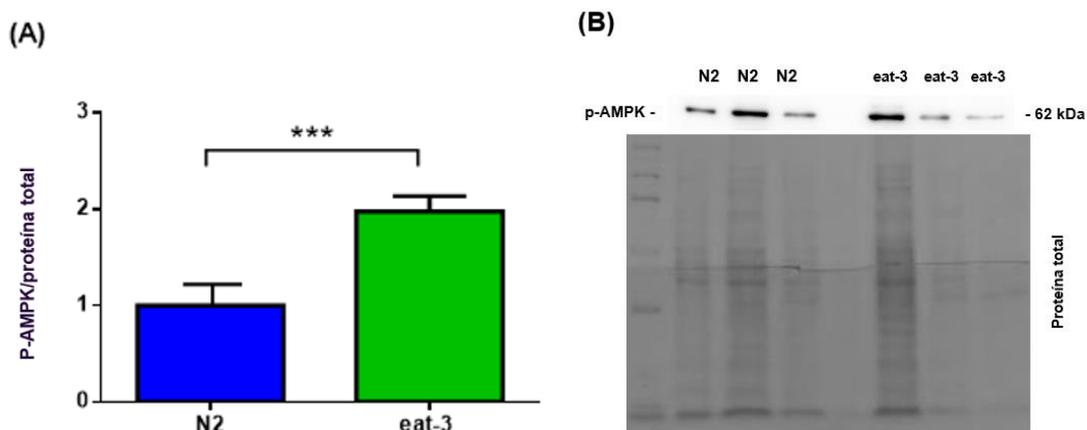


Figura 12. Western blot para p-AMPK. (A) Representación de p-AMPK normalizado con respecto a la proteína total para eat-3 y N2. Barras de error: error estándar. **(B)** Representación del WB y cuantificación de proteínas totales mediante tinción con rojo de Ponceau.

♦ **El incremento de la longevidad inducido por restricción calórica en mutantes eat-3 no requiere la actividad del receptor de IP3/*itr-1***

Para estudiar la relevancia de la señalización por calcio vía receptor de IP3 en la longevidad inducida por restricción calórica se realizó un estudio de supervivencia en gusanos *wild type* (N2), gusanos *wild type* deficientes en *itr-1* (N2 *itr-1*), gusanos con pérdida de función en *eat-3* y gusanos con pérdida de función en *eat-3* deficientes en *itr-1* (*eat-3 itr-1*).

Se realizaron 3 experimentos independientes (**Figura 13**). En el primero de ellos (n=362) (**Figura 13A**), se observa que la supervivencia de N2 cuando silenciamos el gen *itr-1* (N2 *itr-1* (n=146)) es significativamente menor a la de N2 (n=107). Sin embargo, no se observan diferencias en la supervivencia entre *eat-3* (n=52) y *eat-3* con el gen *itr-1* silenciado (*eat-3 itr-1*(n=57)). Además, en este caso, a diferencia de las otras dos mortalidades, no hay diferencias significativas en la supervivencia de *eat-3* y N2, estos resultados contradictorios con respecto a las otras dos tandas de mortalidades, se puede deber a una n más pequeña o a una gran cantidad de gusanos censurados. En el segundo experimento de supervivencia (**Figura 13B**), se observa que la supervivencia de N2 Control (n=169) es significativamente menor a la de *eat-3* (n=117), confirmando así el modelo de longevidad inducida por restricción calórica de *eat-3*. Por otro lado, la longevidad de los gusanos N2 cuando silenciamos *itr-1* (N2 *itr-1*(n=139)) es significativamente menor con respecto a su control (N2), mientras que en la cepa *eat-3*, cuando silenciamos el gen *itr-1* (*eat-3 itr-1*(n=110)), no se observa efecto sobre la supervivencia. En el tercer experimento de supervivencia (n=499) (**Figura 13C**), se observa al igual que en el segundo que la supervivencia de N2 (n=136) es significativamente menor a la de *eat-3* (n=110), por lo que se volvería a confirmar el modelo de longevidad inducida mediante restricción calórica de *eat-3*. También, el silenciamiento del gen *itr-1* induce una reducción en la vida media en la cepa N2, (N2 *itr-1* (n=108)) con respecto a su control, (N2). Sin embargo, no se puede observar que dicha reducción de la vida media sea significativa en la cepa *eat-3* cuando silenciamos el gen *itr-1*.

Finalmente se calculó la esperanza de vida media para cada grupo experimental (**Figura 13D**). Por un lado, se observa que la esperanza de vida media (EVM) de la cepa *eat-3* es significativamente mayor (p<0,01) a la de la cepa *wild type* (N2 Control). La EVM de *eat-3* es de 18,19 días mientras que la EVM de N2 es de 15,27 días (**Figura 14E**). Estos resultados confirman así el modelo de longevidad inducida por restricción calórica de *eat-3*.

Por otro lado, los resultados indican que el silenciamiento del gen *itr-1* disminuye significativamente ($p < 0,05$) la esperanza de vida media en individuos *wild type* (N2), que descendió de 15,27 a 13,53 días (**Figura 14D-E**). Sin embargo, sorprendentemente esta reducción de la EVM no se observa en la cepa *eat-3* cuando silenciamos el gen *itr-1* (**Figura 14A-B**). Concluimos que el aumento de longevidad inducido por restricción calórica en el mutante *eat-3* no requiere la actividad del receptor de IP3 y que nuestro modelo de longevidad inducida por restricción calórica esta de alguna manera protegido frente a la pérdida de función del receptor de IP3.

