



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Estudio de la participación de la mitocondria en la gónada
del *Caenorhabditis elegans* ante estímulos de estrés**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
GISSELLE ANGÉLICA CAMPOS MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL:
ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
JESÚS AGUIRRE LINARES
[Instituto de Fisiología Celular](#)
JOSÉ DE JESÚS GARCÍA TREJO
[Facultad de Química](#)

Ciudad de México. Febrero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosa Estela Navarro González en el Departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Este trabajo fue posible gracias a los apoyos de los proyectos de Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-SEP) 220987 y del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN207415 e IN208918.

La alumna Gisselle Angélica Campos Martínez recibió una beca durante la realización de sus estudios de Maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) con número de CVU 820681.

Gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado fue posible presentar los resultados preliminares de este trabajo en el congreso Stress Pathogenesis, Aging, Metabolism and Small RNA in *C. elegans*.

Se agradece a los miembros del Comité Tutorial, el Dr. Jesús Aguirre Linares y el Dr. José de Jesús García Trejo por sus valiosos consejos y asesoría durante la realización de este proyecto.

Se agradece a los miembros del jurado la Dra Marietta Tuena Sangri, el Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes, la Dra. María Soledad Funes Argüello, el Dr. Enrique Salas Vidal y el Dr. Horacio Merchant Larios por el tiempo que dedicaron a leer, corregir y mejorar este escrito.

Se agradece a la M. en C. Silvia Salinas Velázquez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

También se agradece al personal de las siguientes unidades del IFC por su valiosa asistencia técnica:

Al personal de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular: Ruth Rincón Heredia y Abraham Rosas Arellano

A la Dra. Laura Ongay Larios y al personal de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Guadalupe Códiz Huerta y Minerva Mora Cabrera.

Al personal de la Biblioteca Armando Gómez Puyou del Instituto de Fisiología Celular.

Al personal de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular: Ana María Escalante, Ivette Rosas, Gerardo Coello, Juan Manuel Barbosa y Francisco Pérez.

Al personal del taller Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

Resumen.....	5
Tabla de abreviaturas.....	6
Introducción.....	7
<i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio.....	8
La gónada de <i>C. elegans</i>	14
Los gránulos de RNA.....	17
Las mitocondrias de <i>C. elegans</i>	25
Relación entre gránulos de RNA y mitocondrias.....	34
Planteamiento del problema.....	37
Hipótesis.....	38
Objetivo general.....	39
Objetivos particulares.....	40
Materiales y metodología.....	41
Resultados.....	50
La morfología de las mitocondrias en las células germinales del nematodo cambia en respuesta a estrés.....	51
Los agregados mitocondriales se forman próximos a algunos gránulos de estrés.....	59
Los gránulos de estrés no se requieren para formar los agregados mitocondriales.....	62
La agregación de mitocondrias es resultado de una fusión mitocondrial.....	66
La fusión mitocondrial se requiere para la formación de gránulos de estrés en el canal central de la gónada.....	71
Conclusiones.....	73
Discusión	75
Perspectivas.....	83
Bibliografía.....	84

Resumen

La gónada del nematodo adulto *Caenorhabditis elegans* produce ovocitos continuamente. Algunas de las células germinales forman un sincicio que se conecta por un canal de citoplasma común que recorre desde la parte más distal, donde se encuentra un nicho de células troncales germinales, hasta los ovocitos en diacinesis. Con este modelo estudiamos cómo el estrés afecta la ovogénesis. En este trabajo se describe la morfología de las mitocondrias en las distintas regiones de la gónada del nematodo y cómo ella se ve afectada al exponer a los gusanos a dos tipos de estrés: ayuno y choque de calor. Encontramos que cuando los animales son sometidos a cualquiera de estos tipos de estrés la red mitocondrial se reorganiza. En particular en el canal central de la gónada ocurre fusión mitocondrial mientras que las mitocondrias de otras regiones se fisionan. El proceso de fusión mitocondrial es necesario para la formación de gránulos de estrés en el canal central de la gónada, pero no de aquellos que se forman en los ovocitos, lo que indica que existen diferencias en la formación de estos dos tipos de gránulos.

Abreviaturas utilizadas en este escrito

3'UTR	3' untranslated region
CGC	Caenorhabditis Genetic Center
DAPI	4, 6-diamino-2-fenilidol
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsRNA	doble strand RNA
DTC	Distal Tip Cell
EGTA	Ácido Egtácico
EMS	etil metilo-sulfonato
ER	Retículo Endoplasmico
ERMES	ER-Mitochondrial Encounter Structures
ETC	Electron Transport Chain
HEPES	hydroxyethyl piperazin etano sulfonico acido
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido
LB	medio Luria Bertani
LPA	Ácido Lisofosfatídico
MAMs	Membranas Asociadas a Mitocondrias
MICOS	Sitios de contacto mitocondriales
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitochondrial
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
NGM	Nematode Growth Medium
OCR	Oxigen Consumption Rate
PA	Ácido Fosfatídico
PBS	Bufer Salino de Fosfatos
PBT	Bufer Salino de Fosfatos con Tween al 5%
piRNA	RNA que interacciona con PIWI
PV	Plásmido Vacío
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Interferencia de RNA
ROS	Reactive Oxygen Species
tRNA	RNA de transferencia
UPRmt	Respuesta mitocondrial a Proteínas mal plegadas (mitochondrial Unfolded Protein Response)

Introducción

***Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio**

Caenorhabditis elegans es un nematodo transparente, de vida libre, que generalmente se encuentra como hermafrodita, aunque puede llegar a presentarse como macho en una baja proporción (0.03%). En la naturaleza vive en hábitats tropicales, y se encuentra ampliamente distribuido en diversas regiones del mundo. Esto se explica con el hecho de que utiliza diversos animales, como moscas, caracoles y serpientes, para movilizarse de una zona a otra. Se encuentran en las raíces de cualquier tipo de planta y en frutas en descomposición. Su alimentación consiste en bacterias, levaduras y otros eucariontes unicelulares. Las poblaciones de *C. elegans* tienden a disminuir en el invierno hasta un punto extremo, por lo que después se observa la amplificación de un genotipo específico en las colonias de esta especie, a este fenómeno se le conoce como efecto fundador (Corsi et al., 2015; Frezal & Félix, 2015).

Como animal, cuenta con varios de los principales sistemas (muscular, digestivo, nervioso y reproductivo) utilizando un número de células menor, si se compara con mamíferos, y éste es definido (959 células somáticas) (Corsi et al. 2015). Al ser hermafrodita produce poblaciones homocigas que no sufren depresión por endogamia. La depresión por endogamia es un fenómeno ecológico de acumulación de mutaciones deletéreas debido al entrecruzamiento entre miembros de una población pequeña (Frezal & Félix 2015; Sulston & Horvitz 1977).

Este nematodo presenta un ciclo de vida corto, el adulto deposita embriones que eclosionan como larvas que pasan por cuatro estadios larvarios (L1 a L4) después de los

cuales llegan a una etapa de adulto fértil. Viven aproximadamente 20 días. A partir del sexto día podemos observar que los gusanos presentan un fenotipo de envejecimiento donde los gusanos son más lentos y con una tasa metabólica disminuida (Booth & Brunet 2016; Qin & Hubbard 2015; Yasuda et al. 2006a). Además, en ambientes con alta densidad poblacional, escases de comida o temperaturas extremas, en los animales L1 tardíos se puede inducir un estadio de diapausa conocida como *dauer*. En este estadio la larva es resistente a diferentes tipos de estrés como el osmótico o el térmico, entre otros, y no requiere alimento. Puede mantenerse así hasta por cuatro meses. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables se reincorpora al ciclo de vida pasando directamente a la etapa L4 (Lant & Storey 2010).

