



MÁSTER EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
Y TERAPIAS AVANZADAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y GENÉTICA MOLECULAR (IBGM)

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID. FACULTAD DE MEDICINA:

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

4 de julio de 2025

Estudio del fenotipo asociado al silenciamiento de SLC25A46 en *C. elegans*

Diana Rodríguez González

Directores:

Dr. Sergio De La Fuente

Dr. Jaime Santo-Domingo



Contenido

Tabla de abreviaturas	3
Resumen/Abstract	4
Introducción.....	5
Hipótesis y objetivos	8
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	8
Materiales y métodos	8
Resultados	13
Grado de conservación de SLC25A46 en <i>C. elegans</i>	13
Alineamiento de múltiples secuencias	13
Análisis de variantes patogénicas.....	14
Análisis funcional <i>in vivo</i> en <i>C. elegans</i>	14
Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la mortalidad.....	14
Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la movilidad.....	16
Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la fertilidad	20
Estudio morfológico de las neuronas dopaminérgicas mediante microscopía confocal	22
Estudio en cultivos celulares.....	24
Efecto del silenciamiento de SLC25A46 en la homeostasis del Ca ²⁺ del retículo .	25
Efecto del silenciamiento de SLC25A46 en la homeostasis del Ca ²⁺ citosólico y mitocondrial	26
Discusión.....	27
Conclusiones.....	29
Bibliografía.....	29
Anexo 1: Alineamiento de múltiples secuencias (MSA)	32
Anexo 2: Conservación del dominio funcional de las treoninas 44 y 45	33

Tabla de abreviaturas

Por cuestiones de espacio, se han empleado las siguientes abreviaturas:

BHQ: 2,5-di-(t-butil)-1,4-hidroquinona. Sirve para repletar el RE de calcio.

BLPS: Body Lengths Per Second (Longitudes corporales por segundo).

BZ555: Cepa de *C. elegans* que expresa GFP en las neuronas dopaminérgicas.

FuDR: Fluorodesoxiuridina. Inhibidor de la replicación del ADN. Impide el nacimiento y desarrollo de nuevas larvas.

GFP: Proteína verde fluorescente.

IP TG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido. Induce la expresión de operones de los vectores plasmídicos para que se exprese el ARN de interferencia.

L4: Cuarto y último estadio larvario de *C. elegans* antes del paso a adulto.

L4440: Plásmido vacío usado como ARN de interferencia control.

N2: Cepa de *wild type* de *C. elegans*.

OP50: Cepa de *E. coli* usada como alimento estándar de *C. elegans*.

Nombre abreviado de los grupos experimentales:

SLC (huevo): Grupo expuesto al ARN de interferencia para SLC25A46 desde huevo.

SLC (adulto): Grupo expuesto al ARN de interferencia para SLC25A46 desde adulto.

L4440 (huevo): Grupo expuesto al ARN de interferencia control L4440 desde huevo.

L4440 (adulto): Grupo expuesto al ARN de interferencia control L4440 desde adulto.

Control: Línea celular HAP-1 sin mutaciones en SLC25A46.

KO1: Línea celular HAP-1 con delección de 26 pares de bases con pérdida de función.

KO2: Línea celular HAP-1 con delección de 2 pares de bases con pérdida de función

Resumen/Abstract

SLC25A46 es una proteína transportadora mitocondrial que, a diferencia de la mayoría de los miembros de esta familia, se localiza en la membrana mitocondrial externa y no participa en el transporte de solutos entre el citosol y la matriz mitocondrial. Desempeña un papel fundamental en las dinámicas mitocondriales y las mutaciones en SLC25A46 se han relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas, como la atrofia cerebelosa y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2. No obstante, su función fisiológica sistémica aún no está completamente caracterizada. Este Trabajo de Fin de Máster aborda el estudio de la función y la fisiopatología de SLC25A46 combinando estudios *in vivo* en *Caenorhabditis elegans* y experimentos *in vitro* en líneas celulares humanas. En *C. elegans*, se utilizó ARN de interferencia para silenciar SLC25A46 y evaluar si la falta de función en *C. elegans* reproduce los fenotipos observados en humanos y otros organismos modelo. Hemos analizado parámetros funcionales como la fertilidad, la movilidad y la esperanza de vida, junto con signos de neurodegeneración en neuronas dopaminérgicas. Paralelamente, se ha estudiado la homeostasis del calcio en líneas celulares con deleciones con pérdida de función generadas mediante CRISPR-Cas9 para determinar si SLC25A46 interviene en la regulación de la homeostasis del calcio en el retículo endoplásmico. Este enfoque integrador pretende arrojar luz sobre el papel de SLC25A46 en la disfunción mitocondrial.

SLC25A46 is a mitochondrial carrier protein which, unlike most members of this family, is located in the outer mitochondrial membrane and is not involved in the translocation of solutes between the cytosol and the mitochondrial matrix. It plays a critical role in mitochondrial dynamics and mutations in *SLC25A46* have been linked to several neurodegenerative disorders, such as cerebellar atrophy and Charcot-Marie-Tooth disease type 2. Nevertheless, its overall physiological function has not been fully characterized yet. This Master's Thesis explores the role and pathophysiology of SLC25A46, combining *in vivo* studies in *Caenorhabditis elegans*, and *in vitro* experiments in human cell lines. In *C. elegans*, RNA interference was employed to silence *SLC25A46*, in order to assess whether its lack of function in *C. elegans* reproduces the phenotypes observed in humans and in other model organisms. We have analyzed functional parameters such as fertility, mobility, and lifespan, along with signs of neurodegeneration in dopaminergic neurons. In parallel, calcium homeostasis was evaluated in CRISPR-Cas9-generated knockout cell lines to determine whether SLC25A46 plays a role in regulating endoplasmic reticulum calcium homeostasis. This integrative approach seeks to clarify the role of SLC25A46 in mitochondrial dysfunction.

Introducción

Las mitocondrias desempeñan un papel fundamental en la función celular: no solo participan en la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa, sino que también son fundamentales en otros procesos como la apoptosis, el metabolismo, la señalización celular y la homeostasis del calcio. A pesar de su origen endosimbiótico, la mayoría de proteínas mitocondriales en realidad están codificadas por genes nucleares y todavía se desconocen los mecanismos moleculares en los que participan algunas de ellas. Una de las menos estudiadas es SLC25A46, una proteína mitocondrial descubierta recientemente y cuya función celular aún no se conoce a ciencia cierta. No obstante, se ha descrito su implicación en diversas patologías mitocondriales de gravedad variable, diagnóstico difícil y pronóstico incierto debido a la ausencia de tratamientos, por lo que la identificación de su función y de los mecanismos moleculares en los que está implicada podría ayudar en la comprensión de estas patologías y en el desarrollo de tratamientos que puedan mejorar el desenlace clínico de estos pacientes.

SLC25A46 es una proteína que pertenece a la familia de transportadores mitocondriales SLC25, que actualmente incluye 53 miembros, la mayoría de los cuales están implicados en el transporte de distintos solutos importantes para el metabolismo mitocondrial a través de la membrana mitocondrial interna (1). Aunque se trata de proteínas mitocondriales, los genes encargados de su síntesis son de localización nuclear y se encuentran repartidos por varios cromosomas. Estos transportadores se encuentran ampliamente distribuidos en organismos eucariotas e incluso se han encontrado en algunos virus y bacterias. El tamaño y la naturaleza de los sustratos transportados por estas proteínas son muy diversos, así como los modos de transporte. A nivel estructural, se caracterizan por poseer una estructura tripartita con seis hélices α transmembrana y un motivo característico PX(D,E)XX(K,R) repetido tres veces tras las hélices impares en dirección C-terminal, que permite identificar de forma unívoca a los miembros de esta familia. A nivel fisiológico, tienen gran importancia, ya que están implicados en la traslocación de sustratos entre el citosol y el lumen mitocondrial, por lo que participan en numerosas rutas metabólicas mediante la regulación del flujo de distintos metabolitos entre estos compartimentos celulares (2) (3).

SLC25A46 es el miembro número 46 de esta familia y fue descrito por primera vez en el año 2006, junto con otros trece integrantes de la misma caracterizados por elevados niveles de expresión en el sistema nervioso (4). Sin embargo, a diferencia de los demás miembros de este grupo, SLC25A46 y SLC25A50 se encuentran en la membrana mitocondrial externa, caracterizada por la presencia de numerosas porinas que forman canales que permiten el paso de iones y pequeños solutos de hasta 5 kDa. Esta elevada permeabilidad hace que el contenido del espacio intermembrana de la mitocondria sea muy similar al del citosol, lo que en principio haría innecesaria la presencia de transportadores específicos en la membrana mitocondrial externa (5), por lo que la ubicación de estas dos proteínas en esta membrana mitocondrial externa suscita algunos interrogantes en cuanto a su función biológica (6).

La evidencia existente sugiere que SLC25A46 no participa en el transporte de sustratos a través de la membrana mitocondrial externa, sino que parece estar implicada en dinámicas de la membrana mitocondrial. Algunos trabajos proponen que SLC25A46 participa específicamente en procesos de fusión y fisión mitocondrial y en el mantenimiento de las crestas mitocondriales. A nivel funcional, se ha observado que la sobreexpresión de esta proteína provoca fragmentación mitocondrial y su pérdida induce hiperfusión (7). Aunque no se conocen completamente los mecanismos que median estos cambios en la morfología mitocondrial, se ha demostrado que SLC25A46 interactúa por su lado citosólico con algunas proteínas implicadas en la maquinaria de fusión mitocondrial, concretamente Opa1 y Mfn 2. En particular, se ha descrito que el proceso de hiperfusión mitocondrial en ausencia o disminución de SLC25A46 está

mediado por la formación de oligómeros de MFN1 y 2 (8). A nivel estructural, se ha detectado la presencia de SLC25A46 en los extremos de las mitocondrias y los puntos de ramificación, donde colocaliza con DRP1 y OPA1 (9).

También se ha descrito la interacción de SLC25A46 con el complejo proteico MICOS, implicado en la estructura y organización de las crestas mitocondriales. Algunas mutaciones en SLC25A46 pueden desestabilizar este complejo MICOS y traducirse en una morfología alterada de las crestas mitocondriales, caracterizadas por presentar una menor longitud (10). Asimismo, se ha detectado la interacción de SLC25A46 con el complejo proteico EMC del retículo endoplásmico, involucrado en la inserción de proteínas en las membranas (10). Una de las hipótesis es que esta interacción facilita la traslocación lipídica entre ambos compartimentos y una alteración en el flujo de los fosfolípidos procedentes de la membrana del RE afectaría al crecimiento de las crestas mitocondriales y a procesos de fisión mitocondrial. La alteración de este proceso podría provocar una senescencia celular prematura que explicaría la neurodegeneración presente en algunos cuadros clínicos provocados por mutaciones en SLC25A46 (10). Además, en un análisis del interactoma mediante inmunoprecipitación, se ha detectado la interacción de SLC25A46 con SERCA, la ATPasa de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE), y con componentes previamente asociados a la formación de puntos de contacto entre mitocondria y RE (11).

A nivel del metabolismo mitocondrial, la información es contradictoria. Algunas investigaciones afirman que la ausencia de SLC25A46 no parece correlacionarse con una disfunción del metabolismo energético mitocondrial, puesto que no se han observado cambios en los niveles de ATP, en el potencial de membrana o en el contenido de ADN mitocondrial (6). Por el contrario, otros artículos han descrito que en modelos celulares humanos hay afectación de la actividad respiratoria y niveles más bajos de ATP, aunque depende de la línea celular utilizada (12). En células beta pancreáticas concretamente, la falta de función de SLC25A46 no parece generar alteraciones metabólicas significativas, aunque la ausencia de esta proteína aumenta su sensibilidad al estrés lipotóxico. Además, en estas células, el incremento de los niveles de glucosa induce la desfosforilación de las treoninas 44 y 45 del extremo amino terminal de forma dependiente de calcineurina. El estado de fosforilación de estas 2 treoninas parece regular la actividad pro-fisión de SLC25A46, lo que sugiere un nuevo mecanismo de regulación de la dinámica mitocondrial ante cambios en la disponibilidad de glucosa (13).

Las mutaciones en SLC25A46 se asocian al desarrollo de diversas patologías. Las primeras mutaciones se identificaron por primera vez en 2015 en pacientes que presentaban cuadros clínicos de atrofia óptica y enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2 asociados con mutaciones recesivas bialélicas con pérdida de función en SLC25A46 (14). Hasta entonces, la atrofia óptica y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2 se atribuían exclusivamente a mutaciones en los genes implicados en procesos de fusión mitocondrial OPA1 y MFN2 (3). Un año más tarde, en 2016, se identificó un cuadro de síndrome de Leigh o encefalomiopatía necrotizante subaguda provocado por una mutación homocigota con cambio de sentido (10). Posteriormente, se han identificado mutaciones en SLC25A46 como responsables de diferentes patologías, tales como hipoplasia pontocerebelar congénita, ataxia cerebelar progresiva autosómica, ataxia mioclónica progresiva, polineuropatías sensoriomotoras y enfermedad de Parkinson (15) (16) (17) (18) (19). La mayoría de estas manifestaciones clínicas son de carácter neurológico. Una posible explicación de la prevalencia de este fenotipo neurológico es que la expresión de los distintos transportadores mitocondriales varía en función de los tejidos y SLC25A46 tiene una mayor expresión en el tejido nervioso (10). Estos nuevos descubrimientos ponen de manifiesto la complejidad de la relación genotipo-fenotipo en este tipo de patologías con un solapamiento de los diferentes

cuadros clínicos y mutaciones en varios genes implicados en la regulación de la dinámica mitocondrial.