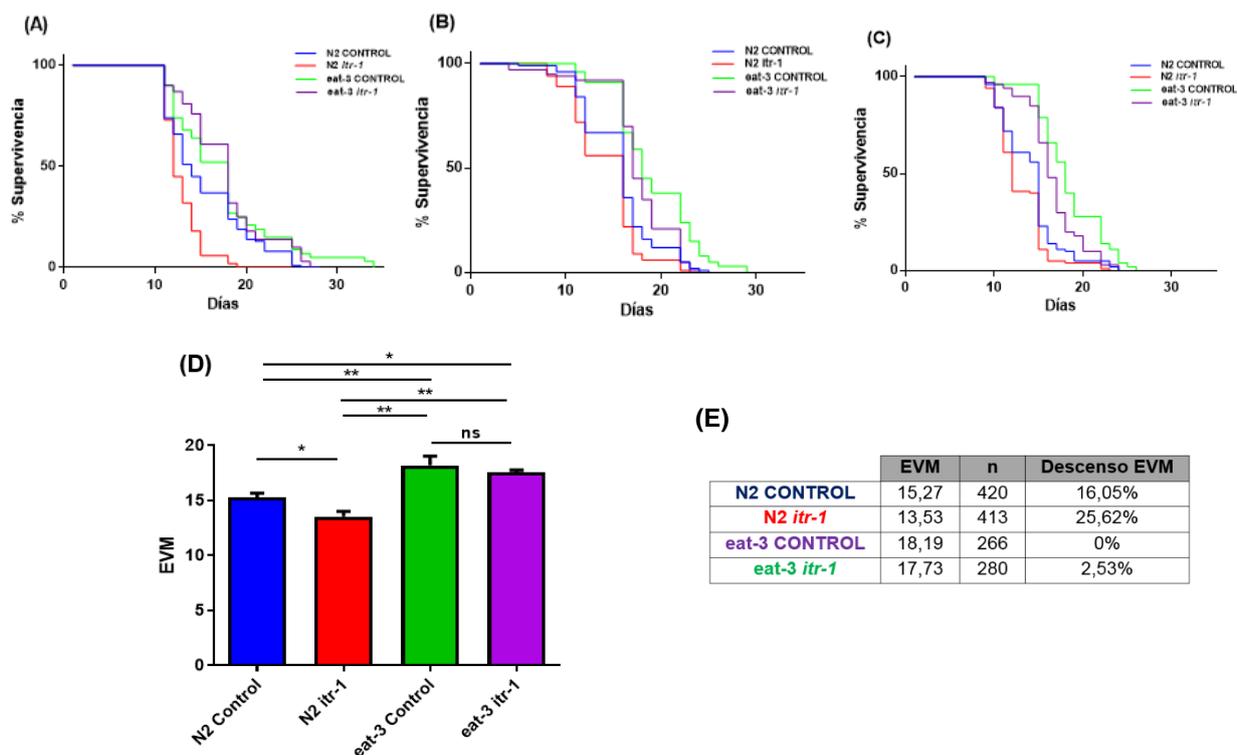


Figura 14. (A) Primera curva de supervivencia de los cuatro grupos experimentales N2 *itr-1* (n=100), N2Cont (n=100), *eat-3* *itr-1* (n=50) y *eat-3*Cont (n=50). (B) Segunda curva de supervivencia de los cuatro grupos experimentales N2 *itr-1* (n=100), N2Cont (n=100), *eat-3* *itr-1* (n=50) y *eat-3*Cont (n=50). (C) Tercera curva de supervivencia de los cuatro grupos experimentales N2 *itr-1* (n=145), N2Cont (n=136), *eat-3* *itr-1* (n=108) y *eat-3*Cont (n=110). (D) Esperanza de vida media (EVM) de los cuatro grupos experimentales N2 *itr-1* (n=413), N2Cont (n=420), *eat-3* *itr-1* (n=280) y *eat-3*Cont (n=266). *p-valor<0,05. **p-valor<0,01.ns: no significativo. Distancia Barras de error: error estándar. (E) Tabla de estudio estadístico y cálculo del descenso de la esperanza de vida media de los grupos experimentales con respecto a *eat-3* Control que muestra la EVM más alta

◆ Efecto del receptor de IP3 sobre el envejecimiento reproductivo en nuestro modelo genético de restricción calórica

El envejecimiento provoca un amplio rango de cambios degenerativos progresivos, entre ellos la disminución de la fertilidad y la función reproductiva. En *C.elegans*, los individuos alcanzan un pico de reproducción de progenie a los dos días de adulto, que después va rápidamente declinando. La producción de progenie es prácticamente inexistente a partir del día 8 (**Figura 15B**). Algunas intervenciones, como la restricción calórica, modulan el envejecimiento reproductivo (Crawford *et al.*, 2007; Bertoldo *et al.*, 2015). Para estudiar la interacción entre la restricción calórica por falta de función de *eat-3* e *itr-1* en el envejecimiento reproductivo realizamos experimentos de fertilidad.

Con respecto al número total de huevos (**Figura 15A**) se puede observar que tanto la fertilidad de N2 como la del grupo N2 con silenciamiento en *itr-1* es significativamente mayor con respecto a los mutantes con pérdida de función en el gen *eat-3*. Además, la deficiencia en *itr-1* incrementó ligeramente la fertilidad en los mutantes con pérdida de función de *eat-3*.

En relación con el promedio de huevos por día (**Figura 15B**), pudimos observar que a día 1 y 2 la puesta de huevos fue significativamente superior en nematodos *wild type* deficientes en *itr-1*. Concluimos que la deficiencia en el receptor de IP3/*itr-1* no altera el envejecimiento reproductivo en nuestro modelo de restricción calórica, sin embargo, acelera significativamente la fertilidad en nematodos jóvenes.