C. elegans fue propuesto por Sidney Brenner como organismo modelo de estudio en 1963 para el estudio de la biología del desarrollo y la neurobiología. En los años 60's Brenner buscaba un organismo que permitiera entender procesos como la diferenciación y el desarrollo de organismos multicelulares y tuviera las facilidades prácticas de los organismos unicelulares con los que había trabajado previamente. Los organismos multicelulares que se usaban como modelo en aquella época acarreaban consigo diversas complejidades para su estudio como la difícil accesibilidad y el enorme número de células. Habiendo trabajado primero con modelos más fáciles de manejar para estudios de regulación genética, como bacterias o levaduras, se decidió a encontrar un organismo similar para estudios de biología del desarrollo, así se podría ayudar a entender mecanismos que ocurren en nosotros de manera más rápida y sencilla (Brenner 2003a, 2003b).

Fue en un trabajo de 1974 donde describió la inducción y seguimiento de mutaciones específicas generadas por el mutageno EMS (Etil-metil-sulfonato) que coloca al

nematodo *C. elegans* como un organismo modelo (Brenner 1974, 1973). Desde entonces se ha seguido utilizando como modelo y ha servido al desarrollo de diversas áreas de la biología; como biología molecular, celular y del desarrollo, genética, toxicología, evolución, ecología, etcétera.

Como ejemplos de que este modelo puede servir para entender procesos que ocurren en organismos más complejos, se mencionan a continuación trabajos que se desarrollaron con *C. elegans* que llevaron a los investigadores que los desarrollaron a ser galardonados con un premio Nobel:

- En 2002, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por estudios de la regulación genética del desarrollo y de la muerte celular programada fue otorgado a:
 - **Sydney Brenner** por establecer a *C. elegans* como organismo modelo, lo que dio la oportunidad de relacionar análisis genéticos con la división celular, diferenciación y desarrollo de órganos (Brenner 1974, 1973).
 - **John Sulston** por mapear el linaje celular, a través de cada división y procesos de diferenciación celular en los tejidos de *C. elegans*. El mostró que algunas células específicas pasan por un proceso de muerte celular programada como parte integral y normal del desarrollo del organismo, e identificó la primera mutación de un gen que participa en dicho proceso (Sulston & Brenner 1974; Sulston & Horvitz 1977).
 - **Robert Horvitz** por descubrir y caracterizar los genes clave que controlan el proceso de muerte celular programada en *C. elegans*. Él mostró cómo estos

genes interactúan entre ellos en el proceso de muerte celular y que existen sus homólogos en humanos (Avery & Horvitz 1987; Sulston & Horvitz 1977).

- En 2006, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por el descubrimiento de la interferencia de RNA (el silenciamiento de genes por RNA de doble cadena), proceso que se encuentra conservado en plantas, animales y humanos, y participa en los procesos de defensa contra los virus y de control de la expresión génica, fue otorgado a: **Adrew Fire** y **Criag Mello** (Fire et al. 1998; Grishok et al. 2001; Tabara, Grishok, & Mello 1998)
- En 2008 el Premio Nobel de Química fue otorgado a **Martín Chalfie**, por demostrar el valor de la proteína verde fluorescente (GFP) como una etiqueta genética luminosa para varios fenómenos biológicos. En uno de sus primeros experimentos él marcó seis células individuales del gusano *C. elegans* con la ayuda de la GFP (Chalfie et al., 1994). El galardón fue compartido con Osamu Shimomura, quien aisló la GFP de la medusa *Aequorea victoria*, y Roger Y. Tsien, quien contribuyó al entendimiento del mecanismo de fluorescencia y amplió la paleta de colores de las proteínas fluorescentes (Chrencik et al. 2015; Heim & Tsien 1996; Shimomura 2009, 1995; Tsien 1998).

Todos estos hallazgos han sido relevantes para el trabajo desarrollado en esta tesis, y para muchos otros, ya que a partir de los mecanismos que describen se desarrollaron y

mejoraron las técnicas que se usaron en este proyecto y se siguen usando en múltiples laboratorios para poder responder diversas preguntas biológicas.

En 1998, después de 6 años de esfuerzos, se convirtió en el primer eucarionte multicelular en tener su genoma completamente secuenciado, 97 Mb, y con ello aumentaron las ventajas de usar este modelo. De la secuencia del genoma, se pueden predecir aproximadamente 19,000 genes codificantes, con regiones intergénicas muy cortas y escasas, por lo que existen pocas variantes o isoformas de un mismo gen (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Esto también permitió generar WormBase, una de las bases de datos mejor anotadas en donde se reporta: dónde se expresa un gen, cómo se regula, con qué proteínas interacciona al ser traducido, qué fenotipos se observan en las distintas mutantes, entre otras cosas (California Institute of Technology 2000).

La cepa original, N2, fue aislada en Bristol, Inglaterra, y fue cultivada en el laboratorio por muchos años antes de que se pudiera congelar, por lo que, como muchos otros organismos modelo, ha sufrido los efectos de la domesticación y es una cepa que ahora dista mucho de la silvestre de vida libre; a pesar de ello es la cepa de referencia. A partir de la N2 se han aislado y producido una serie de mutantes y transgénicos que se almacenan en dos grandes consorcios: el Centro Genético de Caenorhabditis (CGC) de la Universidad de Minnesota (<https://cgc.umn.edu/>) y el National BioResource Project de Japón (<https://shigen.nig.ac.jp/c.elegans/>).

La practicidad del nematodo para su estudio y manejo en el laboratorio también se apoya en el hecho de que se ha estudiado su desarrollo embrionario de manera muy fina,

por lo que se conocen, por mapeo, el origen e historia de cada célula adulta (Sulston & Horvitz 1977). Además se puede obtener un gran número de animales en poco tiempo, no requiere equipo ni suplementos muy costosos (Corsi et al. 2015).

La gónada de *C. elegans*

La gónada de *C. elegans* está formada por dos brazos simétricos en forma de “U” que van desde las células de la punta distal (DTCs) hasta un útero común (Figura 1). Para su estudio, cada brazo se puede dividir en tres partes: distal, asa y proximal (Figura 1). La gónada está compuesta por células tanto del linaje somático como del germinal. Las células somáticas son i) **las células de la vaina**, las cuales cubren o envuelven a las células germinales y juegan un papel en la regulación del ciclo celular de las células germinales y en la degradación de los cuerpos apoptóticos; y ii) **las células de la punta distal (DTC)**, una en cada brazo, se encargan de mantener el nicho de células germinales troncales mediante señalización tipo notch, promoviendo la mitosis e inhibiendo la meiosis de las células germinales (Cinquin et al. 2010; Lehmann 2012).