La gravedad y el inicio de los síntomas en pacientes con falta de función de SLC25A46 muestran una gran variabilidad: en algunos casos se trata de mutaciones letales que cursan con muerte prenatal y en otros la aparición de los síntomas se inicia en la edad adulta y la afectación es relativamente leve. El estudio de las distintas mutaciones ha permitido identificar dos mecanismos patogénicos diferentes. En primer lugar, parece existir una relación inversa entre la estabilidad de la proteína SLC25A46 y la gravedad de los síntomas. Las mutaciones que se asocian con una menor estabilidad de la proteína se asocian a fenotipos más severos. Un segundo mecanismo de patogenicidad se basa en la afectación de la interacción con otras proteínas clave de la dinámica mitocondrial, por una parte con OPA1 y MFN2 en procesos de fusión, y por otra con MIC60 en la morfología de las crestas mitocondriales (20). La elevada heterogeneidad genotípica y fenotípica asociada a la pérdida de función de SLC25A46 pone de manifiesto la importancia de la identificación de las mutaciones implicadas en estos cuadros clínicos, para poder llegar a un diagnóstico fiable. Además, la identificación de la variante patogénica concreta puede ofrecer información pronóstica a los pacientes y, en un futuro más lejano, podría permitir la implementación de tratamientos de medicina personalizada y, por ende, un mejor desenlace clínico.

Además del estudio de la fisiopatología de SLC25A46 mediante casos clínicos, se han usado diversos modelos animales de investigación experimental, como *Mus musculus*, *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster*, que han contribuido a dilucidar algunas de las funciones e interacciones de esta proteína. En modelos murinos se ha trabajado principalmente con modelos de *knockout* que presentaban fenotipos de neurodegeneración y alteraciones en la producción de energía mitocondrial (21). En *Danio rerio*, el silenciamiento de SLC25A46 también se recapitula como un fenotipo similar al humano con malformaciones cerebrales, pérdida de neuronas motoras espinales y déficits motores (22). En los modelos de silenciamiento en *Drosophila* se ha manifestado un fenotipo similar al humano con alteraciones en la movilidad, una reducción de la esperanza de vida, alteraciones en la morfología neuronal y déficits en el aprendizaje (23). En el momento de la ejecución experimental de este TFM, aún no existía ninguna publicación previa sobre el papel de SLC25A46 en *C. elegans*, pero en el momento de la escritura se ha encontrado un estudio publicado el 30 de mayo de 2025, en el que se introdujo una mutación con pérdida de función mediante Co-CRISPR con fenotipo de fragmentación mitocondrial. Este fenotipo se rescataba introduciendo una mutación en *fzo-1*, contrarrestando los efectos de la mutación en SLC25A46, lo que sugiere que estas dos proteínas tienen un efecto antagonista (24).

El presente Trabajo de Fin de Máster (TFM) pretende indagar más en la función y fisiopatología de SLC25A46 mediante el estudio del fenotipo asociado al silenciamiento de SLC25A46 en *C. elegans*. Aunque esta proteína ya se ha estudiado previamente en otros modelos animales, como mosca o ratón, su efecto en *C. elegans* apenas ha sido caracterizado, a pesar de ser un organismo modelo ampliamente consolidado para el estudio de la función mitocondrial. Algunas de las ventajas del uso de *C. elegans* para este tipo de estudios incluyen: conservación evolutiva de las principales vías metabólicas, corta esperanza de vida que permite obtener resultados rápidamente y buena trazabilidad genética debido a su hermafroditismo. Además, es un organismo fácil de manipular genéticamente y los experimentos con ARN de interferencia son muy sencillos, ya que se le puede administrar en forma de plásmido expresado por las bacterias de las que se alimenta. En este TFM trabajaremos sobre la hipótesis de que el silenciamiento de SLC25A46 en *C. elegans* genere fenotipos similares a los observados en otros organismos modelo y, por lo tanto, refleje algunas de las características clínicas observadas en las patologías humanas asociadas a la pérdida de función de este gen.

Por otra parte, existen evidencias de que SLC25A46 puede interaccionar físicamente con SERCA y con componentes asociados a la formación de puntos de contacto entre la mitocondria y el retículo (11). Este hecho es relevante, porque mutaciones en SLC25A46 asociadas a enfermedad podrían influir en la homeostasis celular del calcio y contribuir de esta forma a la fisiopatología molecular de estas enfermedades. Por tanto, este TFM pretende también estudiar el posible papel de SLC25A46 en la homeostasis celular del calcio. Con este objetivo, analizaremos los flujos de calcio citosólico, mitocondrial y de retículo endoplásmico en línea celular humana KO para SLC25A46

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

1. La función de SLC25A46 está conservada en *C. elegans* y, por lo tanto, este nematodo es un modelo relevante para el estudio de la fisiopatología asociada a la pérdida de función de esta proteína.
2. SLC25A46 regula tanto la captación de calcio por parte del retículo endoplásmico, como la transferencia de calcio entre retículo endoplásmico y mitocondria.

Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Máster tiene dos objetivos principales:

1. Recapitular en *C. elegans* el fenotipo asociado a la pérdida de función de SLC25A46 observado en otros organismos modelo mediante el silenciamiento de SLC25A46 con ARN de interferencia. Este objetivo se divide en los siguientes objetivos específicos:
 - Determinar el grado de homología de la secuencia de SLC25A46 en *C. elegans* con sus ortólogos en otros organismos modelo y humanos.
 - Determinar si el silenciamiento de SLC25A46 mediante ARN de interferencia tiene efectos a nivel funcional en la fertilidad, la movilidad y la esperanza de vida.
 - Determinar si el silenciamiento de SLC25A46 produce neurodegeneración a nivel de los axones de las neuronas dopaminérgicas en *C. elegans*.
2. Determinar si la pérdida de función de SLC25A46 altera la homeostasis celular del calcio. Este objetivo se divide en los siguientes objetivos específicos:
 - Determinar si la pérdida de función de SLC25A46 altera la función de la SERCA.
 - Determinar si la pérdida de función de SLC25A46 altera la transferencia de calcio entre RE y mitocondrias.

Materiales y métodos

Análisis *in silico*: Para el análisis *in silico* se han consultado las siguientes bases de datos y herramientas bioinformáticas: base de datos de genes NCBI, alineamiento de múltiples secuencias con T-Coffee, Clustal y UniProt, variantes patológicas con UniProt.

Cepas de gusanos: Para los estudios de fertilidad, movilidad y mortalidad se han utilizado cepas *wild type* N2 y para el análisis de las neuronas dopaminérgicas la cepa BZ555, que expresa GFP (proteína verde fluorescente) bajo el promotor *dat-1p*, que codifica un transportador de dopamina y se expresa en neuronas dopaminérgicas.

Medios y placas de cultivo para los gusanos:

- **Placas de mantenimiento:** Para el mantenimiento de los gusanos se utilizan placas de agar NGM (*Nematode Growth Medium*), preparadas a partir de 250 ml de agua desionizada, 4,25 g de agar, 0,625 g de peptona y 0,75 g NaCl. Esta mezcla se somete a un proceso de esterilización en autoclave y se deja enfriar

a 55 °C. A continuación se añaden 250 µl de colesterol 12,9 mM, 250 µl de CaCl₂ 1M, 250 µl de MgSO₄ 1M y 4,25 ml de solución tampón de KPO₄ 1M. Se preparan placas de Petri de 5,5 cm diámetro con 10 ml del medio NGM preparado y se dejan enfriar durante 24 horas. Transcurrido este periodo, se siembran 400 µl de la cepa de bacterias de *E. coli* OP50 y se deja crecer durante 24 horas a temperatura ambiente para que forme un césped de alimento para los gusanos.

- **Placas para el ensayo de fertilidad:** Además de las placas de mantenimiento, se utilizan placas NGM a las que se añade carbenicilina 0,2 µM e IPTG 1 mM y se siembra la bacteria que expresa el ARN de interferencia para SLC25A46 y el ARN de interferencia control L4440 en placas de Petri de 5,5 cm de diámetro. El traspaso de los gusanos se hace con pestaña para minimizar sesgo por manipulación y dañar lo menos posible al animal.
- **Placas para el ensayo de mortalidad y movilidad:** Además de las placas de mantenimiento, se utilizan placas NGM a las que se añade carbenicilina e IPTG y se siembra la bacteria que expresa el ARN de interferencia para SLC25A46 y el ARN de interferencia control L4440 en placas de Petri de 5,5 cm de diámetro para los huevos. A partir del día 1 de adulto, los gusanos se transfieren a placas NGM con carbenicilina 0,2 µM, IPTG 1 mM y FuDR 15 µM (5-fluoro-2'-desoxiuridina).

Sincronización del ciclo de vida de los gusanos: Para sincronizar el ciclo de vida de los gusanos, se preparan huevos a partir de adultos jóvenes. Para ello, se recogen los gusanos con 2 ml de buffer M9 en un Eppendorf, se centrifuga 1 minuto a 2000 rpm y se retira el sobrenadante. Se añaden 150 µl de una mezcla de lejía y sosa (2:1) y se agitan en el vortex durante 20 segundos en intervalos de 2 minutos para provocar la rotura química y física de los gusanos hasta que estos se desintegran y solo quedan los huevos. Se centrifuga la preparación durante 1 minuto a 8000 rpm, se retira el sobrenadante, se añade 1 ml de M9 y se agita en el vortex para lavarlos y eliminar los restos de lejía y sosa. Se retira el sobrenadante, se resuspenden los huevos y se siembran en las correspondientes placas.

Análisis funcional en *C. elegans*: Para el análisis funcional se ha analizado cómo afecta el silenciamiento del gen SLC25A46 mediante ARN de interferencia a la fertilidad, movilidad y mortalidad del gusano. Los detalles de cada uno de los ensayos se especifican más adelante en el apartado respectivo. Para evaluar estos parámetros, se han creado dos grupos experimentales, expuestos al ARN de interferencia en distintos momentos del ciclo vital: uno desde la fase de huevo y otro desde la fase de adulto. Ambos grupos control se han expuesto a un césped homogéneo de bacterias que expresan el ARN de interferencia en un plásmido. El porcentaje de bacterias que expresaban el ARN de interferencia era del 100 %. En paralelo, se han utilizado dos grupos control expuestos a un ARN de interferencia control, llamado L4440, que no debería tener ningún efecto a nivel de fenotipo, en las mismas fases del ciclo vital del gusano: uno desde la fase de huevo y otro desde adulto. Estos dos grupos actuarán como controles respectivos de los dos grupos experimentales mencionados. En los dos grupos de exposición a ARN de interferencia desde adulto, durante las fases larvarias y de huevo, los gusanos se han alimentado de la cepa de *E. coli* OP50, que no expresa ningún ARN de interferencia.

En el caso de todos grupos, siempre se ha usado un césped de bacterias homogéneo compuesto por un único tipo de bacteria, según se detalla en la siguiente tabla:

Grupo y abreviatura a lo largo del trabajo	Placa para huevos	Placa para adultos
RNAi para SLC25A46 desde huevo: SLC (huevo)	ARN de interferencia para SLC25A46 (100 %)	ARN de interferencia para SLC25A46 (100 %)
RNAi para SLC25A46 desde adulto: SLC (adulto)	<i>E. coli</i> (OP50) (100 %), sin ARN de interferencia	ARN de interferencia para SLC25A46 (100 %)
RNAi control desde huevo: L4440 (huevo)	ARN de interferencia control (L4440) (100 %)	ARN de interferencia control (L4440) (100 %)
RNAi control desde adulto: L4440 (adulto)	<i>E. coli</i> (OP50) (100 %), sin ARN de interferencia	ARN de interferencia control (L4440) (100 %)

Ensayo de fertilidad: Para el ensayo de fertilidad, se parte de huevos sincronizados que se siembran en sus respectivas placas de 5,5 cm de diámetro según el grupo experimental y, a los tres días, coincidiendo con el día 1 de adulto, se pasa un ejemplar joven aún en fase L4 a otra placa con una pestaña. Cada día, a la misma hora, se pasará el gusano adulto con pestaña a una nueva placa y, tras 48 horas, se hará un recuento de las larvas que han nacido en las respectivas placas. A continuación, se describen los grupos estudiados:

- Para el grupo SLC (huevo), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con ARN de interferencia para SLC25A46 y, al cabo de tres días, se ha transferido un único gusano L4 con pestaña a una placa de 5,5 cm de diámetro con ARN de interferencia para SLC25A46.
- Para el grupo SLC (adulto), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con *E. coli* OP50 (control sin ARN de interferencia) y, al cabo de tres días, se ha transferido un único gusano L4 con pestaña a una placa de 5,5 cm de diámetro con ARN de interferencia para SLC25A46.
- Para el grupo L4440 (huevo), considerado como grupo control de SLC (huevo), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con ARN de interferencia control L4440 y, al cabo de tres días, se ha transferido un único gusano L4 con pestaña a una placa de 5,5 cm de diámetro con ARN de interferencia control L4440.
- Para el grupo L4440 (adulto), considerado como grupo control de SLC (adulto), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con *E. coli* OP50 (control sin ARN de interferencia) y, al cabo de tres días, se ha transferido un único gusano L4 con pestaña a una placa de 5,5 cm de diámetro con ARN de interferencia control L4440.

Ensayo de mortalidad: Para el ensayo de mortalidad, se siembran los huevos de los cuatro grupos experimentales en la correspondiente placa y se hace un recuento diario de los gusanos vivos, muertos y censurados. En la categoría de censurados se incluyen gusanos que han trepado por las paredes de la placa y se han desecado, gusanos con protrusión de vulva por el efecto tóxico del FuDR o gusanos que han excavado la placa. A continuación, se especifican los detalles de los diferentes grupos.