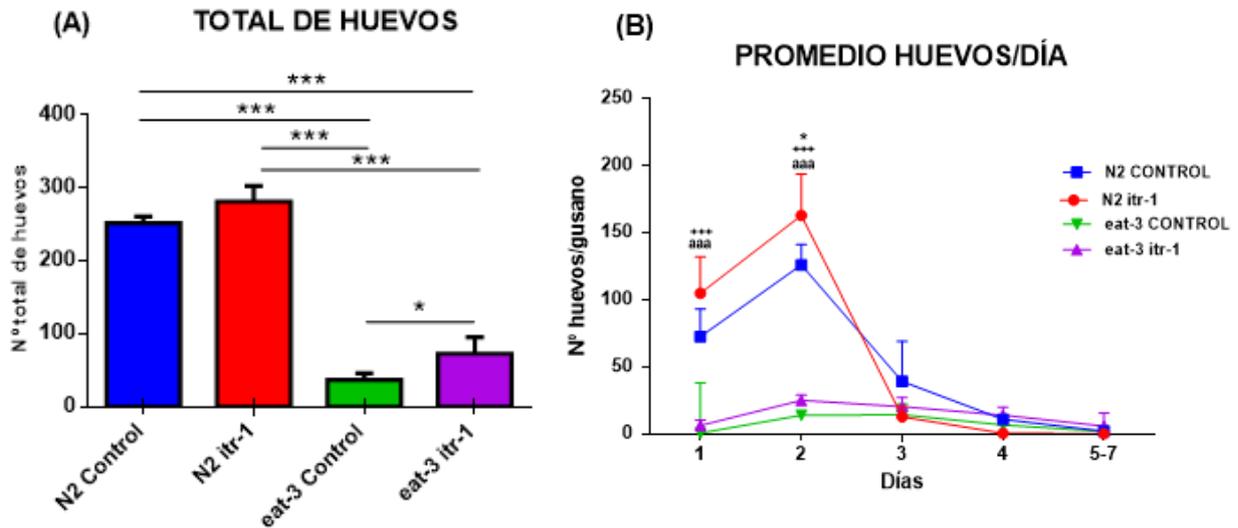


Figura 15. (A) Puesta total de huevos de gusanos de cada condición experimental (N2 *itr-1*, N2Cont, *eat-3* *itr-1* y *eat-3*Cont) (n=16). *p-valor<0,05, ***p-valor<0,005. (B) Número de huevos al día de cada condición experimental (N2 *itr-1*, N2Cont, *eat-3* *itr-1* y *eat-3*Cont) (n=16). *p-valor<0,05 con respecto al correspondiente valor de N2Cont, ^{aaa}p-valor<0,005 con respecto al correspondiente valor de *eat-3*IP3, ⁺⁺⁺p-valor<0,005 con respecto al correspondiente valor de *eat-3*Cont; Barras de error: error estándar. El experimento se realizó por cuadruplicado (n=16) y los datos se compararon mediante un ANOVA de dos factores.

◆ **El incremento de longevidad inducido por restricción calórica en los mutantes *eat-3* no se correlaciona con una mejora en la movilidad de los nematodos**

Aunque la longevidad inducida por restricción calórica en los mutantes con pérdida de función de *eat-3* no parece depender del receptor de IP3, posteriormente nos preguntamos si el estado físico general de organismo (o *healthspan*) en los mutantes *eat-3* en restricción calórica era dependiente del receptor de IP3. La movilidad es un buen parámetro para estimar este concepto. Se estudió dicha movilidad en los cuatro grupos experimentales anteriormente mencionados (N2 Control, N2 *itr-1*, *eat-3* y *eat-3* *itr-1*). Para ello, se analizaron vídeos de 1 minuto a día dos de estado adulto con el programa *ImageJ* (plugin *Wrmtrack*) y se calcularon los datos relativos a diversas variables relacionadas con la movilidad del nematodo, como la velocidad máxima, la velocidad media, el número de giros por segundos (BLPS) o distancia recorrida (**Figura 16**).

Podemos observar que la pérdida de función de *eat-3* disminuyó considerablemente todos los parámetros de movilidad. Esto indica que en nuestro modelo de restricción calórica el aumento de la longevidad no está acompañado de una mejora del estado físico general del organismo (*fitness*). Además, el silenciamiento de *itr-1* no modificó ninguno de los parámetros de movilidad ni en organismos *wild type*, ni en organismos con pérdida de función del gen *eat-3*.