La línea germinal es la primera que se determina durante el desarrollo embrionario, cuando un grupo de agregados de RNA y proteínas de origen materno, denominados gránulos P, se localizan diferencialmente en el cigoto y se segregan con la primera división celular: los gránulos P (necesarios para la determinación, diferenciación y mantenimiento de la línea germinal) se dirigen exclusivamente al blastómero P (posterior) que corresponde al sitio de entrada del espermatozoide y es siempre el de menor tamaño. Estos gránulos acompañan a las células germinales durante todo su desarrollo. En la gónada del adulto los gránulos P se observan de forma perinuclear en las células germinales de la parte distal y el asa o en el citoplasma en los ovocitos de la parte proximal. Este método de determinación por preformación de la línea germinal es común entre los organismos modelo que se han

estudiado, sin embargo, en el caso de los mamíferos, como en otros organismos, esto se lleva a cabo por un mecanismo de inducción guiado por las células adyacentes (Judith Kimble et al. 2005; Kimble & White 1981; Lehmann 2012).

Con el progreso de la embriogénesis se establecen las cuatro células primordiales que formarán la gónada: Z1 y Z4 que darán lugar a las células somáticas de la gónada y Z2 y Z3 que darán lugar al linaje germinal, estas células proliferan y migran para dar forma a la gónada. Posteriormente, en la etapa L4, algunas de las células germinales inician la meiosis que da lugar a los espermatozoides, los cuales se almacenan en la espermateca. En la etapa adulta existe un cambio que promueve la diferenciación a ovocitos. Así el animal adulto únicamente produce ovocitos (Richardson & Lehmann 2010; Wong & Schwarzbauer 2012).

En la parte más distal de la gónada del adulto se encuentra un nicho de células troncales germinales. Las DTCs se requieren para mantener el nicho mediante señalización por contacto, para delimitarlo extienden sus membranas, en estructuras delgadas y alargadas con forma de tubos a los que se les denomina citonemas, a lo largo de 20 núcleos germinales (Hall et al. 1999; Kimble et al. 2005). Por su parte las células germinales proliferan desde el nicho troncal en dirección al útero. Forman un sincicio conectado por un canal central llamado *rachis* que se ubica en el centro a lo largo de la gónada (Figura 1). Las células germinales se conectan al *rachis* por un único canal anillo, que es un poro en la membrana que mantiene la comunicación con el resto del sincicio. A medida que avanzan, maduran hasta convertirse en ovocitos independientes, es decir, se celularizan, cerrando el canal anillo que las mantenía conectadas al sincicio (Hillers et al. 2015; Jantsch et al. 2017; Kimble 2011). Al igual que en otros organismos, la meiosis da como resultado cuatro células

haploides viables en el caso de los espermatozoides, y solamente una célula haploide viable en el caso de los ovocitos (Jantsch et al. 2017).

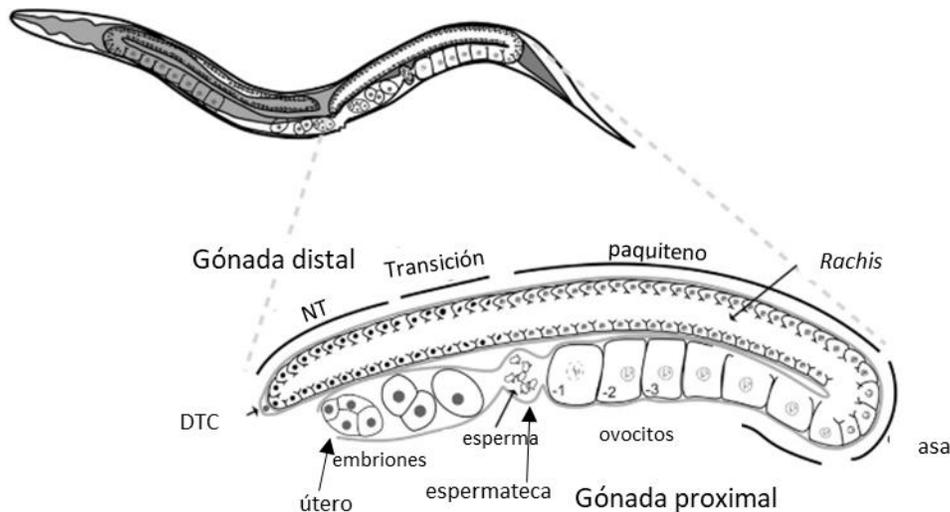


Figura 1. Esquema de la gónada de *Caenorhabditis elegans*. Esquema de un hermafrodita adulto. La gonada está resaltada y el intestino está marcado en gris. En la parte inferior se muestra detalladamente uno de los brazos de la gónada. DTC: célula de la punta distal, continua el nicho de células troncales (NT), la zona de transición a meiosis, la zona de paquiteno, el asa (hasta aquí todas las células germinales están compartiendo citoplasma mediante el canal central de la gónada o *Rachis*), ovocitos -1, -2 y -3 que ya se han celularizado, la espermateca, donde se almacena espermatozoides, y finalmente algunos embriones acumulados en el útero que continúa y se comparte con el otro brazo de la gónada. Se etiquetaron las regiones en las que seccionamos la gónada para su estudio. DTC= célula de la punta distal, NT= nicho troncal, *Rachis*= canal central de la gónada (modificada de Huelgas-Morales 2016).

En condiciones normales (20°C, con comida), aproximadamente el 50% de los ovocitos potenciales mueren por apoptosis y no llegan a convertirse en gametos maduros (Bailey & Gartner 2013). A esta muerte se le conoce como apoptosis fisiológica y es necesaria para la sobrevivencia y fertilidad del gusano adulto (Andux & Ellis 2008). Se considera que

las células que mueren tienen un papel de nodrizas para aquellas que completarán la gametogénesis, cediendo su citoplasma (Wolke, Jezuit, & Priess 2007). Evidencia de esto es que i) la muerte ocurre en la misma zona donde comienza a aumentar el tamaño de los ovocitos, ii) en la etapa L4, cuando se lleva a cabo la producción de espermias, que son de menor tamaño que los ovocitos, no hay muerte de células germinales y iii) cuando se inhibe la apoptosis los ovocitos son de menor tamaño. Finalmente, los cuerpos apoptóticos son eliminados por fagocitosis de las células de la vaina, el engullimiento es mediado por el receptor CED-1 de la membrana de las células de la vaina (Zhou, Hartweg, & Horvitz 2001). Este proceso es parte del programa de mantenimiento y preservación de las células que darán origen a la siguiente generación y ocurre de manera similar en otros organismos, incluido el ser humano.

En condiciones de estrés, se incrementa la cantidad de células apoptóticas en la gónada. Se ha demostrado que esto ocurre por vías de señalización distintas, las cuales dependen del tipo de señal inductora de muerte (Salinas, Maldonado, & Navarro 2006).

Además de los gránulos P, en las células germinales de *C. elegans* podemos encontrar otros tipos de complejos ribonucleoprotéicos como cuerpos de almacenamiento, cuerpos de procesamiento y, cuando los gusanos son sometidos a estrés, se induce la formación de gránulos similares a los gránulos de estrés que se han descrito en células de mamífero (Silva-García & Navarro 2013; DeHaan et al. 2017; Paksa & Raz 2015; Voronina et al. 2011).

Gránulos de RNA

Los gránulos de RNA se consideran organelos no membranosos de estado semilíquido cuya función propuesta es regular la localización, estabilidad y/o traducción de los RNA que los componen. Estudios de fotoblanqueo han probado que se trata de estructuras dinámicas con regiones con componentes estables, cubiertas por un cascarón de componentes que se pueden asociar y separar del gránulo con facilidad (Buchan & Parker 2009; Guil, Long & Cáceres 2006; Kedersha et al. 2005; Protter & Parker 2016).