- Para el grupo SLC (huevo), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con ARN de interferencia para SLC25A46 y, al cabo de tres días, se han transferido entre 10-25 gusanos a placas de mortalidad de 3,5 cm de diámetro con FuDR y con ARN de interferencia para SLC25A46.
- Para el grupo SLC (adulto), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con *E. coli* OP50 (control sin ARN de interferencia) y, al cabo de tres días,

se han transferido entre 10-25 gusanos a placas de mortalidad de 3,5 cm de diámetro con FuDR y con ARN de interferencia para SLC25A46.

- Para el grupo L4440 (huevo), considerado como grupo control de SLC (huevo), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con ARN de interferencia control L4440 y, al cabo de tres días, se han transferido entre 10-25 gusanos a placas de mortalidad de 3,5 cm de diámetro con FuDR y con ARN de interferencia control L4440.
- Para el grupo L4440 (adulto), considerado como grupo control de SLC (adulto), los huevos se han sembrado en una placa de agar NGM con *E. coli* OP50 (control sin ARN de interferencia) y, al cabo de tres días, se han transferido entre 10-25 gusanos a placas de mortalidad de 3,5 cm de diámetro con FuDR y con ARN de interferencia control L4440.

Ensayo de movilidad: Para el ensayo de movilidad, se han utilizado los mismos gusanos que en el ensayo de mortalidad y se han grabado vídeos los días 1, 3 y 5 de adulto, que es el periodo en el que los gusanos presentan una mayor movilidad. Para ello, antes de grabar se dan 3 golpes con la placa para activarlos, se graba durante 30 segundos con 10 aumentos y después se procesan los vídeos en ImageJ con el plugin WrMTrck, con los siguientes parámetros: rolling ball radius =12, Sliding paraboloid, threshold=0-235. Los parámetros analizados son Distancia recorrida, Velocidad media, Velocidad máxima, Área, y Longitudes corporales por segundo. Las mediciones se han realizado para los cuatro grupos experimentales mencionados en el ensayo de mortalidad.

Estudio de las neuronas dopaminérgicas: Para el estudio de las neuronas dopaminérgicas, se ha utilizado una cepa que expresa GFP bajo el promotor *dat-1p*, que codifica un transportador de dopamina y se expresa en neuronas dopaminérgicas. Se han utilizado únicamente dos grupos experimentales para simplificar: uno expuesto al ARN de interferencia para SLC25A46 desde la fase de huevo y su grupo control expuesto a un ARN de interferencia control L4440, para lograr un mayor tiempo de exposición y efecto. Los gusanos se han montado sobre portas con agarosa al 2 % y se han paralizado con tetramisol 10 mM. Por una parte, se han tomado imágenes en un microscopio de fluorescencia a 20x y se ha cuantificado la fluorescencia mediante ImageJ. Por otra parte se han tomado imágenes de microscopía confocal para una reconstrucción de la morfología de las 6 neuronas dopaminérgicas anteriores y de los cordones nerviosos anteriores que rodean el pharynx con objetivo 40x de inmersión, 1,2 micras entre planos, láser blanco al 9 %, longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión 510 nm. El análisis de las imágenes se ha realizado mediante ImageJ usando un ROI de línea segmentada y normalizando mediante división por la fluorescencia mínima. Para analizar las variaciones de intensidad, se ha usado la desviación estándar y la varianza.

Línea celular: Se ha utilizado la línea celular comercial HAP-1 de la empresa Horizon Discovery. Se trata de una línea celular prácticamente haploide, derivada de la línea celular KBM-7 de leucemia mielógena crónica (CML) a partir de un paciente de sexo masculino. Tiene únicamente un cromosoma X y carece de cromosoma Y. Se ha empleado una línea control sin mutaciones y 2 líneas con mutaciones en el gen que codifica SLC25A46. El *knockout* 1 de SLC25A46 tiene una delección de 26 pb en el exón 1 y el *knockout* 2 tiene una delección de 2 pb. Ambas mutaciones implican pérdida de función.

Cultivo celular: Las células se cultivan en medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) con un 10 % de Suero Fetal Bovino y un 1 % de Penicilina/Estreptomicina. Se utilizaron flask de 25 cm² con tapón con filtro. Para los pases, se realizó un lavado con 3 ml de PBS, se añadieron 0,5 ml de tripsina, se dejó incubando 3 minutos, se inactivó

la tripsina con 3 ml de medio y se retiró todo el contenido del flask, ya que son células de crecimiento muy rápido. Se rellenó con 5 ml de medio nuevo. Las células se mantuvieron en un incubador a 37 °C con un 10 % de CO₂.

Siembra de células: Las células se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos sobre cristales de 12 mm. Se sembró una concentración de aprox. 200.000 células/pocillo con 1 ml de medio/pocillo. Para el recuento, se utilizó una cámara de Neubauer.

Transfección de células: Para la transfección se utiliza el correspondiente plásmido (de aequorina citosólica, mitocondrial mutada y de retículo LA) con una concentración de 1 µg/pocillo junto con 50 µl de Optimem/pocillo y, por otra parte, 2 µg de lipofectamina/pocillo con 50 µl de Optimem/pocillo. Ambos se combinan, se agita para mezclar y se espera 15 minutos antes de echar 100 µl de la mezcla en cada pocillo. Se dejan 24 horas de transfección antes del experimento.

Reconstitución de aequorina: Para la medición de [Ca²⁺] en el retículo, antes hay que depletar el Ca²⁺ del retículo. Para ello, durante la reconstitución, se prepara una nueva placa con 0,5 de medio externo EGTA+BHQ/pocillo, y a ellos se transfieren los cristales con las células sembradas. Se esperan 10 minutos, se retira el medio y se añaden otros 200 µl/pocillo del medio anterior. Se añaden 2 µM de celenterazina w por pocillo y se guarda la placa 1 hora en oscuridad. Para los experimentos con aequorina citosólica y mitocondrial, la reconstitución se realiza con 500 µl de medio externo Ca²⁺ 1 mM por pocillo en una placa nueva a la que se transfiere el disco con las placas sembradas. Luego se retiran estos 500 µl y se añaden 200 µl de medio externo Ca²⁺ 1 mM y 2 µM de celenterazina w por cada pocillo. Se guarda la placa 1 hora en oscuridad.

Medios empleados para los experimentos con aequorina: Para los experimentos, se han utilizado los siguientes medios:

- **Medio externo Ca²⁺ 1 mM:** NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 1 mM.
- **Medio externo Ca²⁺ 10 mM:** 50 ml de agua desionizada + 0,5 CaCl₂ 1 M.
- **Medio externo Ca²⁺ 10 mM + digitonina 10 µM:** 10 ml de medio Ca²⁺ 10 mM + 10 µl de digitonina (100 mM).
- **Medio externo EGTA 0,5 mM:** NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, 0,5 mM EGTA.
- **Medio externo EGTA + BHQ (2,5-di-(t-butil)-1,4-hidroquinona):** NaCl 145 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM, Hepes 10 mM, 0,5 mM EGTA BHQ 10 µM

También se han utilizado los siguientes agonistas en dilución 1/1000:

- **ATP 100 µM:** 10 ml de medio externo Ca²⁺ 1 mM + 10 µl de ATP (100 mM Stock).
- **ATP 200 µM:** 10 ml de medio externo Ca²⁺ 1 mM + 20 µl de ATP (100 mM Stock).
- **ATP 500 µM:** 10 ml de medio externo Ca²⁺ 1 mM + 50 µl de ATP (100 mM Stock).
- **Cafeína 100 µM:** 10 ml de medio externo Ca²⁺ 1 mM + 10 µl de cafeína (100 mM Stock).
- **Histamina 100 µM:** 10 ml de medio externo Ca²⁺ 1 mM + 10 µl de histamina (100 mM Stock).

Medidas de [Ca²⁺]: La medición de [Ca²⁺] se realizó en un luminómetro que capta los fotones emitidos por la aequorina cuando se une al calcio. Los cristales redondos con las células se colocan sobre una cámara de perfusión de 15 mm de diámetro y 2 mm de profundidad, termostatizada a 37 °C. Posteriormente, los datos del recuento de fotones se transforman en concentraciones de Ca²⁺ mediante un software propio del laboratorio. Para las mediciones, se han usado 2 parámetros: incremento de [Ca²⁺] y velocidad de incremento. Para el incremento de [Ca²⁺], se ha elegido un punto basal medio y un punto medio en el pico de Ca y se ha obtenido la diferencia. Para la velocidad de incremento,

se ha tomado un intervalo de 30 segundos en los que se produce el aumento lineal de $[Ca^{2+}]$.

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados, se ha utilizado el software Graphpad Prism. Para facilitar la representación de la significancia estadística, se ha utilizado el siguiente convenio: *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$ y en las gráficas se han representado únicamente las diferencias estadísticamente significativas respecto al correspondiente grupo control.

Resultados

Grado de conservación de SLC25A46 en *C. elegans*

Alineamiento de múltiples secuencias

Con el objetivo de estudiar el grado de conservación de la secuencia de aminoácidos de SLC25A46 en *C. elegans* se realizó un alineamiento de secuencias múltiples. En este análisis hemos comparado la secuencia de aminoácidos de la proteína SLC25A46 de *C. elegans* con las secuencias de sus ortólogos en *Homo sapiens* y *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Drosophila melanogaster* y *Danio rerio*. Este análisis se realizó utilizando la herramienta T-Coffee que, además de estimar la distancia evolutiva entre distintas especies, permite encontrar patrones estructurales y funcionales comunes entre los diferentes ortólogos.

El alineamiento se incluye en el **Anexo 1** por falta de espacio. Como se puede observar, se trata de una proteína altamente conservada en mamíferos y que presenta mayores divergencias respecto a los dos organismos invertebrados. La principal diferencia entre ambos grupos radica en una prolongación en el extremo C-terminal, de mayor longitud en *C. elegans* que en *Drosophila melanogaster*, que está ausente en todos los vertebrados. Esta prolongación del extremo C-terminal en *Drosophila* y *C. elegans* incluye algunas serinas susceptibles de fosforilación, por lo que podría tener un papel en la regulación de esta proteína. Además, también se puede observar que los 120 primeros aminoácidos de la proteína en el extremo N-terminal presentan cierta variación. En los ortólogos de vertebrados se encuentran bien conservadas las treoninas en posición 44 y 45 (T44/T45), implicadas en la regulación de la proteína por fosforilación. Sin embargo estas dos treoninas están ausentes invertebrados (véase el **Anexo 2**). En el caso de *Drosophila*, presenta una prolina y una arginina en las posiciones 44 y 45, mientras que *C. elegans* presenta una tirosina y un ácido glutámico en estas mismas posiciones. Esta tirosina sí podría ser susceptible de fosforilarse y regular de alguna forma la actividad de la proteína. El alineamiento múltiple muestra que la región central es prácticamente idéntica en todas las especies analizadas, por lo que probablemente tenga importancia a nivel funcional o estructural.

En esta región se encuentra el motivo tripartita PX(D,E)XX(K,R) repetido tres veces tras las hélices α transmembrana, característico de las proteínas de esta familia. En *C. elegans*, solo están presentes dos repeticiones de dicho motivo, una de ellas altamente conservada y la otra con un menor grado de conservación, lo cual contribuye la validación de *C. elegans* como organismo modelo para el estudio de esta proteína (**Fig. 1**).

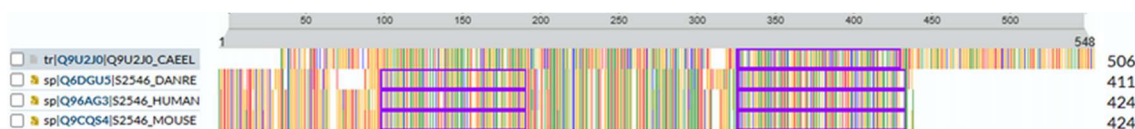


Fig. 1: Análisis de UniProt en el que se ven resaltadas en un recuadro morado las dos repeticiones de este motivo. La primera, que no está marcada, tiene un grado de conservación menor. La segunda está altamente conservada.

Análisis de variantes patogénicas

Por último, recurrimos a Uniprot para visualizar la localización de las variantes patogénicas de la proteína humana. Como se puede observar en la imagen (**Fig. 2**), las mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas (granate) se distribuyen en toda la longitud de la proteína, con numerosas variantes descritas, aunque hay una mayor concentración en la zona central de la proteína. A pesar de que en el alineamiento se encontraron algunas diferencias importantes entre la proteína humana y de *C. elegans*, muchas de estas mutaciones se encuentran en las regiones centrales altamente conservadas. Estos hallazgos respaldan el uso de *C. elegans* como modelo para el estudio del efecto funcional *in vitro* e *in vivo* de las mutaciones y la modulación del nivel de expresión de esta proteína mediante ARN de interferencia, respectivamente.