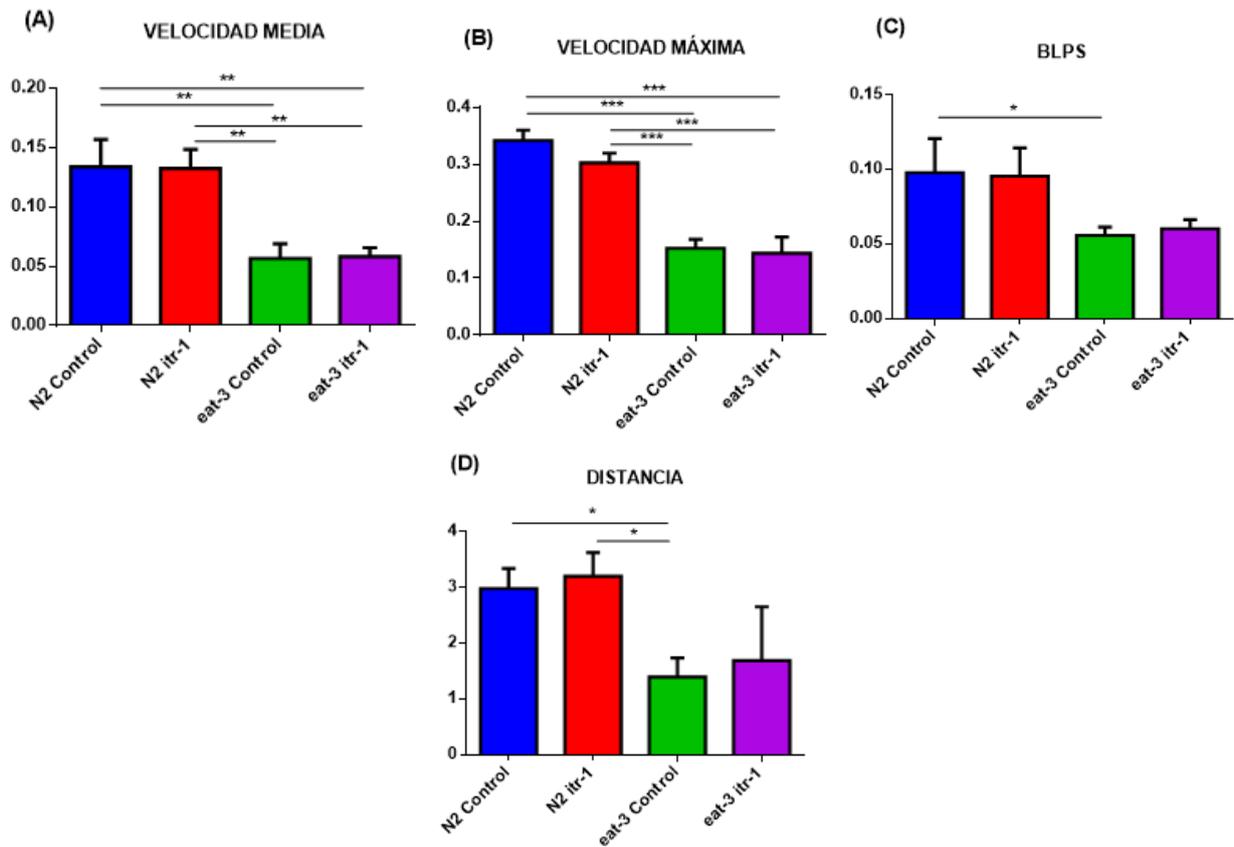


Figura 16. (A) Velocidad media (mm/s²) a día 2 de N2 *itr-1* (n=85), N2Cont (n=81), *eat-3* *itr-1* (n=85) y *eat-3*Cont (n=77). **p-valor<0,01. (B) Velocidad máxima (mm/s) a día 2 de N2 *itr-1* (n=85), N2Cont (n=81), *eat-3* *itr-1* (n=85) y *eat-3*Cont (n=77). ***p-valor<0,005. (C) BLPS (*body length per second*) a día 2 de N2 *itr-1* (n=85), N2Cont (n=81), *eat-3* *itr-1* (n=85) y *eat-3*Cont (n=77). *p-valor<0. (D) Distancia (en línea recta) recorrido por el gusano (mm) a día 2 de N2 *itr-1*, N2Cont, *eat-3* *itr-1* y *eat-3*Cont (n=328). *p-valor<0.

◆ **La deficiencia en el receptor de IP3/*itr-1* no afecta ni a la respiración mitocondrial basal ni a la máxima**

Un número consistente de evidencias sugiere que el receptor de IP3 sostiene la bioenergética mitocondrial, promoviendo el transporte de calcio desde el retículo endoplásmico a la mitocondria (Rossi *et al.*, 2018). Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo medidas a tiempo real de las tasas de consumo de oxígeno OCR (*oxygen consumption rate*) de gusanos N2 con el gen *itr-1* silenciado (N2 *itr-1*) y gusanos *wild type* (N2). Como se observa a continuación (**Figura 17**), no se apreciaron diferencias significativas en la respiración basal, máxima y respiración no mitocondrial entre los gusanos N2 con silenciamiento en el gen *itr-1* y los gusanos *wild type*.

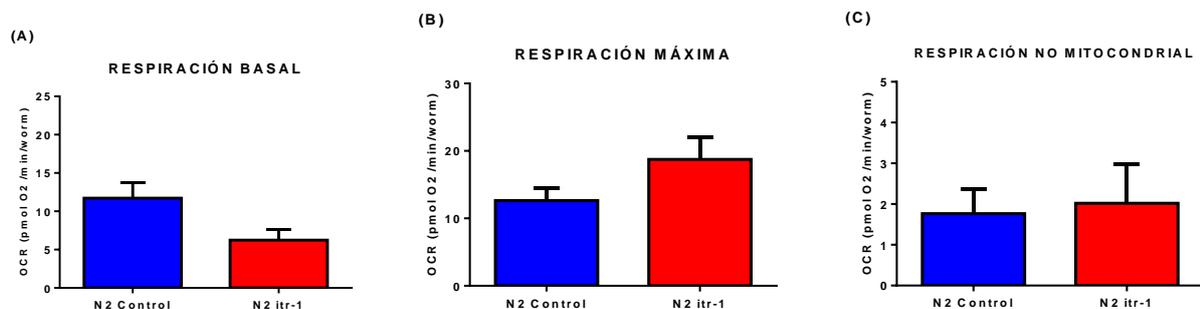


Figura 17. Estudio de la respiración en N2 *itr-1* y N2 Control. (A) Respiración basal (OCR) en pmol O₂ por minuto y por gusano. (B) Capacidad respiratoria máxima (OCR) en pmol de O₂ por minuto y por gusano. (C) Respiración no mitocondrial tras inhibir la cadena respiratoria de electrones con azida

DISCUSIÓN

La hipótesis del presente trabajo plantea la idea de que el transporte de calcio entre la mitocondria y el RE, mediado por el receptor de IP3, podría ser uno de los mecanismos moleculares implicado en el aumento de la longevidad mediado por restricción calórica. Esta hipótesis ha sido recientemente propuesta en modelos de longevidad inducida por estrés de retículo (Burkewitz *et al.*, 2020).