De manera general los gránulos se componen de proteínas que pueden o no tener dominios de unión a RNA como proteínas con regiones intrínsecamente desordenadas, proteínas de unión a poli-A, otras proteínas reclutadas que dependen del tipo de gránulo y que determinan su función; y moléculas de RNA mensajeros o no codificantes, que se reclutan para ser procesados o almacenados. Todos estos componentes se asocian entre sí generando un cambio de fase con respecto al estado del citoplasma (Buchan & Parker 2009).

Los principales subtipos de gránulos de RNA son:

Germinales: Cuyos componentes incluyen el material necesario para determinar el linaje de células germinales en los organismos en los que este linaje se especifica por preformación. Su nombre cambia de acuerdo con la especie: en *C. elegans* se denominan gránulos P. Sus componentes principales son helicasas de RNA, proteínas con dominios Tudor y proteínas de la familia PIWI (Reunov & Reunova 2016; Voronina et al. 2011).

Neuronales: Empaquetan y dirigen el mRNA al sitio donde la proteína debe ser producida (Anderson & Kedersha 2006; Krichevsky & Kosik 2001).

Somáticos: Se dividen en: i) cuerpos de procesamiento (P-bodies), que generalmente se encargan de degradar a los mensajeros; ii) cuerpos de almacenamiento, encargados de almacenar o transportar RNAs hasta el momento o lugar dónde sean requeridos y iii) gránulos de estrés, que protegen a los mRNAs de su degradación y previenen su traducción en condiciones estresantes (Anderson & Kedersha 2006; Buchan & Parker 2009).

En las células germinales del nematodo podemos encontrar varios tipos de gránulos, no solamente los germinales (Figura 2). Es difícil determinar cada tipo debido a que varios de los componentes se comparten entre distintos tipos de gránulos (Wood et al. 2016).

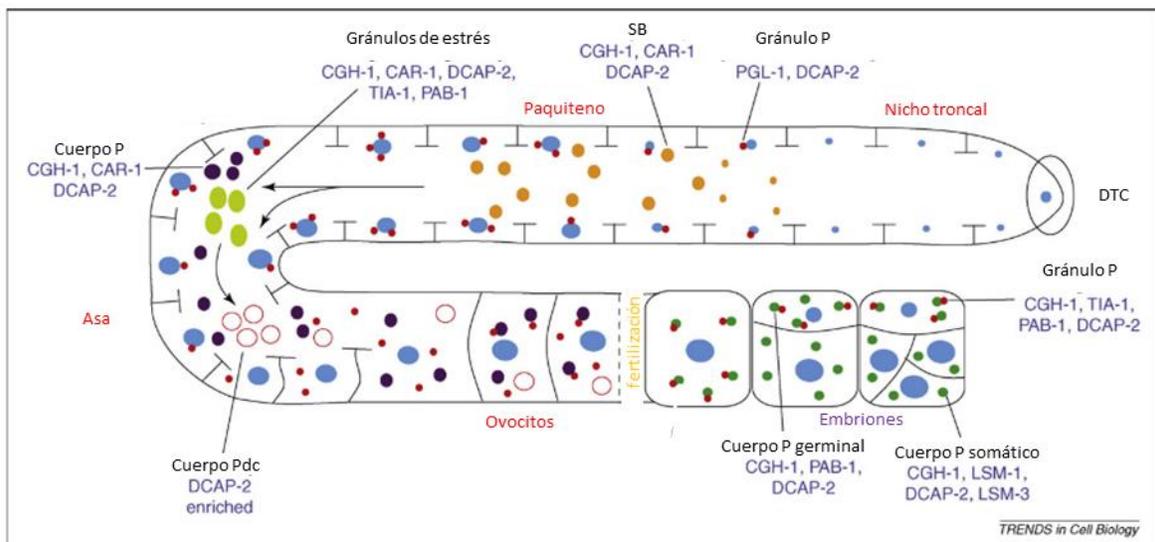


Figura 2. Esquema de los gránulos de RNA en la gónada del nematodo. Se muestran los núcleos en azul, los gránulos P en rojo, cuerpos de almacenamiento (SB por sus siglas en inglés) en naranja, gránulos de estrés en verde claro, cuerpos de procesamiento germinales en morado, cuerpos de procesamiento tipo somáticos en círculos huecos rojos y otros gránulos somáticos en verde oscuro (modificado de Rajyaguru & Parker, 2009).

Tipo de gránulo	Función
Gránulos germinales	Protegen y almacenan RNAs y proteínas necesarias para la determinación, diferenciación y mantenimiento de la línea germinal .
Gránulos P	Gránulos germinales de <i>C. elegans</i> . Se denominan P porque se segregan a la célula posterior en la primera división celular.
Cuerpos de almacenamiento (SB)	Gránulos pequeños que almacenan mRNA antes de su traducción.
Gránulos de estrés	Gránulos que se forman únicamente durante un estrés y al término de este se disgregan. Pueden formarse <i>de novo</i> o a partir de un cuerpo de almacenamiento. Llegan a ser los gránulos más grandes.
Cuerpos de procesamiento (P)	Gránulos que se encargan de degradar el RNA y se han observado varios subtipos.
Cuerpos P dc (<i>decaping</i>)	Su principal función es eliminar el capuchón que marca los mRNAs.
Cuerpo P g (germinal)	La diferencia entre estos dos tipos de gránulos son que los cuerpos P germinales poseen proteínas de los gránulos germinales mientras que los somáticos no.
Cuerpo P (somático)	

Tabla 1. Tipos de gránulos de RNA. Se detallan los tipos de gránulos que se mencionan en este escrito y sus respectivas funciones.

En el laboratorio hemos estudiado principalmente a los gránulos de estrés de la línea germinal y los podemos clasificar, de acuerdo a su tamaño y localización, en tres tipos: i) aquellos que se forman en el canal central de la gónada, ii) los que se forman en las células germinales del sincicio y iii) los que se forman en los ovocitos. Para observarlos hemos usado dos herramientas un transgénico que expresa la proteína de fusión TIAR-1::GFP y anticuerpo contra CGH-1 (Figura 3) (Huelgas-Morales et al. 2016).

CGH-1 es una helicasa de RNA con caja DEAD. Puede encontrarse asociada a cuerpos P, gránulos de estrés y gránulos P (Boag et al. 2008a; Navarro et al. 2001; Noble et al. 2008; Wood et al. 2016). Participa tanto en la regulación de la traducción como en degradación

de los mismos dependiendo de las proteínas con las que se encuentre asociada (Boag et al., 2008b; Rajyaguru & Parker, 2008). En 2001 se describió que es esencial para la formación de gametos en la gónada de *C. elegans* (Navarro et al. 2001a).

TIAR-1 es una proteína ortóloga a las proteínas TIA-1 (*T cell Intracelular Antigen 1*) y TIAL-1 (TIA protein like 1) en humanos. El gen *tiar-1* está involucrado en la determinación del tiempo de vida, la locomoción, la reproducción (Silva-García & Rosa 2013; Huelgas-Morales et al. 2016; Rousakis et al. 2014; Shaye & Greenwald 2011). Se predice, de acuerdo a su secuencia, que *tiar-1* posee dominios de unión a DNA y dominios QN que le confieren la propiedad de agregarse con otras proteínas que también los posean (Shaye & Greenwald 2011). Tanto en mamíferos como en nematodos se ha observado que se asocian a gránulos de estrés (Huelgas-Morales et al. 2016; Kedersha et al. 1999; Kedersha et al. 2000).