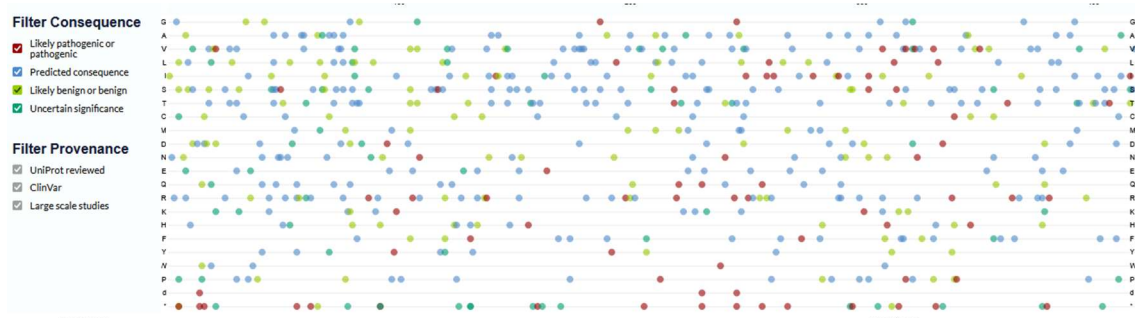


Fig. 2: Análisis de las mutaciones de SLC25A46 en humanos mediante UniProt. La secuencia de aminoácidos de la proteína se representa en horizontal de izquierda a derecha. Las distintas sustituciones de aminoácidos se representan en vertical.

Análisis funcional *in vivo* en *C. elegans*

La segunda línea experimental del presente trabajo abordará un análisis funcional *in vivo* en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* utilizando como base la cepa *wild-type* N2. Para evaluar el impacto de la ausencia de SLC25A46 se recurrirá al silenciamiento génico de esta proteína mediante la ingesta de bacterias que expresan el correspondiente ARN de interferencia en un plásmido.

Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la mortalidad

El ensayo de mortalidad pretende determinar si el silenciamiento de SLC25A46 tiene algún efecto en la mortalidad de *C. elegans*. En los estudios previos de silenciamiento de SLC25A46 realizados en modelos de *Drosophila melanogaster* se ha observado una disminución de la esperanza de vida (23), por lo que cabría esperar que el efecto en *C. elegans* sea similar y se observe una menor supervivencia.

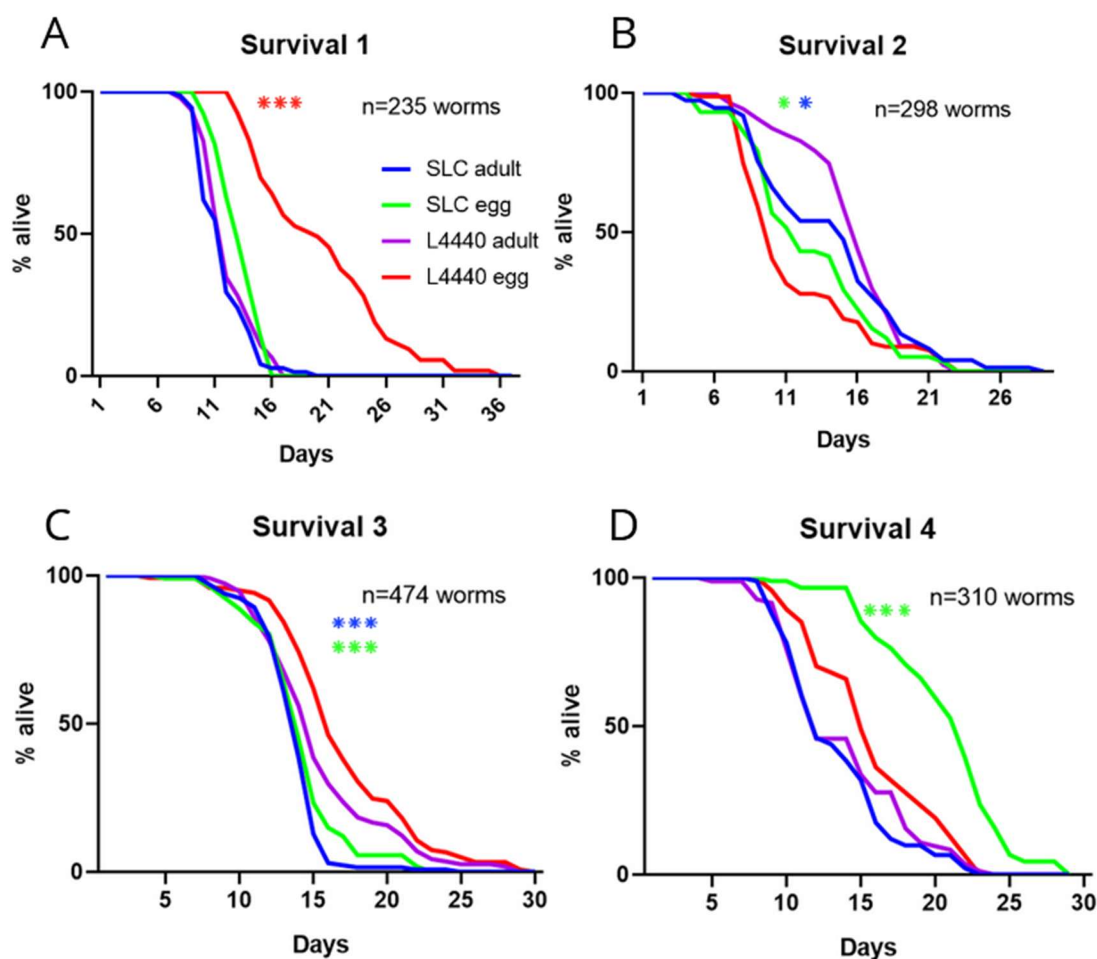


Fig 3: Gráficas de mortalidad que representan el porcentaje de gusanos vivos a lo largo del tiempo. Se han realizado 4 réplicas biológicas, la primera compuesta por 6 placas (réplicas técnicas) y las siguientes por 10 placas. Cada una de las placas contiene entre 10-25 gusanos. **A-D:** Gráficas de los experimentos de mortalidad individuales. *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

En el primer ensayo de supervivencia (**Fig. 3A**) se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre L4440 (huevo) y los demás grupos con $p=0,000$, y entre SLC (adulto) y SLC (huevo) con $p=0,001$. En el segundo ensayo de supervivencia (**Fig. 3B**) se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y L4440 (adulto) con $p=0,004$ y entre SLC (huevo) y L4440 (huevo) con $p=0,003$. En el tercer ensayo de supervivencia (**Fig. 3C**) se ha observado una mayor longevidad de los controles con diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y L4440 (adulto) con $p=0,000$ y entre SLC (huevo) y L4440 (huevo) con $p=0,000$. Sin embargo, en el cuarto ensayo de supervivencia (**Fig. 3D**), el grupo con mayor longevidad es SLC (huevo) con diferencias estadísticamente significativas respecto a los demás grupos con $p=0,000$.

Si bien es cierto que en algunos de los experimentos individuales se han observado diferencias estadísticamente significativas, estas se contradicen entre sí entre las distintas réplicas y no se observa una tendencia consistente, por lo que no se puede afirmar de forma concluyente que el silenciamiento de SLC25A46 tenga un efecto en la longevidad de *C. elegans*.

A continuación, se resumen los datos de las gráficas en formato de tabla.

Tabla 1: Resumen de los cuatro experimentos de mortalidad con el número de gusanos por grupo, el porcentaje de gusanos censurados, la vida media y el p-valor.

Experimento	Condición	N	% censurados	Vida media (días)	p-value (Log-rank) respecto al control
1	SLC (adulto)	113	37,2 %	11,92	0,464
	SLC (huevo)	80	18,8 %	13,29	0,000
	L4440 (adulto)	88	47,7 %	12,30	-
	L4440 (huevo)	95	44,2 %	20,41	-
2	SLC (adulto)	139	46,8 %	14,18	0,004
	SLC (huevo)	120	51,7 %	12,79	0,003
	L4440 (adulto)	155	49,0 %	11,70	-
	L4440 (huevo)	152	42,8 %	15,72	-
3	SLC (adulto)	150	12,0 %	13,78	0,000
	SLC (huevo)	144	25,7 %	14,22	0,000
	L4440 (adulto)	150	24,0 %	15,59	-
	L4440 (huevo)	164	26,2 %	17,12	-
4	SLC (adulto)	105	13,3 %	13,51	0,305
	SLC (huevo)	96	7,3 %	20,74	0,000
	L4440 (adulto)	95	12,6 %	13,93	-
	L4440 (huevo)	62	24,2 %	15,81	-

Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la movilidad

En estudios previos se ha observado que el silenciamiento de SLC25A46 en *Drosophila melanogaster* tiene como consecuencia una disminución de la movilidad y déficits en la locomoción, mientras que estudios similares de silenciamiento en *Danio rerio* también han evidenciado déficits motores y pérdida de neuronas motoras espinales, por lo que con este estudio se pretende comprobar si el silenciamiento de SLC25A46 en *C. elegans* también presenta manifestaciones fenotípicas de alteración de la movilidad.

Los parámetros analizados en los vídeos adquiridos son Distancia recorrida, Velocidad máxima, Velocidad media, Área y Longitudes corporales por segundo. La distancia recorrida hace referencia a la distancia recorrida por el gusano siguiendo un trazado sinusoidal, no en línea recta. Los parámetros Velocidad máxima y Velocidad media, hacen referencia a la velocidad máxima y media observadas durante los 30 segundos de grabación. El Área hace referencia al área corporal del gusano vista desde una proyección cenital. Una mayor área no solo se puede asociar a un crecimiento en tamaño del gusano, sino también a una degeneración muscular asociada a la edad que produce una menor tersura de la pared muscular y un colapso que se traduce en un aplanamiento del gusano que, por efecto óptico de la vista cenital, se capta como un mayor área corporal. Por último, BLPS (longitudes corporales por segundo) es un parámetro que permite normalizar el desplazamiento y hacerlo independiente del tamaño del gusano, ya que los gusanos con un mayor tamaño corporal recorren más distancia.

En este caso, el tamaño muestral del análisis estadístico corresponde a los *tracks* analizados en ImageJ, que el programa detecta automáticamente según los parámetros introducidos. En algunos casos, cuando dos gusanos chocan, el programa asigna un nuevo *track*, por lo que el número de *tracks* es superior al de gusanos. Todos los análisis estadísticos de los parámetros de movilidad estadístico se han realizado mediante el test Kruskal-Wallis, ya que no cumplen parámetros de normalidad.

Análisis de la distancia recorrida:

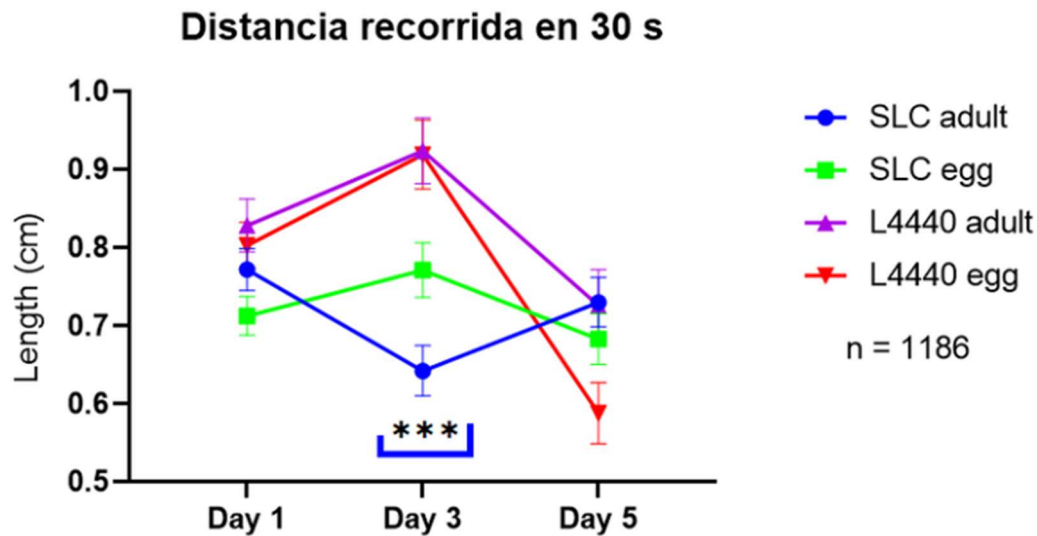


Fig. 4: Representación de la distancia media recorrida durante 30 segundos en los días 1, 3 y 5 de adulto. *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

La distancia recorrida nos proporciona una idea general de la capacidad móvil del gusano (**Fig. 4**). Para el día 1 y 5, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. Para el día 3, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y L4440 (adulto) con $p < 0,0001$, con una menor distancia recorrida respecto a su control. A pesar de que parece haber un efecto sobre la distancia recorrida a día 3 en el estado adulto, este efecto desaparece a día 5, por lo que no se mantiene en el tiempo y no se pueden sacar conclusiones claras.