Como se puede observar en la figura 11A, la cepa mutante *eat-3* tiene una esperanza de vida mayor en relación a la cepa *wild type* o N2. Estos mutantes *eat-3* se alimentan mucho menos que los N2 como consecuencia de su defecto en la función faríngea y esto les induce a encontrarse en un estado de restricción calórica (Avery., 1993). Este estado de RC explica el aumento de la longevidad. En este sentido, hemos observado que la actividad AMPK (un marcador molecular clásico de adaptación a la restricción calórica) se encuentra significativamente aumentada en los mutantes con pérdida de función del gen *eat-3*. Por lo tanto, pensamos que es un excelente modelo para identificar nuevos mecanismos moleculares asociados a la longevidad inducida por restricción calórica. Los experimentos de longevidad nos muestran que cuando silenciamos el gen *itr-1* que codifica para el receptor de IP3, se observa una disminución de la supervivencia en la cepa N2, de manera que la esperanza de vida media se reduce de 15,27 días a 13,53 días. Sin embargo, a diferencia de lo que se plantea en la hipótesis, la supervivencia de la cepa *eat-3* no se ve significativamente reducida cuando se silencia el gen *itr-1*. Por tanto, el receptor de IP3 no parece jugar un papel relevante en la longevidad inducida por restricción calórica en nuestro mutante *eat-3*. Se ha propuesto que la supresión del receptor de IP3 genera un incremento de la fusión mitocondrial que suprime el incremento de longevidad inducido por estrés de retículo (Burkewitz *et al.*, 2020). Podríamos por lo tanto especular con la posibilidad de que nuestro modelo de longevidad no depende de *itr-1* porque no puede incrementar la fusión de las mitocondrias, ya que *eat-3* es parte de la maquinaria molecular que interviene en su fusión.

En el análisis de la fertilidad podemos apreciar cómo los mutantes *eat-3* presentan una reducción en el número de puesta con respecto a N2. Los tamaños reducidos en la puesta de *eat-3* no se deben a la retención de huevos, ni a un mayor número de huevos muertos o larvas en las placas. En la literatura se ha descrito una escasez de núcleos en las gónadas. Menos ovocitos podrían reflejar tasas reducidas de división mitótica en el extremo distal de la gónada (Kanazawa *et al.*, 2008). Además, la producción de ovocitos también podría verse comprometida en etapas posteriores, ya que la disponibilidad de la proteína de la yema y otros constituyentes principales de los ovocitos se pueden ver afectados por el estado metabólico de restricción calórica del animal (Kanazawa *et al.*, 2008). Con respecto al papel del gen *itr-1* en el proceso de ovulación, ciertos estudios han demostrado que los mutantes *itr-1* presentan defectos en el proceso de ovulación. Durante la ovulación normal, las células de la vaina proximal de la gónada experimentan una frecuencia creciente de contracciones. En la ovulación, la contracción de las células de la vaina tira de la espermateca sobre el ovocito en desarrollo antes de que el extremo proximal de la gónada de la espermateca se contraiga para aislar el ovocito. En los mutantes *itr-1* la frecuencia de las contracciones rítmicas en las células de la vaina se reduce y la constricción de la espermateca es aberrante, por lo tanto, cuando la espermateca se contrae, a menudo desgarrar el ovocito dejando atrás el núcleo. Como resultado, se acumulan tanto desechos no nucleados como ovocitos fertilizados, pero en replicación.

Con respecto a la movilidad, los mutantes *eat-3* presentan parámetros de velocidad media, velocidad máxima, distancia y longitud reducidos con respecto a los gusanos *wild type*. Semejantes resultados obtuvieron Byrne *et al.*, 2019 cuando analizaron el comportamiento de natación y la tasa de excavación del mutante *eat-3*, descubriendo que la fuerza muscular estaba comprometida en dichos mutantes. Esto se debe a que los cambios en la morfología mitocondrial de las células musculares que presentan los mutantes *eat-3*, se asocian con reducciones significativas en la actividad motora y fuerza muscular. Por otro lado, el silenciamiento del receptor de IP3 no produce cambios significativos sobre los diferentes parámetros de movilidad analizados, ni en cepas *wild type*, ni en mutantes con pérdida de función en *eat-3*. Por tanto, el receptor de IP3 no interviene en la movilidad de *eat-3* y N2, aunque, sí que es conocido el papel de *itr-1* en otros programas motores como las contracciones bien definidas que provocan la defecación en *C.elegans* (Branicky & Hekimi., 2006)

Además, para conocer el papel del receptor de IP3 en el sostenimiento del estado bioenergético de los nematodos, realizamos medidas de consumo de oxígeno sobre la respiración basal, respiración máxima o desacoplada y respiración no mitocondrial. Según se muestra en la figura 14, el silenciamiento de *itr-1* no indujo cambios en ninguno de los parámetros estudiados. De acuerdo con estos resultados, la deficiencia en el receptor de *itr-1* no afectaría al estado bioenergético mitocondrial del nematodo. Estos datos contradicen las propuestas de otros investigadores. Por ejemplo, en modelos de mamíferos se ha observado que el silenciamiento del receptor de IP3 originaba una producción de ATP deteriorada y disfunción bioenergética aguas abajo del receptor de IP3 (Cárdenas *et al.*, 2010).

El presente trabajo, aporta una base sólida para las investigaciones que traten de buscar los mecanismos o vías de señalización que subyacen al aumento de la longevidad en modelos de restricción calórica. Para concluir, en investigaciones futuras, planteamos verificar nuestra hipótesis en otros modelos de restricción calórica que no presenten los *handicaps* del mutante *eat-3* (defectos en la movilidad, falta de fusión mitocondrial...etc).