Huelgas-Morales describió que TIAR-1 está presente en los gránulos P y los gránulos de estrés en la gónada de *C. elegans* (Figura 3), y que los gránulos de estrés colocalizan con los de CGH-1. Realizó tinciones contra CGH-1 en animales silvestres y animales con una delección del gen *tiar-1* (*tn1543*), después de haberlos estresado por tres horas de choque de calor o seis horas de ayuno. Estos animales no presentaron formación de gránulos de estrés, demostrando que *tiar-1* es necesario para la formación de gránulos de estrés en la gónada del nematodo (Figura 4).

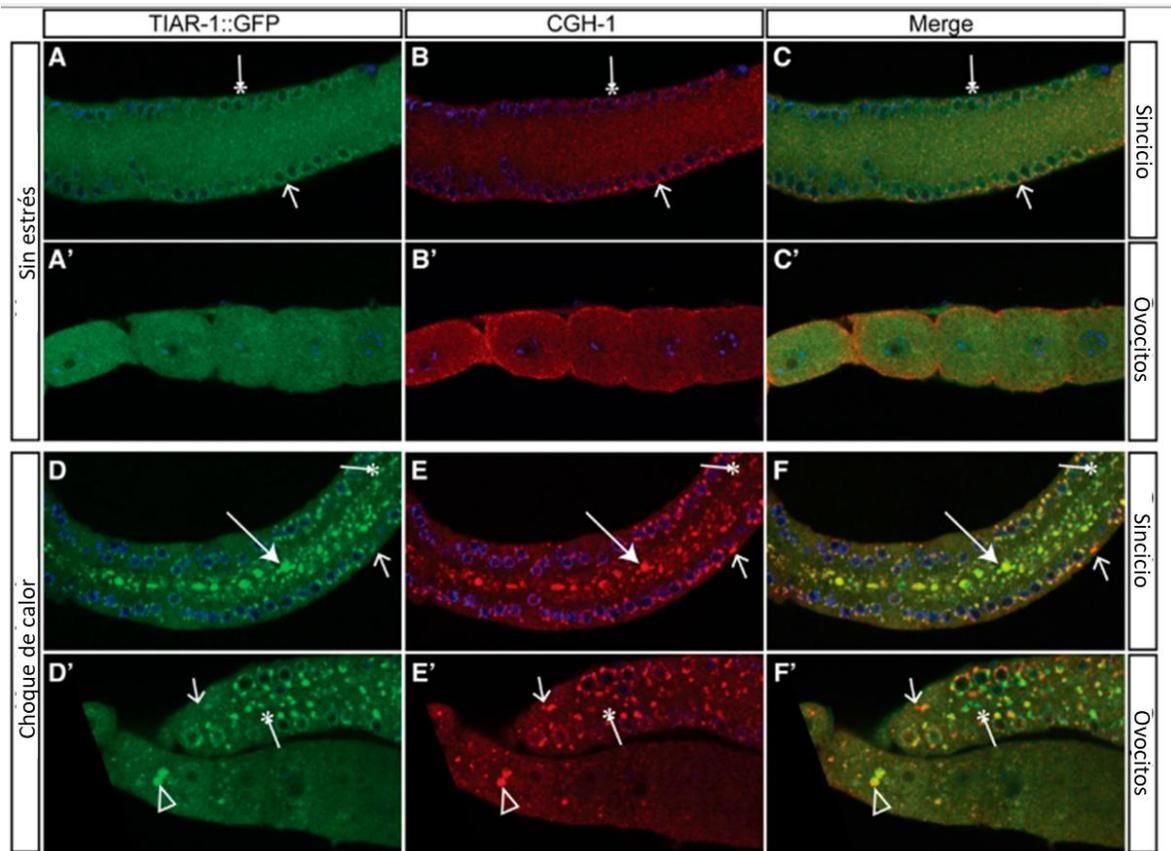


Figura 3. Gránulos de estrés en la gónada del nematodo. Fotografías representativas de gónadas disectadas de animales *tiar-1::gfp* (verde) adultos de un día a los que se les realizó una inmunotinción contra CGH-1 (rojo). Se enfoca la gónada distal (A-F) u ovocitos (A'-F') de animales sin estresar (A-C y A'-C') y después de un choque de calor (3 horas a 31°C) (D-F y D'-F'). La tercera columna muestra el empalme (modificada de Huelgas-Morales 2016).

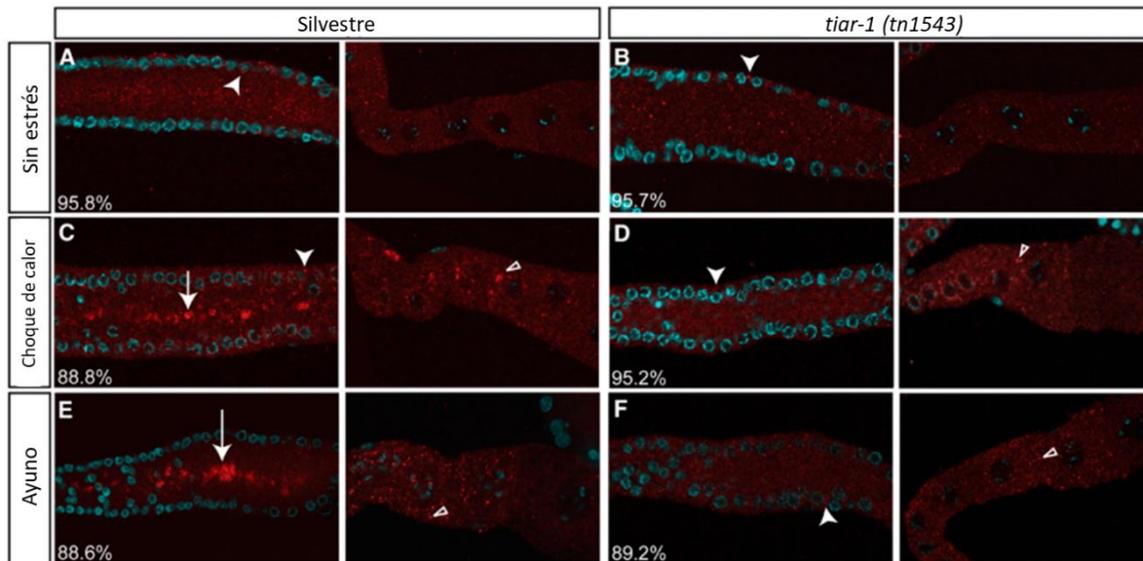


Figura 4. Los gránulos de estrés en la gónada del nematodo dependen de *tiar-1*. Fotografías representativas de gónadas disectadas de animales *tiar-1(tn1543)* adultos de un día a los que se les realizó una inmunotinción contra CGH-1 (rojo) y se tiñeron los núcleos con DAPI (azul). Se enfoca la gónada distal (columna uno y tres) y los ovocitos (columna dos y cuatro) de animales sin estresar (A y B), después de un choque de calor (3 horas a 31°C) (C y D) y después de un ayuno de seis horas (E y F) (modificada de Huelgas-Morales 2016).