Análisis de la velocidad máxima:

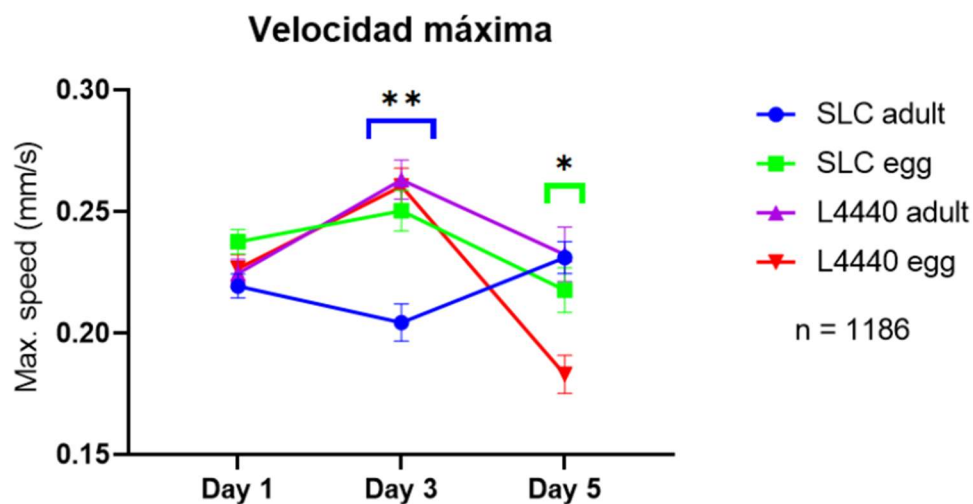


Fig. 5: Representación de la velocidad máxima a lo largo del tiempo (Días 1, 3 y 5 de adulto). *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

A continuación se estudió la velocidad máxima de desplazamiento del gusano. A día 1 se observan diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo) con $p = 0,0206$. A día 3 se observan diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo) con $p = 0,0033$ y respecto a L4440 (adulto) con $p < 0,0001$. A día 5 se observan diferencias estadísticamente significativas entre SLC (huevo) y L4440 (huevo) con $p = 0,0240$ (**Fig. 5**). Nuevamente, parece que la movilidad de SLC (adulto) se ve más afectada a día 3 y presenta una menor velocidad máxima. Por lo tanto, el momento de silenciamiento de SLC25A46 parece afectar a la velocidad máxima a día 3. Sin embargo, y al igual que sucedió con la longitud recorrida, este efecto desaparece a día 5, no pudiéndose así sacar una conclusión clara sobre el efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre el parámetro de velocidad máxima.

Análisis de la velocidad media

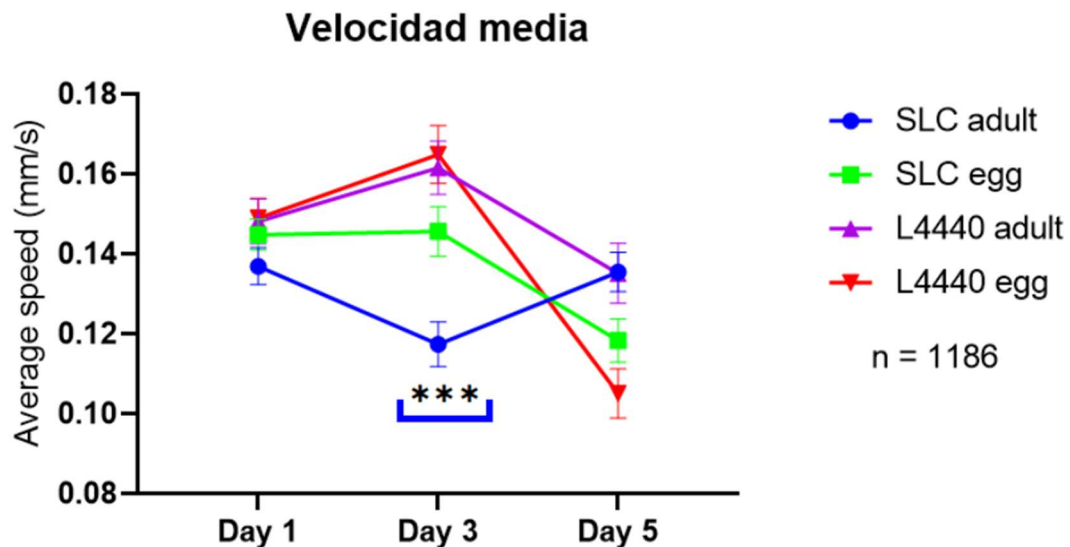


Fig. 6: Representación de la velocidad media a lo largo del tiempo (Días 1, 3 y 5 de adulto). *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

La velocidad media también se evaluó, como un dato complementario de la velocidad máxima. A día 1 no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos. A día 3 se observan diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo) con $p = 0,0203$ y respecto a L4440 (adulto) con $p < 0,0001$. A día 5 se no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y sus respectivos controles (**Fig. 6**). Al igual que en los parámetros anteriores, se observa un descenso de la velocidad media a día 3 para SLC (adulto), aunque esta diferencia desaparece nuevamente a día 5, por lo que el silenciamiento de SLC25A46 parece no tener un efecto mantenido sobre la velocidad media.

Análisis del área corporal

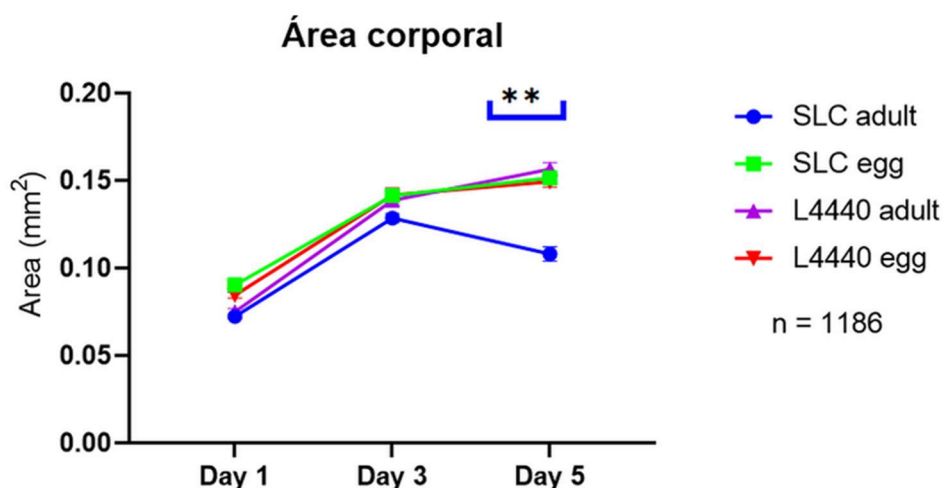


Fig. 7: Representación del área de los gusanos (tamaño corporal) los días 1, 3 y 5 de adulto. *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

La medida del área corporal del gusano nos da una idea general de su crecimiento y permite evaluar defectos durante su desarrollo, ya sea desde huevo o desde adulto joven. A día 1 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo). A día 3 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo) con $p = 0,0004$. A día 5 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y todos los demás grupos con $p < 0,0001$ (**Fig. 7**). Parece que el área corporal de los gusanos del grupo SLC (adulto) disminuye a día 5. Estos datos pueden indicar, que, si el silenciamiento se realiza desde la etapa adulta, el tamaño corporal del adulto se ve reducido a partir de cierto momento. Sería interesante comprobar si esta tendencia se mantiene en días posteriores.

Análisis de las longitudes corporales por segundo

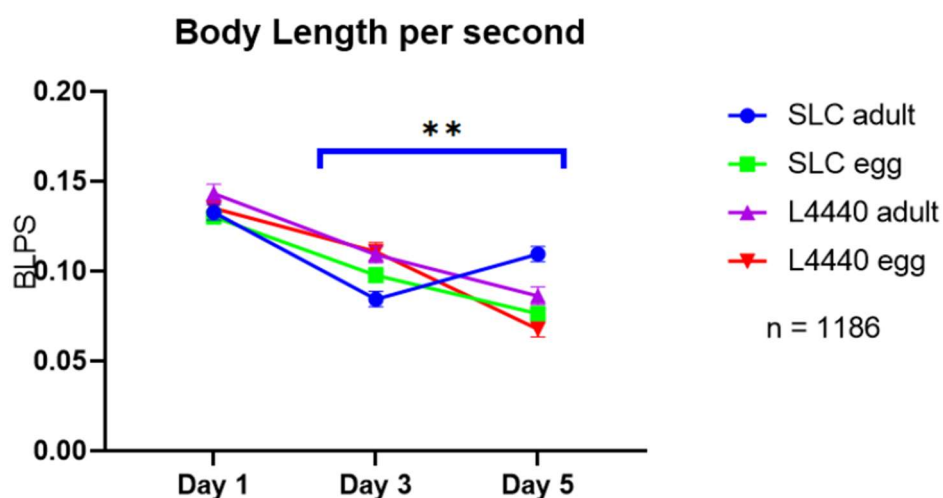


Fig. 8: Representación de las longitudes corporales por segundo a lo largo del tiempo (Días 1, 3 y 5 de adulto). *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

Este parámetro es complementario a la distancia recorrida, ya que permite normalizar el desplazamiento y hacerlo independiente del tamaño del gusano, dado que los gusanos con un mayor tamaño corporal recorren más distancia. A día 1 no se observaron diferencias estadísticamente significativas. A día 3 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y L4440 (adulto) con $p = 0,0006$. A día 5 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre SLC (adulto) y SLC (huevo) y respecto a L4440 (huevo) con $p < 0,0001$ y entre SLC (adulto) y L4440 (adulto) con $p = 0,0045$ (**Fig. 8**). A día 3 se observa nuevamente una reducción de la movilidad relativa respecto al control, pero, paradójicamente a día 5 es mayor que el control. En general, la tendencia general de este grupo difiere de su control respectivo, sobre todo a día 3, aunque en la mayoría de parámetros esta tendencia se revierte o se anula a día 5.

Efecto del silenciamiento de SLC25A46 sobre la fertilidad

El paso de estadio larvario L4 a adulto es una etapa metabólicamente muy demandante, ya que es el momento en el que se produce la ovogénesis y las necesidades energéticas se sextuplican. En experimentos de silenciamiento de genes mitocondriales, se ha observado que la disfunción mitocondrial y la alteración del metabolismo energético pueden tener un impacto negativo en la fertilidad de *C. elegans*, por lo que sería interesante comprobar si el silenciamiento de SLC25A46 también puede tener un efecto deletéreo en la fertilidad de este modelo animal. Para ello se ha analizado la puesta de huevos a lo largo del tiempo durante los cinco primeros días de adulto, coincidiendo con el periodo fértil de *C. elegans*, así como la puesta total de huevos durante estos cinco días.

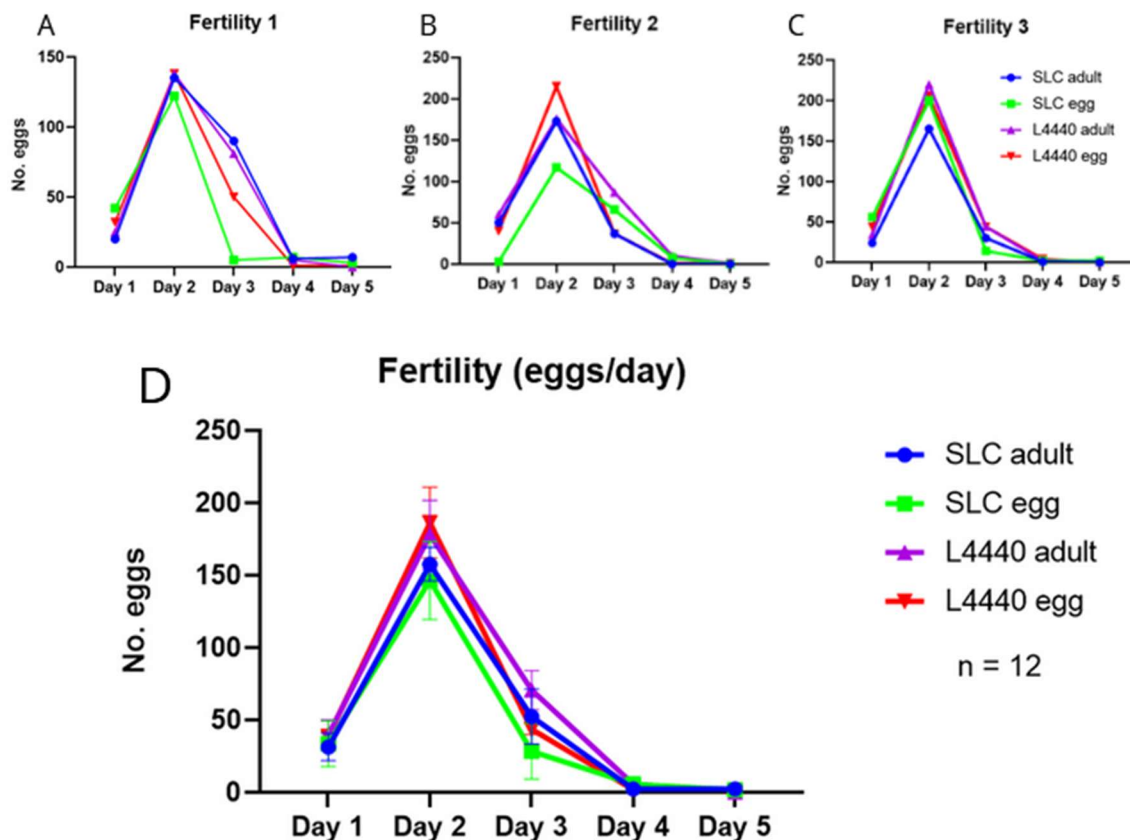


Fig. 9: A-C: Fertilidades individuales. **D.** Fertilidad total. Recuento de huevos viables a lo largo del tiempo durante el periodo fértil (5 primeros días de adulto).

Como se ve en la **Fig. 9 A-D**, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Como se puede ver en la gráfica D, la tendencia es similar en todos los grupos y coincide con el fenotipo del N2, caracterizado por un tamaño de puesta reducido a día 1, con el pico máximo de fertilidad a día 2, un drástico descenso el día 3 y una puesta prácticamente nula en los días 4 y 5. Por lo tanto, el parámetro de fertilidad no se ve afectado bajo el silenciamiento de SLC25A46.