CONCLUSIONES

- La exposición de nematodos a *RNAi* dirigido contra *itr-1* disminuye significativamente la expresión de este gen.
- Los mutantes con pérdida de función del gen *eat-3* muestran niveles significativamente altos de actividad AMPK. Esto indica la activación de mecanismos celulares de compensación asociados a la restricción calórica.
- Los mutantes con pérdida de función del gen *eat-3* tienen una mayor esperanza de vida media que los gusanos *wild type* (N2).
- El silenciamiento del gen *itr-1* disminuye significativamente la longevidad de gusanos *wild type* (N2). Sorprendentemente la pérdida de función del gen *eat-3* previene la disminución de la longevidad inducida por el silenciamiento de *itr-1*.
- La movilidad de los mutantes con pérdida de función en *eat-3* está notablemente alterada con respecto a la cepa salvaje y el silenciamiento del gen *itr-1* no altera los parámetros de movilidad ni en los mutantes *eat-3* ni en los gusanos salvajes.
- La tasa de fertilidad de los mutantes *eat-3* es significativamente menor que la de la cepa salvaje y el silenciamiento del gen *itr-1* no afecta a la fertilidad en los gusanos N2, mientras que aumenta la puesta de huevos en los mutantes *eat-3*.
- El silenciamiento del gen *itr-1* no altera el estado bioenergético mitocondrial de gusanos N2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anton, S., & Leeuwenburgh, C. (2013). Fasting or caloric restriction for healthy aging. *Experimental gerontology*, 48(10), 1003–1005.
2. Avery L. (1993). The genetics of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133(4), 897–917. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.4.897>
3. Bargmann C. I. (1998). Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2028–2033. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2028>
4. Baylis, H. A., & Vázquez-Manrique, R. P. (2011). Reverse genetic strategies in *Caenorhabditis elegans*: towards controlled manipulation of the genome. *TheScientificWorldJournal*, 11, 1394–1410. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.126>
5. Baylis, H.A., Furuichi, T., Yoshikawa, F., Mikoshiba, K., & Sattelle, D.B. (1999). Inositol 1,4,5-triphosphate receptors are strongly expressed in the nervous system, pharynx, intestine, gonad and excretory cell of *C.elegans* and are encoded by a single gene (*itr-1*). *Journal of molecular biology*, 294(2), 467-476
6. Bertoldo, M. J., Faure, M., Dupont, J., & Froment, P. (2015). AMPK: a master energy regulator for gonadal function. *Frontiers in neuroscience*, 9, 235. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00235>
7. Byrne, JJ, Soh, MS, Chandhok, G., Vijayaraghavan, T., Teoh, JS, Crawford, S., Cobham, AE, Yapa, NMB, Mirth, CK y Neumann, B. (2019). La interrupción de la dinámica mitocondrial afecta el comportamiento y la vida útil en *Caenorhabditis elegans*. *Ciencias biológicas celulares y moleculares: CMLS*, 76 (10), 1967–1985. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03024-5>
8. Blackwell, T. K., Sewell, A. K., Wu, Z., & Han, M. (2019). TOR Signaling in *Caenorhabditis elegans* Development, Metabolism, and Aging. *Genetics*, 213(2), 329–360. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302504>
9. Burkewitz, K., Feng, G., Dutta, S., Kelley, C. A., Steinbaugh, M., Cram, E. J., & Mair, W. B. (2020). Atf-6 Regulates Lifespan through ER-Mitochondrial Calcium Homeostasis. *Cell reports*, 32(10), 108125. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108125>
10. Branicky, R., & Hekimi, S. (2006). What keeps *C. elegans* regular: the genetics of defecation. *Trends in genetics : TIG*, 22(10), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.08.006>
11. Cárdenas, C., Miller, R. A., Smith, I., Bui, T., Molgó, J., Müller, M., Vais, H., Cheung, K. H., Yang, J., Parker, I., Thompson, C. B., Birnbaum, M. J., Hallows, K. R., & Foskett, J. K. (2010). Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell*, 142(2), 270–283. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.007>
12. Cho, J. H., Oh, Y. S., Park, K. W., Yu, J., Choi, K. Y., Shin, J. Y., Kim, D. H., Park, W. J., Hamada, T., Kagawa, H., Maryon, E. B., Bandyopadhyay, J., & Ahnn, J. (2000). Calsequestrin, a calcium sequestering protein localized at the sarcoplasmic reticulum, is not essential for body-wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of cell science*, 113 (Pt 22), 3947–3958. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.22.3947>
13. Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
14. Crawford, D., Libina, N., & Kenyon, C. (2007). *Caenorhabditis elegans* integrates food and reproductive signals in lifespan determination. *Aging cell*, 6(5), 715–721. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00327.x>
15. Dall, K. B., & Faergeman, N. J. (2019). Metabolic regulation of lifespan from a *C. elegans* perspective. *Genes & nutrition*, 14, 25. <https://doi.org/10.1186/s12263-019-0650-x>
16. De la Fuente, M., & Miquel, J. (2009). An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Current pharmaceutical design*, 15(26), 3003–3026.
17. Dexter, P. M., Caldwell, K. A., & Caldwell, G. A. (2012). A predictable worm: application of *Caenorhabditis elegans* for mechanistic investigation of movement disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 9(2), 393–404. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0109-x>
18. Ewald, C. Y., Landis, J. N., Porter Abate, J., Murphy, C. T., & Blackwell, T. K. (2015). Dauer-independent insulin/IGF-1-signalling implicates collagen remodelling in longevity. *Nature*, 519(7541), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature14021v>
19. Fontana, L., Partridge, L. y Longo, VD (2010). Extender la esperanza de vida saludable, desde la levadura hasta los humanos. *Science (Nueva York, NY)*, 328 (5976), 321–326.
20. García-Casas, P., Arias-Del-Val, J., Alvarez-Illera, P., Wojnicz, A., de Los Ríos, C., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2019). The Neuroprotector Benzothiazepine CGP37157 Extends Lifespan in *C. elegans* Worms. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 440.
21. García-Casas, P., Alvarez-Illera, P., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Alvarez, J. (2021). Mechanism of the lifespan extension induced by submaximal SERCA inhibition in *C. elegans*. *Mechanisms of ageing and development*, 196, 111474.
22. Gieseler, K., Qadota, H., & Benian, G. M. (2017). Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 2017, 1–59. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.81.2>
23. Gower, N.J., Temple, G.R., Schein, J.E., Marra, M., Walker, D.S., & Baylis, H.A. (2001). Dissection of the promoter region of the IP3 Receptor gene, *itr-1*, in *C.elegans*: a molecular basis for cell-specific expression of IP3R isoforms. *Journal of molecular biology*, 306(2), 145-157
24. Gower, N.J., Walker, D.S., & Bayliss, H.A. (2005). Inositol 1,4,5-triphosphate signaling regulates mating behaviour in *C.elegans* males. *Molecular biology of the cell*, 16(9), 3978-3986.
25. Greer, E. L., Banko, M. R., & Brunet, A. (2009). AMP-activated protein kinase and FoxO transcription factors in dietary restriction-induced longevity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 688–692. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04019.x>
26. Greer, E. L., Dowlatshahi, D., Banko, M. R., Villen, J., Hoang, K., Blanchard, D., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Current biology : CB*, 17(19), 1646–1656. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.047>
27. Hajnóczky, G., Csordás, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S., & Yi, M. (2006). Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell calcium*, 40(5-6), 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.08.016>
28. Hekimi, S., Lakowski, B., Barnes, T. M., & Ewbank, J. J. (1998). Molecular genetics of life span in *C. elegans*: how much does it teach us?. *Trends in genetics : TIG*, 14(1), 14–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01299-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01299-7)