GLA-3, de *germ line apoptosis defective*, es otra proteína de unión a RNA. Su homóloga en humano es la proteína tris tetraprolina (TTP). Se ha visto asociada a gránulos de estrés en mamíferos (Stoecklin G. et al., 2004; Kedersha et al., 2005). En *C. elegans*, una mutante en el gen *gla-3* evita que se formen gránulos de estrés. Esto lo demostró Dámazo-Hernandez en su tesis de licenciatura, donde sometió a estrés por choque de calor o ayuno a animales con distintos alelos mutantes del *gla-3*. Encontró que el alelo mutante *gla-3(op312)*, una delección parcial del gen *gla-3*, es la más penetrante ya que al teñir a los animales estresados contra CGH-1 no se observa la formación de gránulos de estrés (Figura 5) (Dámazo-Hernández 2017).

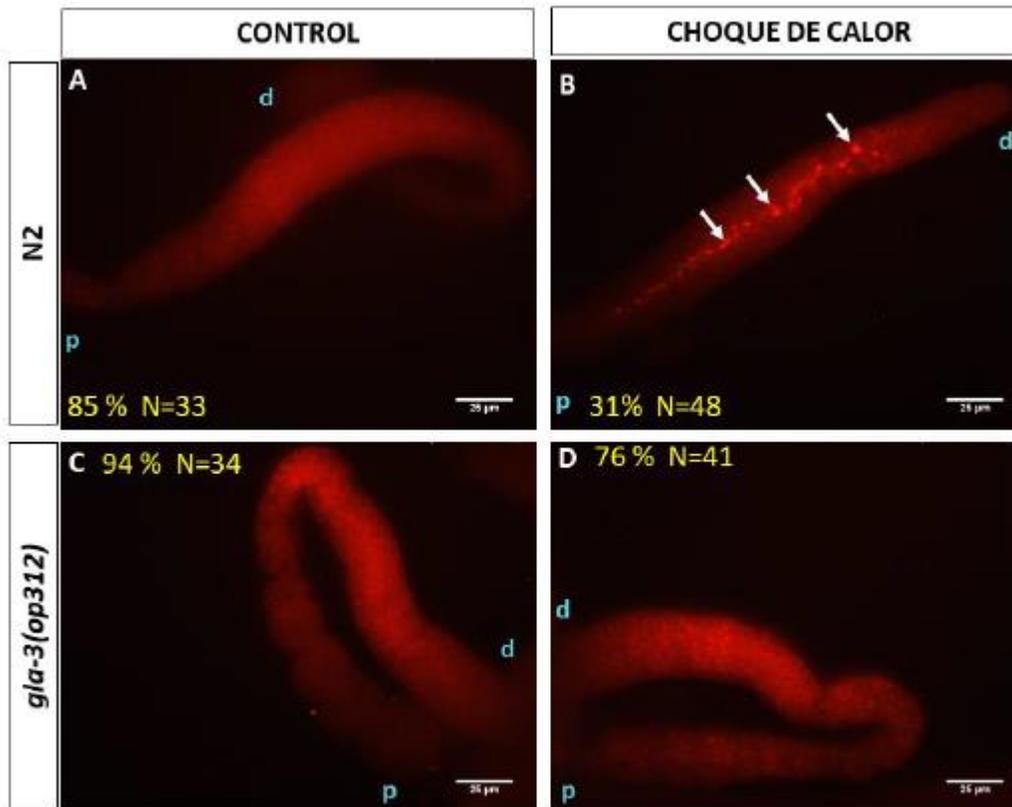


Figura 5. Los gránulos de estrés en la gónada del nematodo dependen de *gla-3*. Fotografías representativas de gónadas disectadas de animales silvestres (N2) y *gla-3(op312)* adultos de un día a los que se les realizó una inmunotinción contra CGH-1 (rojo). Se muestran animales sin estresar (A y C) y después de un choque de calor (3 horas a 31°C) (B y D). d=distal y p=proximal (modificada de Dámazo-Hernández).

Se han propuesto varios mecanismos para la nucleación de los gránulos de RNA. Los dos principales corresponden a i) interacciones de baja especificidad entre RNAs y proteínas y ii) nucleación mediada por organelos, particularmente la mitocondria. Esto se basa en la evidencia observacional: los gránulos generalmente se forman cerca de las mitocondrias en estructuras que se denominan cemento intermitocondrial (Morrioni et al. 2008). Además, algunas proteínas mitocondriales se requieren para la formación de gránulos germinales durante la espermatogénesis del ratón (Jackson et al., 2010; Protter & Parker, 2016)

La mitocondria en *C. elegans*

La mitocondria es un organelo compuesto de una membrana externa, un espacio intermembranal, una membrana interna con pliegues internos que se denominan crestas y una matriz donde podemos encontrar el DNA mitocondrial en forma de cromosoma circular y la maquinaria de expresión génica (Figura 6). La mitocondria tiene un origen endosimbiótico y se encuentra presente en prácticamente todos los eucariontes. Aquellos que no las tienen, parecen haberlas perdido (Karnkowska et al. 2016). La mayoría de los genes del endosimbionte original migraron al núcleo y los pocos codificados por el DNA mitocondrial corresponden, en el caso de *C. elegans*, a dos RNAs ribosomales, 22 tRNAs y 12 subunidades de la cadena de transporte de electrones (ETC) (Nicholls & Ferguson 2013).

Entre los procesos en los que está involucrado este organelo se encuentran el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la formación de centros hierro-azufre, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la fosforilación oxidativa, el metabolismo de lípidos, la señalización por Ca^{++} , la apoptosis, la respuesta a estrés, y posiblemente, la diferenciación y la meiosis (Bennett & Kaeberlein 2014; Cao & Chen 2009; Chiaratti et al. 2018; Collins et al. 2012; Nicholls & Ferguson 2013; Yasuda et al. 2011). Ejemplos de su relevancia son que mutaciones en genes mitocondriales, ya sea codificados en núcleo o mitocondria, dan lugar a enfermedades y que el envejecimiento siempre va asociado con disfunción mitocondrial (Feichtinger et al. 2014; Ishii et al. 2016; Yasuda et al. 2006).

El proceso más estudiado es la fosforilación oxidativa; que es el proceso de transporte de electrones (por la cadena de transporte de electrones (ETC)) acoplado a la

síntesis de ATP por la ATP sintasa. La ETC está formada por cinco complejos multiprotéicos. Los complejos I (NADH-CoQ oxidoreductasa) y II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa) usan como sustratos al malato o succinato, respectivamente, para transferir electrones a la coenzima Q, la cual a su vez pasa sus electrones al citocromo c por la actividad del complejo III (CoQ-citocromo c oxidoreductasas), en el complejo IV (Citocromo c oxidoreductasa) estos electrones llegan a su aceptor final, el oxígeno. Este proceso genera una fuerza protón motriz y, finalmente, es el complejo V (ATP sintetasa) el que acopla la translocación de estos protones a la matriz con la síntesis de ATP (Nicholls & Ferguson 2013).