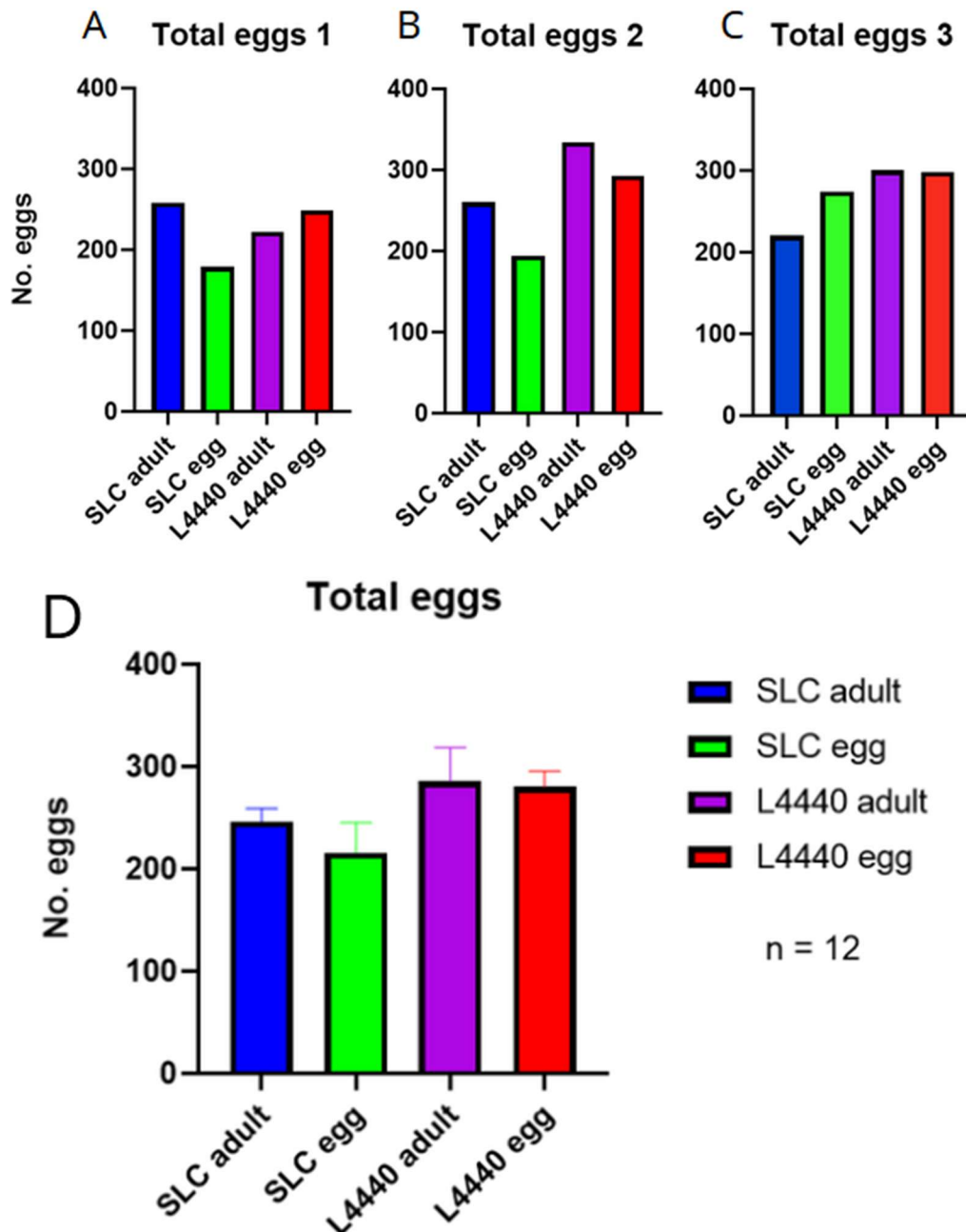


Fig. 10: A-C: Recuento de huevos de los 3 experimentos individuales. **D:** Conjunto de las tres réplicas biológicas individuales. Recuento total de huevos viables durante todo el periodo fértil (5 primeros días de adulto).

Para finalizar, se analizó el recuento total de huevos puestos entre las diferentes condiciones (**Fig. 10 A-D**) y no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, por lo que el tamaño total de la puesta no se ve

afectado por el silenciamiento de SLC25A46. El descenso en el recuento de huevos de la primera réplica del grupo SLC (huevo) se debió a un fenómeno de matrifagia a día 4, el cual se caracteriza por una retención de los huevos en el interior de la madre, que al eclosionar en su interior le provocan la muerte. El fenómeno no se repitió, por lo que no existen evidencias de que esté asociado al silenciamiento de SLC25A46, pero debido al reducido tamaño muestral, puede haber interferido en el recuento.

Estudio morfológico de las neuronas dopaminérgicas mediante microscopía confocal

Para el estudio de la morfología neuronal, se ha elegido la cepa BZ555, que permite visualizar las neuronas dopaminérgicas mediante la expresión de GFP bajo el promotor *dat-1p*, que codifica un transportador de dopamina y se expresa específicamente en este tipo neuronal. Esta cepa se ha elegido, por una parte, por su fácil visualización, ya que *C. elegans* tiene únicamente 8 neuronas dopaminérgicas y, por otra parte, dado que SLC25A46 se expresa principalmente en tejido nervioso y provoca cuadros clínicos de neuropatías y disfunción mitocondrial. Dado que las neuronas dopaminérgicas tienen requisitos energéticos extremadamente elevados, el silenciamiento de esta proteína podría producir efectos visibles en estas neuronas. En otros modelos animales, el silenciamiento sí ha producido cambios neuronales: en *Drosophila* se aprecian cambios morfológicos y en *Danio rerio* pérdida de neuronas motoras, por lo que cabría esperar que también tenga algún efecto en *C. elegans*. Uno de los marcadores de degeneración neuronal descritos en *C. elegans* es la presencia de interrupciones o la formación de vesículas preapoptóticas con apariencia punteada (*blebbing*) en las neuritas de las neuronas dopaminérgicas y se intentarán detectar estas anomalías mediante microscopía confocal (23).

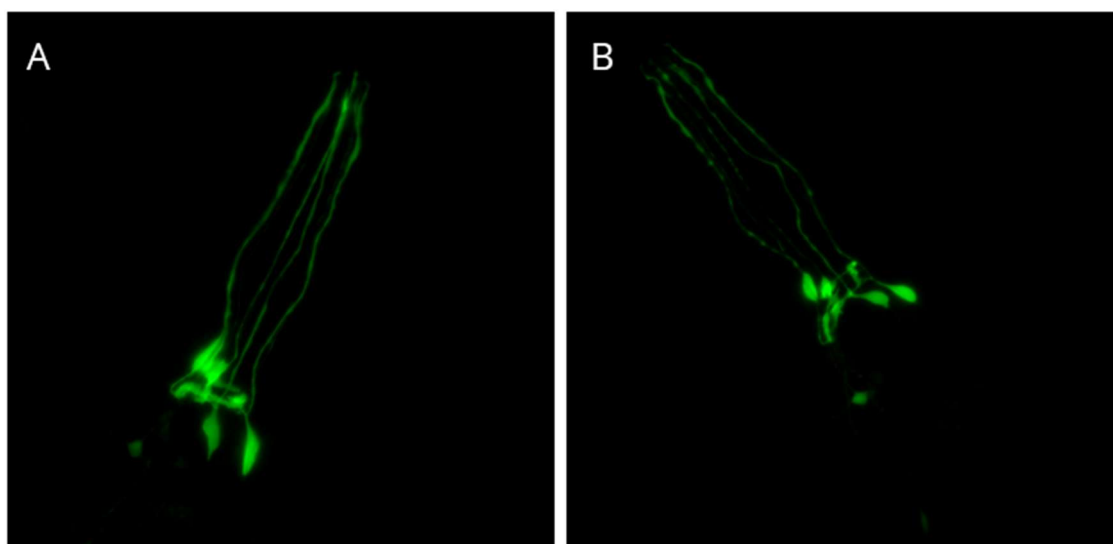


Fig. 11: Representación de las 4 neuronas dopaminérgicas anteriores de *C. elegans* y de los correspondientes axones mediante microscopía confocal. **A:** Grupo control. **B:** Grupo con ARN de interferencia para SLC25A46.

Para el análisis de la morfología, se han analizado imágenes tomadas en el microscopio confocal mediante ImageJ. El análisis ha consistido en obtener los valores de intensidad de fluorescencia a lo largo de las proyecciones axonales. Los datos se han normalizado dividiéndolos por la intensidad de fluorescencia mínima para cada axón. Como la situación patológica se caracteriza por irregularidades en el axón, que se pueden manifestar, por una parte, como interrupciones del mismo con una menor fluorescencia y, por otra, mediante un punteado de mayor intensidad, un fenómeno llamado *blebbing*. Se han elegido como parámetros la varianza y la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia respecto a la fluorescencia media, como una forma de evaluar la neurodegeneración. A simple vista en las imágenes se puede observar una intensidad de fluorescencia más homogénea en el grupo control (**Fig. 11A**) y la presencia de interrupciones y punteado en el grupo con silenciamiento de SLC25A46 (**Fig. 11B**).

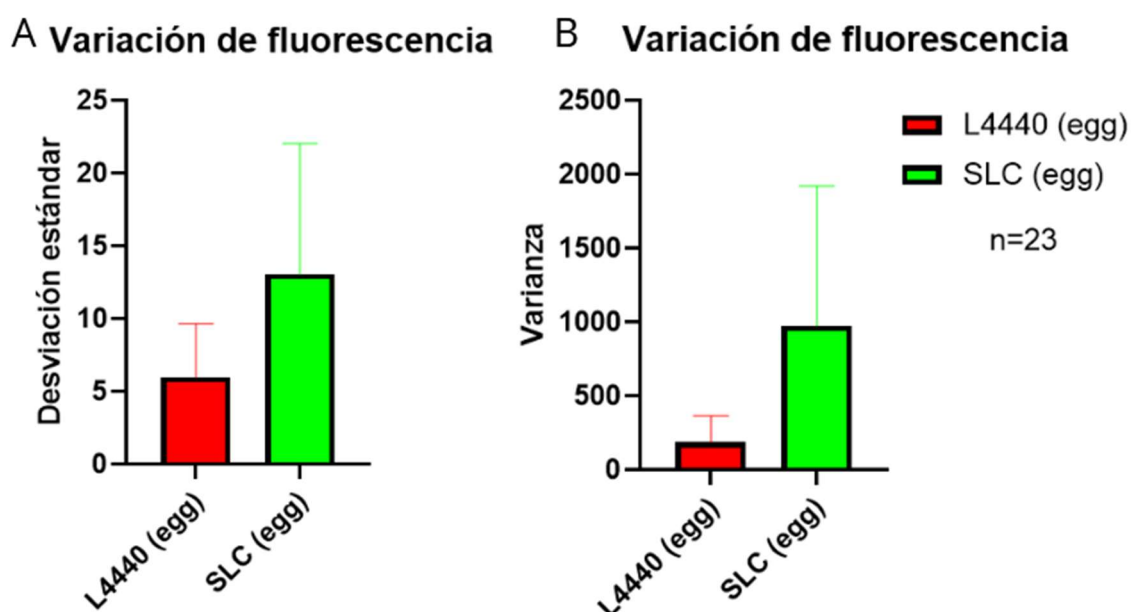


Fig. 12: **A:** Representación de la desviación estándar de la intensidad de fluorescencia a lo largo de los axones. **B:** Representación de la varianza de la intensidad de fluorescencia a lo largo de los axones.

En la **Fig. 12A** se puede ver que la diferencia de la desviación estándar no es estadísticamente significativa, debido a la gran variabilidad de las muestras y el reducido tamaño muestral, aunque sí parece apreciarse una tendencia en la gráfica que quizá podría llegar a ser significativa si se aumenta el tamaño muestral. También cabe destacar que el error estándar de la media es mucho mayor en el grupo experimental que en el control. El parámetro de la varianza tampoco mostró una diferencia significativa en la morfología de las proyecciones neuronales de los dos grupos de estudio (**Fig. 12B**).

Estudio de la intensidad de fluorescencia mediante microscopía de fluorescencia

La premisa del análisis es la misma que en el apartado anterior, pero con el objetivo de analizar la intensidad de fluorescencia en los somas de las neuronas dopaminérgicas. Dado que los somas tienen diferentes tamaños, el parámetro analizado en este caso es la densidad integrada.

A Intensidad de fluorescencia

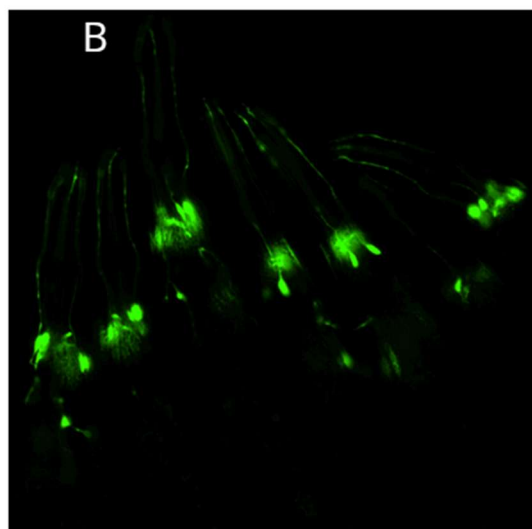
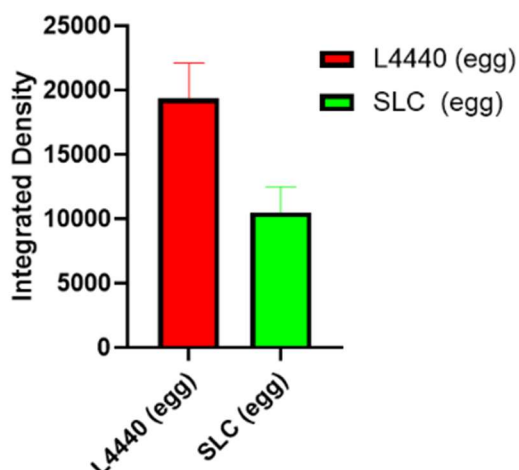


Fig. 13: A: Cuantificación de la intensidad de fluorescencia mediante la densidad integrada. **B:** Imagen de microscopio de fluorescencia de la zona analizada.