29. Hunter, W. B., Glick, E., Paldi, N., & Bextine, B. R. (2012). Advances in RNA interference: dsRNA treatment in trees and grapevines for insect pest suppression. *Southwest Entomol*, 37(1), 85-87.
30. Iser, W. B., & Wolkow, C. A. (2007). DAF-2/insulin-like signaling in *C. elegans* modifies effects of dietary restriction and nutrient stress on aging, stress and growth. *PLoS one*, 2(11), e1240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001240>
31. Jasper H. (2008). SKNy worms and long life. *Cell*, 132(6), 915–916. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.002>
32. Joven A. (2005). Inhibición de la ingesta de alimentos. *Avances en farmacología (San Diego, California)*, 52, 79–98. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(05\)52005-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)52005-2)
33. Kanazawa, T., Zappaterra, M. D., Hasegawa, A., Wright, A. P., Newman-Smith, E. D., Buttle, K. F., McDonald, K., Mannella, C. A., & van der Blik, A. M. (2008). The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS genetics*, 4(2), e1000022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000022>
34. Kanazawa, T., Zappaterra, M. D., Hasegawa, A., Wright, A. P., Newman-Smith, E. D., Buttle, K. F., McDonald, K., Mannella, C. A., & van der Blik, A. M. (2008). The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS genetics*, 4(2), e1000022. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000022>
35. Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366(6454), 461-464.
36. Kinser, H. E., & Pincus, Z. (2020). MicroRNAs as modulators of longevity and the aging process. *Human genetics*, 139(3), 291–308. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02046-0>
37. Kritsilis, M., V Rizou, S., Koutsoudaki, P. N., Evangelou, K., Gorgoulis, V. G., & Papadopoulos, D. (2018). Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 2937. <https://doi.org/10.3390/ijms19102937>
38. Kraev, A., Kraev, N., & Carafoli, E. (1999). Identification and functional expression of the plasma membrane calcium ATPase gene family from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry*, 274(7), 4254–4258. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.4254>
39. Koopman, M., Michels, H., Dancy, B. M., Kamble, R., Mouchiroud, L., Auwerx, J., Nollen, E. A., & Houtkooper, R. H. (2016). A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in *Caenorhabditis elegans*. *Nature protocols*, 11(10), 1798–1816. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.106>
40. Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., & Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. *Orphanet journal of rare diseases*, 7, 46. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-46>
41. Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(4), 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
42. Lockery, S. R., & Goodman, M. B. (2009). The quest for action potentials in *C. elegans* neurons hits a plateau. *Nature neuroscience*, 12(4), 377–378. <https://doi.org/10.1038/nn0409-377>
43. Lorin-Nebel, C., Xing, J., Yan, X., & Strange, K. (2007). CRAC channel activity in *C. elegans* is mediated by Orai1 and STIM1 homologues and is essential for ovulation and fertility. *The Journal of physiology*, 580(Pt 1), 67–85. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.124883>
44. Lorin-Nebel, C., Xing, J., Yan, X., & Strange, K. (2007). CRAC channel activity in *C. elegans* is mediated by Orai1 and STIM1 homologues and is essential for ovulation and fertility. *The Journal of physiology*, 580 (Pt 1), 67-85
45. Mair, W., Morantte, I., Rodrigues, A. P., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R. J., & Dillin, A. (2011). Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature*, 470(7334), 404–408. <https://doi.org/10.1038/nature09706>
46. Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
47. Matsunami K. (2018). Frailty and *Caenorhabditis elegans* as a Benchmark Animal Model for Screening Drugs Including Natural Herbs. *Frontiers in nutrition*, 5, 111. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00111>
48. McCay, C. M., Crowell, M. F., & Maynard, L. A. (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 5(3), 155–172.
49. Mitchell, D. H., Stiles, J. W., Santelli, J., & Sanadi, D. R. (1979). Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *Journal of gerontology*, 34(1), 28–36. <https://doi.org/10.1093/geronj/34.1.28>
50. Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A., & Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382(6591), 536–539. <https://doi.org/10.1038/382536a0>
51. Murphy, CT y Hu, PJ (2013). Señalización de insulina/factor de crecimiento similar a la insulina en *C. elegans*. *WormBook: la revisión en línea de la biología de C. elegans*, 1–43. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.164.1>
52. Murphy, CT y Hu, PJ (2013). Señalización de insulina/factor de crecimiento similar a la insulina en *C. elegans*. *WormBook: la revisión en línea de la biología de C. elegans*, 1–43. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.164.1>
53. Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P., Ducommun, B., Lenaers, G., & Belenguer, P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS letters*, 523(1-3), 171–176. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)02985-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02985-x)
54. Ono, S., Nomura, K., Hitosugi, S., Tu, D. K., Lee, J. A., Baillie, D. L., & Ono, K. (2011). The two actin-interacting protein 1 genes have overlapping and essential function for embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular biology of the cell*, 22(13), 2258–2269. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0934>
55. Pan Y, Schroeder EA, Ocampo A, Barrientos A, Shadel GS. (2011). Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab* 13:668–78. doi: 10.1016/j.cmet.2011.03.018
56. Panowski, SH y Dillin, A. (2009). Señales de juventud: regulación endocrina del envejecimiento en *Caenorhabditis elegans*. *Tendencias en endocrinología y metabolismo: TEM*, 20 (6), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.006>
57. Parks, D. H., Rinke, C., Chuvochina, M., Chaumeil, P. A., Woodcroft, B. J., Evans, P. N., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2017). Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life. *Nature microbiology*, 2(11), 1533–1542. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0012-7>
58. Podshivalova, K., Kerr, R. A., & Kenyon, C. (2017). How a Mutation that Slows Aging Can Also Disproportionately Extend End-of-Life Decrepitude. *Cell reports*, 19(3), 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.062>
59. Raizen, D. M., & Avery, L. (1994). Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 12(3), 483–495. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90207-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90207-0)