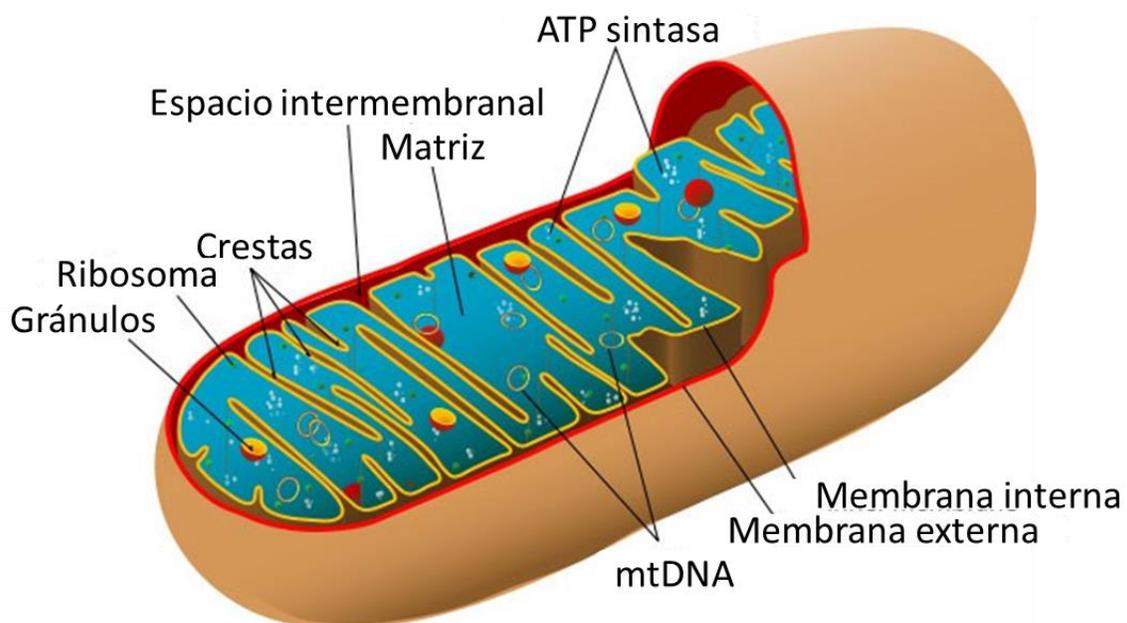


Figura 6. Esquema de una mitocondria. Se muestra en rojo la membrana externa mitocondrial, en amarillo la membrana interna mitocondrial y en azul la matriz mitocondrial. Se señalan también el espacio intermembranal, las crestas de la membrana interna, los aros que representan el DNA mitocondrial, los gránulos donde se regula la expresión génica y partículas de la ATP sintetasa (modificada de www.umdf.org/what-is-mitochondrial-disease).

De manera particular, experimentos de RNAi sugieren que el complejo III está involucrado en la regulación del tiempo de vida en *C. elegans* (Chen et al. 2003). Mientras que el complejo IV participa en la resistencia a estrés térmico (Suthammarak et al. 2009). Sumado a esto, el complejo IV juega un papel en la dinámica de fusión-fisión mitocondrial (Lee et al. 2003). Estos datos pueden estar relacionados con el hecho de que, en el caso del nematodo, gran parte de la biogénesis mitocondrial se lleva a cabo durante la ovogénesis y es importante una adecuada regulación de la dinámica mitocondrial para la apropiada segregación de mitocondrias al momento de celularizar al ovocito (Mishra & Chan 2014; Tsang & Lemire 2002).

En la mitocondria cuando un electrón se fuga del complejo I o II de la ETC, se une a un oxígeno, el cual es parcialmente oxidado produciendo anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que posteriormente se convierte en peróxido (H_2O_2) por una superoxido dismutasa (SOD) y finalmente es el peróxido se convierte en agua (H_2O) por una catalasa u otras enzimas. A estas y otras moléculas se les denominan ROS. Por mucho tiempo se consideró que, se generaban ROS únicamente como producto secundario de la fosforilación oxidativa, trabajos posteriores han demostrado el papel de éstas como mediadores celulares en la regulación fisiológica celular y no necesariamente como agentes patológicos si no como moléculas señal que median mecanismos para contender con el estrés (Collins et al. 2012; Sies 2017).

Las ROS son moléculas que tienen un par (o más) de electrones no apareados lo que les da dos características principales: alta reactividad y gran inestabilidad (Chen et al. 2003). Estas moléculas tienen un tiempo de vida sumamente corto. Cuando se producen en

grandes cantidades generan daños en otras moléculas como lípidos, proteínas e incluso el DNA. Todas las células poseen mecanismos para contender contra las ROS, pero en ciertas condiciones se produce un desequilibrio bioquímico del estado redox denominado estrés oxidante que tiene como consecuencia los efectos tóxicos (Hsieh & Yang 2013).

Además de la producción de ROS, las mitocondrias coordinan y desencadenan otras vías de respuesta a estrés dependientes de la intensidad del daño mitocondrial. Cuando el daño es menor se activa la vía mitocondrial de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR^{mt}) la cuál estimula la transcripción de diversas chaperonas y proteasas, este proceso es de suma importancia para la protección contra la anoxia (Jovaisaite, Mouchiroud, & Auwerx 2014). Cuando el daño es intermedio se estimula la mitofagia para obtener nutrientes de las proteínas ya sintetizadas, disminuir la actividad de la célula y limitar la producción de ROS. En mamíferos, un daño en la mitocondria muy grave o prolongado, produce que se fragmenten las mitocondrias y se encargan de activar la vía intrínseca de apoptosis (Bennett & Kaeberlein 2014; Jagasia 2005; Runkel, Baumeister, & Schulze 2014).

Otro tema que ha sido de gran interés en los últimos años es precisamente la dinámica de la morfología mitocondrial. Las mitocondrias están dispuestas en redes que pueden variar en tamaño y forma dependiendo de los requerimientos energéticos, la fase del ciclo celular, el estado de diferenciación, la edad del individuo, entre otros (Salazar-Roa & Malumbres 2017). Estos cambios se regulan por los procesos de fusión y fisión mitocondrial, en donde participan GTPasas de la familia de dinamina: EAT-3, FZO-1 y DRP-1 (Figura 7) (van der Blik, Shen, & Kawajiri 2013; Nicholls & Ferguson 2013; Scott & Youle 2010).

En *C. elegans* la fusión de las mitocondrias depende de las proteínas FZO-1 en la membrana externa y EAT-3 en la membrana interna. Puede ocurrir cuando la demanda energética aumenta. Es benéfica ya que permite la complementación de componentes funcionales entre mitocondrias parcialmente dañadas. También funciona para proteger las mitocondrias de macro-autofagia en condiciones de ayuno, promoviendo la fusión e inhibiendo la fisión, convirtiendo a las mitocondrias en túbulos alargados difíciles de degradar (Nicholls & Ferguson 2013; Salazar-Roa & Malumbres 2017).

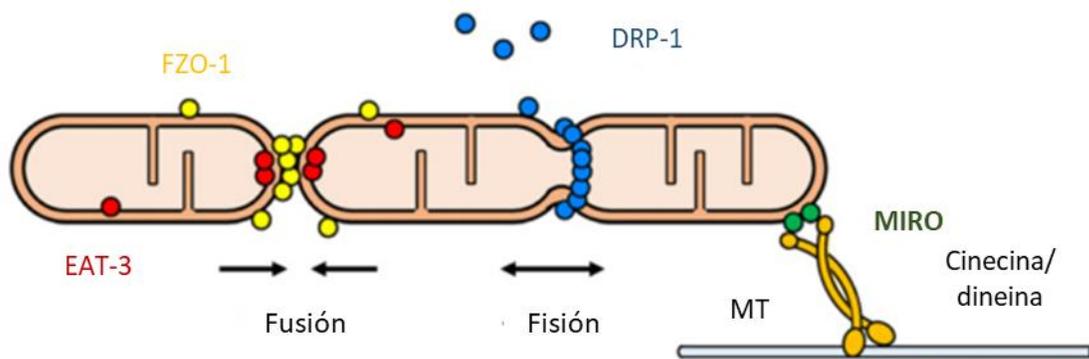


Figura 7. La dinámica mitocondrial. La fusión de la membrana externa mitocondrial es mediada por FZO-1 (círculos amarillos), mientras que la fusión de la membrana interna mitocondrial es mediada por EAT-3 (círculos rojos). El proceso de fisión es efectuado por la constricción de un anillo contráctil de DRP-1 (círculos azules). Las mitocondrias se desplazan sobre microtúbulos (MT) gracias a los complejos MIRO que interaccionan con cinesinas y dineínas (modificada de Nicholls & Ferguson, 2013)