Como se puede ver en la **Fig. 13A**, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, por lo que no parece que el silenciamiento de SLC25A46 provoque diferencias a nivel de la intensidad de fluorescencia en el soma de las neuronas dopaminérgicas.

Estudio en cultivos celulares

En estudios previos, se ha demostrado que existe interacción entre SLC25A46 y SERCA, la ATPasa de Ca^{2+} que introduce Ca^{2+} en el retículo endoplásmico. Tanto SERCA como SLC25A46 han sido relacionadas con la posible formación de puntos de contacto entre la mitocondria y el retículo, por lo que la ausencia de SLC25A46 podría influir en la comunicación entre ambos orgánulos y, por tanto, en la homeostasis y los flujos de calcio. Para ello, se pretende estudiar el posible papel de SLC25A46 en la señal de calcio mediante el análisis de los flujos de calcio citosólico, mitocondrial y de retículo en la línea celular HAP. En este caso, se trabajará con una línea control y dos líneas con dos mutaciones independientes en SLC25A46 por delección de determinados pares de bases que provocan una pérdida de función de la proteína.

Efecto del silenciamiento de SLC25A46 en la homeostasis del Ca^{2+} del retículo

Para los experimentos de calcio de retículo, se perfundieron las células con los siguientes medios a los siguientes tiempos:

- Medio externo EGTA 0,5 mM a 0 segundos.
- Medio externo Ca^{2+} 1 mM a 60 segundos.
- Medio externo Ca^{2+} 10 mM con digitonina a los 240 segundos.

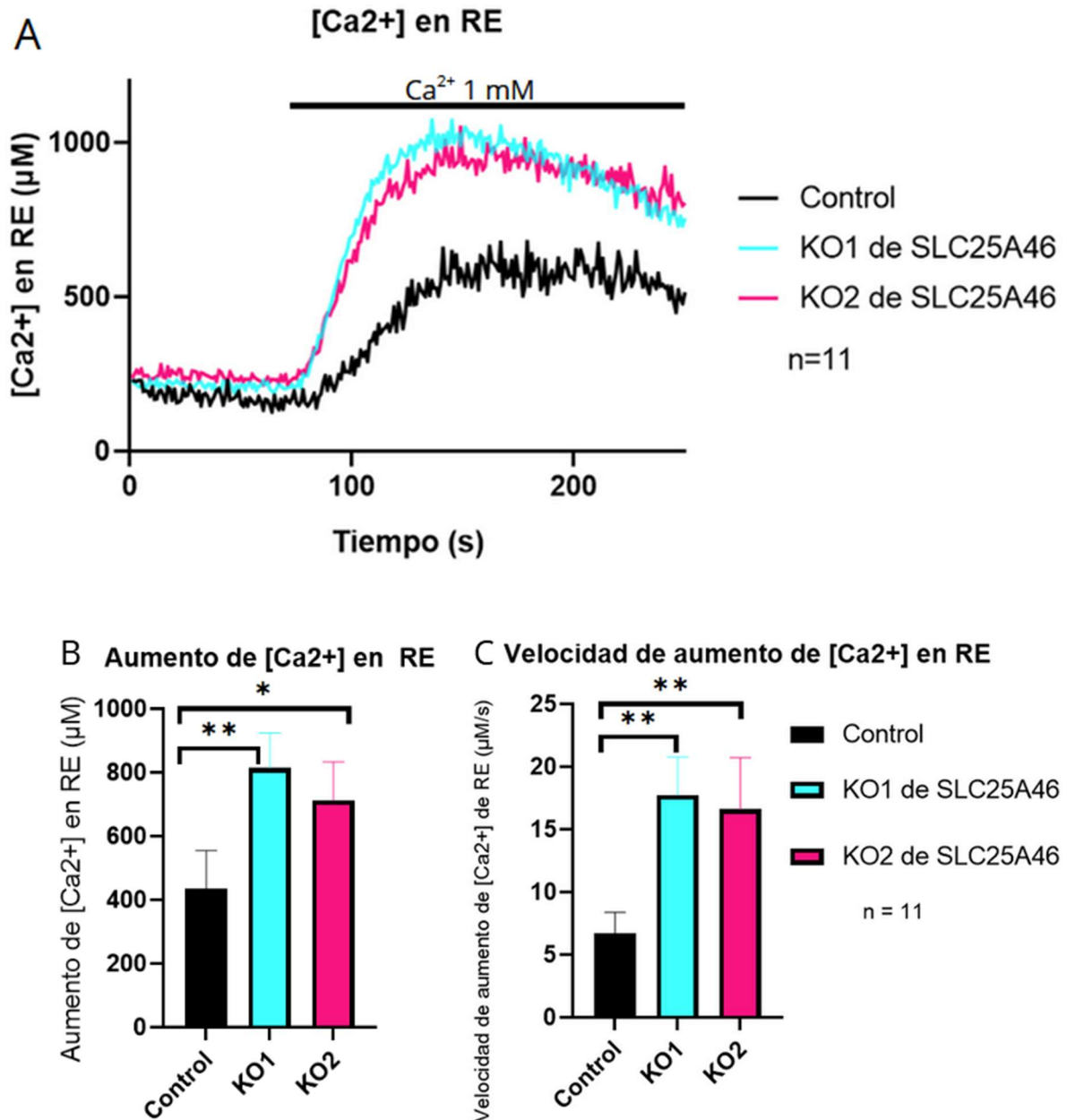


Fig. 14: **A:** Gráfica de $[\text{Ca}^{2+}]$ en RE a lo largo del tiempo para los 3 grupos experimentales. **B:** Aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el retículo por rellenado a través de SERCA. **C:** Velocidad de rellenado de Ca^{2+} en el retículo a través de SERCA. *: $P < 0,05$. **: $P < 0,01$. ***: $P < 0,001$.

En los experimentos de rellenado de Ca^{2+} del RE (**Fig. 14 A-C**), se observan diferencias significativas en la concentración de Ca^{2+} alcanzada en el *steady-state* respecto al control (**Fig. 14B**), con un $p=0,0069$ para el KO1 de SLC25A46 y de 0,0343 para el KO2 de SLC25A46. En cuanto a la velocidad, también se aprecian diferencias estadísticamente significativas respecto al control de 0,0053 para el KO 1 y de 0,0099 para el KO2 (**Fig. 14C**), lo que sugiere que los mutantes con pérdida de función de SLC25A46 permiten una mayor entrada de Ca^{2+} al retículo a través de la SERCA, con un mayor aumento de la concentración de Ca^{2+} en el retículo y con una mayor velocidad de rellenado del Ca^{2+} del retículo.

Efecto del silenciamiento de SLC25A46 en la homeostasis del Ca^{2+} citosólico y mitocondrial

Para los experimentos de calcio citosólico y mitocondrial, se transfectaron las células HAP con el correspondiente plásmido (aequorina citosólica o aequorina mitocondrial mutada), se reconstituyó con celenterazina w y se perfundieron las células con los siguientes medios en los siguientes tiempos:

- Medio externo Ca^{2+} 1 mM a 0 segundos.
- Agonista (histamina 100 μM , cafeína 100 μM y ATP 100, 200 y 500 μM) a 60 segundos.
- Medio Ca^{2+} 10 mM con digitonina a los 240 segundos.

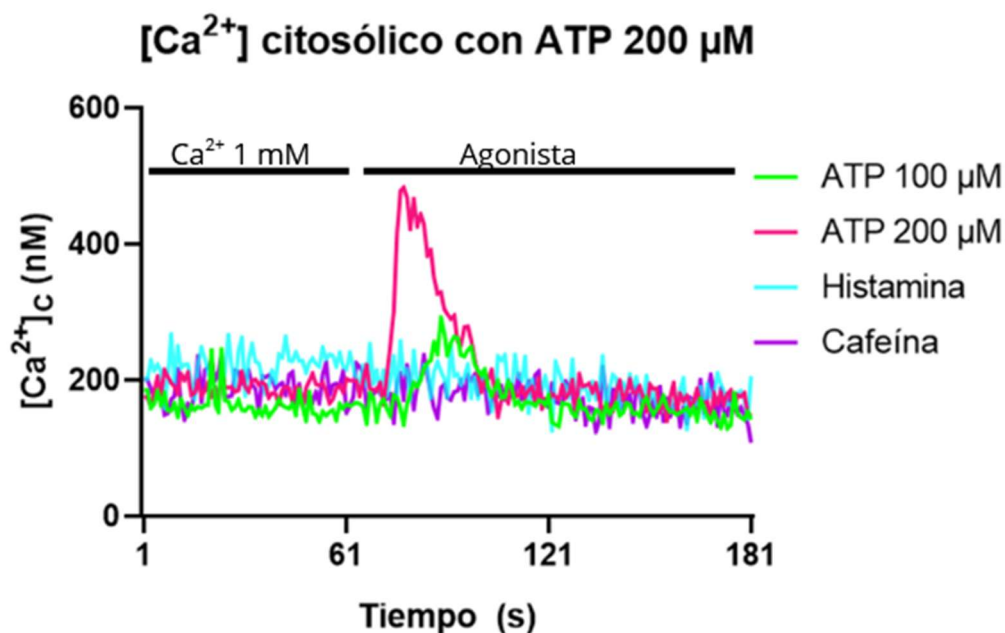


Fig. 15: Gráfica de la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico en respuesta a distintos agonistas. **A:** Con cafeína 50 mM. **B:** Con ATP 100 μM . **C:** Con ATP 200 μM . **D:** Con histamina 100 μM .

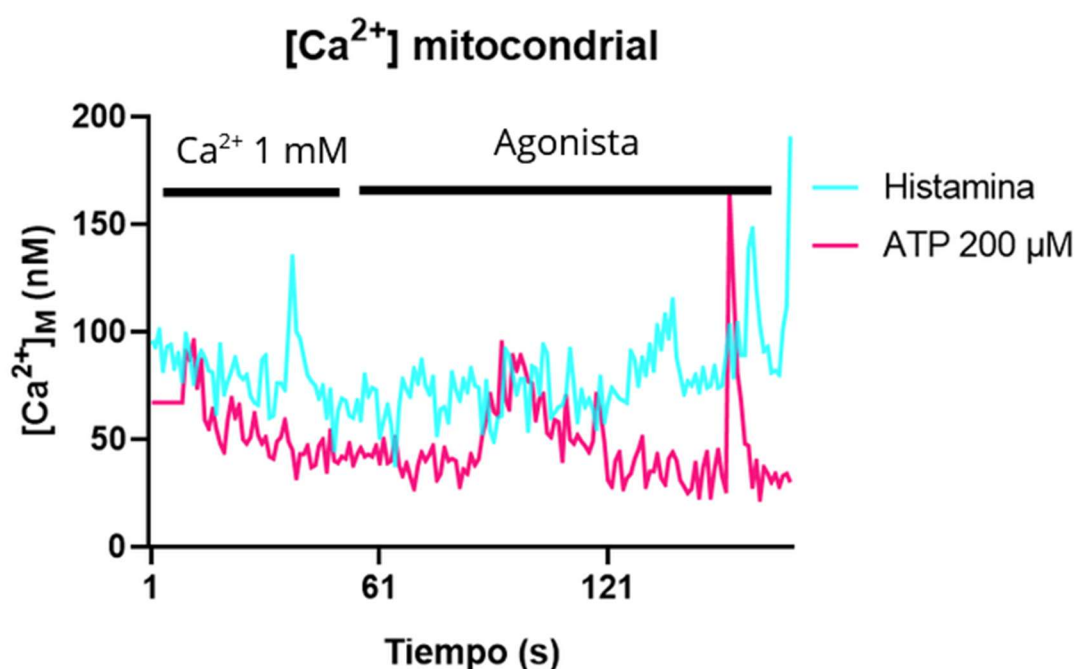


Fig. 16: Gráfica de la $[Ca^{2+}]$ mitocondrial en respuesta a distintos agonistas. **A:** Con ATP 200 μ M. **B:** Con histamina 100 μ M.

Las células HAP no respondieron a cafeína ni histamina y tampoco a ATP 100 μ M. La respuesta a ATP 200 y 500 μ M fue leve (**Fig. 15 y 16**). Al exponerlas a medio externo Ca^{2+} 10 mM con digitonina, sí se produjo pico de fotones, por lo que se considera que la transfección tuvo éxito. Debido a la falta de respuesta, el experimento únicamente se realizó con las células control. Es necesario realizar futuros experimentos para determinar los efectos del silenciamiento de SLC25A46 en las dinámicas de Ca^{2+} citosólicas y mitocondriales. Debido al limitado tiempo disponible, no se pudo completar esta línea de investigación.

Discusión

El análisis *in silico* ha revelado que la región central de la proteína en *C. elegans* se encuentra altamente conservada, mientras que los extremos carboxilo y amino terminal difieren considerablemente respecto a sus ortólogos en vertebrados. Además, se han observado algunos datos interesantes que podrían servir como base para futuras líneas de investigación sobre SLC25A46. En este sentido, resulta interesante el alto grado de conservación de la proteína en vertebrados y, sobre todo, en mamíferos, mientras que presenta algunas diferencias significativas en invertebrados. Por una parte, destaca el motivo funcional altamente conservado en vertebrados de las dos treoninas en las posiciones 44 y 45. También sería interesante realizar un estudio funcional de la prolongación del extremo C-terminal en *C. elegans*, que se encuentra ausente en vertebrados. En cualquier caso, estas diferencias podrían servir como base para indagar en las posibles diferencias en la regulación de esta proteína en invertebrados.