60. Ryu D, Mouchiroud L, Andreux PA, Katsyuba E, Moullan N Nicolet-Dit-Felix AA, & Urolithin A. (2016) induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat Med.* 22:879–88. doi: 10.1038/nm.4132
61. Romero-Sanz, S., Caldero-Escudero, E., Álvarez-Illera, P., Santo-Domingo, J., Fonteriz, R. I., Montero, M., & Álvarez, J. (2023). SERCA inhibition improves lifespan and healthspan in a chemical model of Parkinson disease in *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in pharmacology*, 14, 1182428. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1182428>
62. Ros, M., & Carrascosa, J. M. (2020). Current nutritional and pharmacological anti-aging interventions. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1866(3), 165612. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165612>
63. Rossi, A., Pizzo, P., & Filadi, R. (2019). Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1866(7), 1068–1078. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>
64. Sakube, Y., Ando, H., & Kagawa, H. (1993). Cloning and mapping of ryanodine receptor homolog gene of *Caenorhabditis elegans*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 707, 540-545.
65. Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5271), 59–63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>
66. Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(1), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
67. Steinberg, G. R., & Hardie, D. G. (2023). New insights into activation and function of the AMPK. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 24(4), 255–272. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00547-x>
68. Sterken, M. G., Snoek, L. B., Kammenga, J. E., & Andersen, E. C. (2015). The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. *Trends in genetics : TIG*, 31(5), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.02.009>
69. Sun, N., Yun, J., Liu, J., Malide, D., Liu, C., Rovira, I. I., Holmström, K. M., Fergusson, M. M., Yoo, Y. H., Combs, C. A., & Finkel, T. (2015). Measuring In Vivo Mitophagy. *Molecular cell*, 60(4), 685–696. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.009>
70. Toker, A., & Cantley, L. C. (1997). Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature*, 387(6634), 673–676. <https://doi.org/10.1038/42648>
71. Trojanowski, N. F., Raizen, D. M., & Fang-Yen, C. (2016). Pharyngeal pumping in *Caenorhabditis elegans* depends on tonic and phasic signaling from the nervous system. *Scientific reports*, 6, 22940. <https://doi.org/10.1038/srep22940>
72. Tullet JMA, Green JW, Au C, Benedetto A, Thompson MA, Clark E, et al. The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. *Aging Cell*. (2017) 16:1191–4.
73. Uno, M. y Nishida, E. (2016). Genes reguladores de la esperanza de vida en *C. elegans*. *NPJ envejecimiento y mecanismos de enfermedad*, 2, 16010. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.10>
74. Ureshino, R. P., Costa, A. J., Erustes, A. G., Pereira, G. J. D. S., Sinigaglia-Coimbra, R., & Smaili, S. S. (2018). Effects of Aging in the Striatum and Substantia Nigra of a Parkinson's Disease Animal Model. *Toxicologic pathology*, 46(3), 348–358. <https://doi.org/10.1177/0192623318767065>
75. Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 27(2), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>
76. Weinhouse, C., Truong, L., Meyer, J. N., & Allard, P. (2018). *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. *Environmental and molecular mutagenesis*, 59(7), 560–575.
77. Winston, W. M., Sutherland, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H., & Hunter, C. P. (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10565–10570. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611282104>
78. Xiao, R., Chun, L., Ronan, E. A., Friedman, D. I., Liu, J., & Xu, X. Z. (2015). RNAi Interrogation of Dietary Modulation of Development, Metabolism, Behavior, and Aging in *C. elegans*. *Cell reports*, 11(7), 1123–1133. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.024>
79. Xu, C., Chakravarty, K., Kong, X., Tuy, T. T., Arinze, I. J., Bone, F., & Massillon, D. (2007). Several transcription factors are recruited to the glucose-6-phosphatase gene promoter in response to palmitate in rat hepatocytes and H4IIE cells. *The Journal of nutrition*, 137(3), 554–559. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.554>
80. Yen, K., & Mobbs, C. V. (2010). Evidence for only two independent pathways for decreasing senescence in *Caenorhabditis elegans*. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 32(1), 39–49. <https://doi.org/10.1007/s11357-009-9110-7>
81. Yin, X., Gower, N.J., Baylis, H.A., & Strange, K. (2004). Inositol 1,4,5-trisphosphate signaling regulates rhythmic contractile activity of myoepithelial sheath cells in *C. elegans*. *Molecular biology of the cell*, 15(8), 3938-3949
82. Zeng, L., Sun, C., Pei, Z., Yun, T., Fan, S., Long, S., Wu, T., Chen, Z., Yang, Z., & Xu, F. (2019). Liangyi Gao extends lifespan and exerts an antiaging effect in *Caenorhabditis elegans* by modulating DAF-16/FOXO. *Biogerontology*, 20(5), 665–676. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09820-7>
83. Zhao, L., Zhao, Y., Liu, R., Zheng, X., Zhang, M., Guo, H., Zhang, H., & Ren, F. (2017). The Transcription Factor DAF-16 is Essential for Increased Longevity in *C. elegans* Exposed to *Bifidobacterium longum* BB68. *Scientific reports*, 7(1), 7408. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07974-3>