La pérdida de función de SLC25A46, tanto en humanos como en modelos animales, induce una fuerte disminución de la esperanza de vida (15) (23). Sin embargo, los resultados de los distintos experimentos de mortalidad que hemos realizado no muestran una tendencia consistente de los diferentes grupos experimentales, a pesar

de que individualmente sí se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en algunos de los experimentos individuales, por lo que no es posible sacar conclusiones fiables sobre el efecto del silenciamiento parcial de SLC25A46 sobre la supervivencia de *C. elegans*. Por tanto, estos experimentos deberían repetirse tratando de minimizar los factores que induzcan variabilidad entre experimentos.

En relación con los datos de supervivencia, los resultados de los ensayos donde se evaluó el tamaño de la progenie, la senescencia reproductiva y la movilidad sugieren que el silenciamiento de SLC25A46 tampoco impacta de manera significativa sobre el estado funcional del nematodo. Estos resultados contrastan con el fenotipo observado, tanto en humanos como en modelos murinos y mosca, donde la falta de función de SLC25A46 generó un fuerte fenotipo de reducción de movilidad (21) (23).

Respecto al posible papel de SLC25A46 en el funcionamiento, la integridad y la supervivencia de diferentes poblaciones neuronales (15) (23), nuestros resultados en poblaciones de células dopaminérgicas muestran la presencia de nódulos en las proyecciones anteriores de las neuronas CEP, un fenómeno asociado en *C. elegans* a neurodegeneración. La cuantificación de este fenómeno mediante el estudio de la variación de la intensidad de fluorescencia a lo largo de las proyecciones no fue estadísticamente significativa entre los grupos control y experimental, aunque parece haber una tendencia a una mayor variabilidad en el caso del silenciamiento de SLC25A46 con ARN de interferencia. El incremento del tamaño muestral aumentaría la potencia del análisis estadístico para así poder discernir cuantitativamente el impacto sobre las neuronas dopaminérgicas. Respecto al análisis de expresión de *dat-1*, un marcador de integridad de las neuronas dopaminérgicas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que no parece que el silenciamiento de SLC25A46 tenga efectos en este sentido.

Resultados previamente publicados sugieren que SLC25A46 interacciona físicamente con SERCA en múltiples tejidos (11), aunque hasta la fecha no se ha estudiado el posible impacto funcional de la ausencia de SLC25A46 sobre la actividad de la SERCA. Nuestros resultados muestran que la falta de función de SLC25A46 incrementa significativamente la cinética y la capacidad de captación de Ca^{2+} por parte del RE, un fenómeno esencialmente catalizado por la SERCA. Los resultados en este caso son altamente significativos, ya que logramos reproducir el fenotipo en dos líneas celulares independientes con falta de función de SLC25A46. Sin embargo, hay que mencionar que el número de experimentos fue reducido y es necesario incrementar el tamaño muestral para consolidar este resultado. Estos datos preliminares sugieren que SLC25A46 funcionaría como un represor de la actividad de la SERCA. Este mecanismo podría proporcionar una vía de regulación para adaptar los niveles de calcio del RE al estado funcional de las mitocondrias.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que, aunque la secuencia de SLC25A46 está parcialmente conservada, los efectos del silenciamiento de SLC25A46 no recapitulan por el momento el fenotipo observado en humanos y en otros modelos experimentales preclínicos. Además, nuestros resultados sugieren que, además de jugar un papel relevante en la regulación de la dinámica mitocondrial, SLC25A46 también podría tener un papel funcional en la regulación de la homeostasis del calcio en el retículo endoplásmico. Estos resultados contribuyen al conocimiento funcional de SLC25A46 y sientan las bases para futuras investigaciones que permitan dilucidar con mayor detalle su papel fisiológico y su implicación en diversas patologías.

Conclusiones

1. La secuencia de SLC25A46 muestra una región central relativamente bien conservada, y extremos amino y carboxilo terminal divergentes cuando se compara con sus ortólogos en vertebrados.
2. El silenciamiento de SLC25A46 no generó efectos significativos reproducibles sobre la longevidad.
3. El silenciamiento de SLC25A46 no afectó ni al tamaño de la progenie, ni al perfil de senescencia reproductiva, ni a la movilidad de los nematodos.
4. El silenciamiento de SLC25A46 no altera significativamente la expresión de dat-1, un marcador de integridad de las neuronas dopaminérgicas en *C. elegans*. Sin embargo, sí generó anomalías morfológicas en las proyecciones anteriores de las neuronas CEP dopaminérgicas.
5. La pérdida de función de SLC25A46 incrementa la cinética y la capacidad de captación de calcio del retículo endoplásmico.

Bibliografía

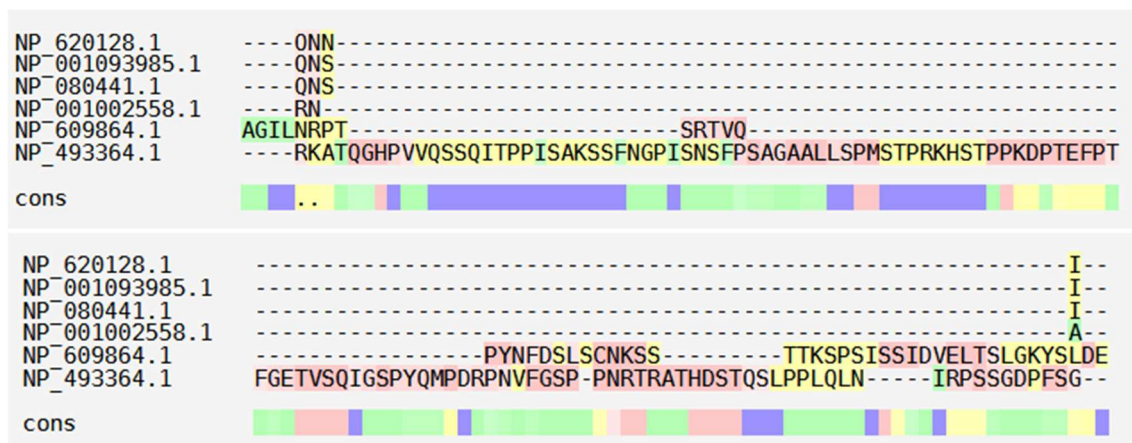
1. Cimadamore-Werthein C, King MS, Lacabanne D, Pyrihová E, Jaiquel Baron S, Kunji ERS. Human mitochondrial carriers of the SLC25 family function as monomers exchanging substrates with a ping-pong kinetic mechanism. EMBO Journal [Internet]. 2024 Aug 16 [cited 2025 Jun 7];43(16):3450–65. Available from: <https://www.embopress.org/doi/10.1038/s44318-024-00150-0>
2. Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. Mol Aspects Med. 2013 Apr 1;34(2–3):465–84.
3. Schuettpelz J, Janer A, Antonicka H, Shoubridge EA. The role of the mitochondrial outer membrane protein SLC25A46 in mitochondrial fission and fusion. Life Sci Alliance [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 15];6(6):e202301914. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10052876/>
4. Haitina T, Lindblom J, Renström T, Fredriksson R. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. Genomics [Internet]. 2006 Dec [cited 2025 Jun 7];88(6):779–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16949250/>
5. Fuente Muñoz CE de la, Arias Alvarez C, Fuente Muñoz CE de la, Arias Alvarez C. Mitochondrias en el cerebro y sus alteraciones en la Enfermedad de Alzheimer. Educación química [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2025 Jun 7];33(2):18–36. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2022000200018&lng=es&nrm=iso&tlng=es
6. Kunji ERS, King MS, Ruprecht JJ, Thangaratnarajah C. The SLC25 carrier family: Important transport proteins in mitochondrial physiology and pathology. Physiology. 2020 Sep 1;35(5):302–27.
7. Santo-Domingo J, Lassueur S, Núñ A, Ez Galindo N, Alvarez-Illera P, Romero-Sanz S, et al. SLC25A46 promotes mitochondrial fission and mediates resistance to lipotoxic stress in INS-1E insulin-secreting cells. 2023;
8. Steffen J, Vashisht AA, Wan J, Jen JC, Claypool SM, Wohlschlegel JA, et al. Rapid degradation of mutant SLC25A46 by the ubiquitin-proteasome system results in

- MFN1/2-mediated hyperfusion of mitochondria. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2025 Jun 10];28(5):600–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28057766/>
9. Schuettpelz J, Janer A, Antonicka H, Shoubridge EA. The role of the mitochondrial outer membrane protein SLC25A46 in mitochondrial fission and fusion. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2023 [cited 2025 Mar 12];6(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36977595/>
 10. Janer A, Prudent J, Paupe V, Fahiminiya S, Majewski J, Sgarioto N, et al. SLC25A46 is required for mitochondrial lipid homeostasis and cristae maintenance and is responsible for Leigh syndrome. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2016 Sep [cited 2025 Jun 15];8(9):1019–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27390132/>
 11. Perivolidi VI, Violitzi F, Ioannidou E, Rinotas V, Stamatakis G, Samiotaki M, et al. Proteomic Identification of the SLC25A46 Interactome in Transgenic Mice Expressing SLC25A46-FLAG. *J Proteome Res* [Internet]. 2022 Feb 4 [cited 2025 Jun 17];21(2):375–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34983179/>
 12. Boopathy S, Luce BE, Lugo CM, Hakim P, McDonald J, Kim HL, et al. Identification of SLC25A46 interaction interfaces with mitochondrial membrane fusogens Opa1 and Mfn2. *J Biol Chem* [Internet]. 2024 Oct [cited 2025 Jun 14];300(10):107740. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11459905/>
 13. Santo-Domingo J, Lassueur S, Galindo AN, Alvarez-Illera P, Romero-Sanz S, Caldero-Escudero E, et al. SLC25A46 promotes mitochondrial fission and mediates resistance to lipotoxic stress in INS-1E insulin-secreting cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 14];136(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36942724/>
 14. Abrams AJ, Hufnagel RB, Rebelo A, Zanna C, Patel N, Gonzalez MA, et al. Mutations in SLC25A46, encoding a UGO1-like protein, cause an optic atrophy spectrum disorder. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Aug 30 [cited 2025 Jun 15];47(8):926–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26168012/>
 15. Wan J, Steffen J, Yourshaw M, Mamsa H, Andersen E, Rudnik-Schöneborn S, et al. Loss of function of SLC25A46 causes lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. *Brain* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2025 Jun 15];139(11):2877–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27543974/>
 16. Hammer MB, Ding J, Mochel F, Eleuch-Fayache G, Charles P, Coutelier M, et al. SLC25A46 Mutations Associated with Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia in North African Families. *Neurodegener Dis* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2025 Jun 15];17(4–5):208–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28558379/>
 17. Charlesworth G, Balint B, Mencacci NE, Carr L, Wood NW, Bhatia KP. SLC25A46 mutations underlie progressive myoclonic ataxia with optic atrophy and neuropathy. *Mov Disord* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2025 Jun 15];31(8):1249–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27430653/>
 18. Kodal LS, Hammer-Hansen S, Holm-Yildiz S, Grønskov K, Karstensen HG, Dysgaard T. Case report: A novel variant in SLC25A46 causing sensorimotor polyneuropathy and optic

- atrophy. *Front Neurol* [Internet]. 2022 Dec 12 [cited 2025 Jun 15];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36578309/>
19. Bitetto G, Malaguti MC, Ceravolo R, Monfrini E, Straniero L, Morini A, et al. SLC25A46 mutations in patients with Parkinson's Disease and optic atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2025 Jun 15];74:1–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259769/>
 20. Abrams AJ, Fontanesi F, Tan NBL, Buglo E, Campeanu IJ, Rebelo AP, et al. Insights into the genotype-phenotype correlation and molecular function of SLC25A46. *Hum Mutat* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Jun 15];39(12):1995. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6240357/>
 21. Li Z, Peng Y, Hufnagel RB, Hu YC, Zhao C, Queme LF, et al. Loss of SLC25A46 causes neurodegeneration by affecting mitochondrial dynamics and energy production in mice. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2025 Jul 1];26(19):3776–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28934388/>
 22. Wan J, Steffen J, Yourshaw M, Mamsa H, Andersen E, Rudnik-Schöneborn S, et al. Loss of function of SLC25A46 causes lethal congenital pontocerebellar hypoplasia. *Brain* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2025 Jul 1];139(11):2877–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27543974/>
 23. Ali MS, Suda K, Kowada R, Ueoka I, Yoshida H, Yamaguchi M. Neuron-specific knockdown of solute carrier protein SLC25A46a induces locomotive defects, an abnormal neuron terminal morphology, learning disability, and shortened lifespan. *IBRO Rep* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2025 Jun 30];8:65–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32140609/>
 24. Obinata H, Watanabe T, Takahashi H, Shimo S, Oda T, Sugimoto A, et al. SLC-25A46 regulates mitochondrial fusion through FZO-1/Mitofusin and is. *J Cell Sci* [Internet]. 2025 May 30 [cited 2025 Jun 17]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40444356/>

Anexo 1: Alineamiento de múltiples secuencias (MSA)

[illegible]



Anexo 2: Conservación del dominio funcional de las treoninas 44 y 45