La fisión se lleva a cabo por proteínas adaptadoras en la membrana mitocondrial como FIS-1 y por un anillo que constriñe y separa las mitocondrias formado por DRP-1 (van der Bliek et al. 2013; Horbay & Bilyy 2016; Ploumi, Daskalaki, & Tavernarakis 2017; Scott & Youle 2010). Se desconoce si existen otras proteínas efectoras de este proceso en *C. elegans*. La fisión permite la adecuada segregación mitocondrial al momento de una división

celular, facilita el engullimiento de mitocondrias defectuosas o dañadas y generalmente ocurre en condiciones donde la demanda de energía es baja (Anding & Baehrecke 2017; Riley & Tait 2016).

La pérdida de *drp-1* en nematodos acorta el tiempo de vida y los hace más sensibles a las reducciones de O₂ (Breckenridge et al. 2008). Particularmente en la línea germinal, en experimentos con ratones se ha observado que deleciones de los genes involucrados en la dinámica de fusión-fisión mitocondrial altera no solamente la morfología mitocondrial, sino también la de otros organelos como RE, peroxisomas y vesículas de secreción, resultando en una baja viabilidad del gameto (Udagawa et al. 2014; Wakai et al. 2014). La fisión mitocondrial dependiente de DRP-1 en ovocitos de ratón también puede ser inducida por la UPR^{mt} (Florey et al. 2011; Kim 2011).

Otro aspecto que regula la morfología mitocondrial es la composición lipídica de las membranas mitocondriales. Una de las reguladoras de esto es la fosfolipasa mitocondrial mitoPLD, o PLD6. MitoPLD es una fosfolipasa que se encuentra anclada a la membrana mitocondrial externa (OMM) por su carboxilo terminal y su dominio catalítico apunta hacia el citosol. Se considera que regula la composición lipídica de la OMM al ser una hidrolasa de cardiolipina favoreciendo la fisión mitocondrial (Scott & Youle 2010). En experimentos de RNAi para mitoPLD se observa que las células poseen una red mitocondrial fragmentada. La sobreexpresión de mitoPLD promueve la fusión mitocondrial (L. Huang et al. 2011; Watanabe et al. 2011; Zhang et al. 2016).

Sin embargo, la mitoPLD también pertenece a una familia de proteínas con actividad de nucleasa y estudios bioquímicos han comprobado ésta actividad enzimática, al menos *in vitro* (H. Huang et al. 2011). Ésta parece ser otra vía de señalización, en la que participa mitoPLD, que regula el equilibrio de fusión-fisión mitocondrial en mamíferos: Mfn/mitoPLD/Lipina/PKC/Drp-1 (van der Bliek et al. 2013).

El movimiento y localización mitocondrial se da gracias a su anclaje al citoesqueleto por medio de cinesinas y dineínas que interaccionan con las mitocondrias través de proteínas adaptadoras llamadas Miro y Milton. Estas proteínas mantienen también los contactos entre retículo endoplásmico (ER) y mitocondria (Grimm 2012). También podemos encontrar que su anclaje al núcleo se da gracias a la proteína ANC-1 (Bone 2016). En los últimos años se ha estudiado la relación entre las mitocondrias y otros organelos, principalmente el RE. Se han descrito estructuras de contacto como membranas asociadas a mitocondrias (MAMs) y estructuras de encuentro entre mitocondrias y retículo endoplásmico (ERMES), cuyas funciones incluyen el flujo de proteínas y lípidos entre ambos organelos, regulación de la morfología mitocondrial y formar microdominios de señalización que dirigen la respuesta a estrés mediada por la mitocondria (Chipuk et al. 2015; Giorgi et al. 2009; Grimm 2012; Mishra & Chan 2014; Murley & Nunnari 2016).

Por otro lado, la demanda de energía también puede alterar el plegamiento y la cantidad de crestas mitocondriales. El complejo de sitios de contacto mitocondriales (MICOS) es un conjunto de proteínas encargado de mantener abiertas las uniones entre las crestas (Pfanner et al. 2014).

Por todo lo anterior, es importante que existan mecanismos de control de calidad de las mitocondrias (). Así, la degradación de mitocondrias se da de forma selectiva. Por ejemplo, las mitocondrias que pierden el potencial de membrana, pierden la habilidad de fusionarse, protegiendo así que el daño se expanda y promoviendo que estas mitocondrias sean degradadas por mitofagia. Existen programas en el desarrollo que degradan de forma selectiva las mitocondrias paternas (Zhou 2011). Y en las neuronas las mitocondrias dañadas son expulsadas por medio de vesículas llamadas exosferas (Melentijevic et al. 2017).

C. elegans es un buen modelo para estudiar la función mitocondrial gracias al alto grado de conservación de sus proteínas mitocondriales con respecto a las del mamífero y a las diversas ventajas que ofrece el modelo, mencionadas al inicio de este escrito. A pesar de ello, una dificultad con la que nos encontramos es que los protocolos de aislamiento de mitocondrias en el nematodo, tienden a recuperar una masa baja de mitocondrias en preparaciones que llegan a estar contaminadas, esto se atribuye a que debe pasar por tratamientos muy agresivos para romper la cutícula que cubre el nematodo, por lo que preferencialmente se puede aprovechar para estudios *in vivo* (Grad, Sayles, & Lemire 2007).

Al comparar las mitocondrias de *C. elegans* con respecto a las de mamífero (específicamente humano) encontramos que poseen un gen menos en su mtDNA (la subunidad ATP8 del complejo V), contienen menos copias de mtDNA, usan preferencialmente Q9 en vez de Q10, pueden llevar a cabo el ciclo del glioxalato, pueden respirar con malato como sustrato, presentan diferencias de sensibilidad a algunos fármacos, la cardiolipina, un lípido específico de mitocondria que estabiliza proteínas

mitocondriales y afecta las características de las membranas, parece ser necesario únicamente en la gónada (Nicholls & Ferguson 2013).

Se han desarrollado varias técnicas para estudiar los procesos mitocondriales y los efectos de sus alteraciones. Por ejemplo: técnicas que involucran medir la tasa del consumo de oxígeno (OCR), es decir la cantidad de oxígeno (pmol O₂) consumido por unidad de tiempo (minuto), normalizado con respecto a la cantidad de proteína de la muestra (µg de proteína) o por el número de gusanos. Cabe mencionar que lo último es aplicable únicamente a los casos en los que se realizan mediciones de respiración en nematodo completo (Daniele et al. 2016; Nicholls & Ferguson 2013).

Para estudiar con detalle el funcionamiento de cada uno de los complejos de la ETC, se pueden utilizar compuestos capaces de inhibirlos. Sin embargo, debido a la baja permeabilidad del nematodo esta estrategia experimental no ha resultado tan útil. Para estudiar la función mitocondrial en este modelo, se ha empleado el RNAi, una técnica que nos permite reducir la cantidad de transcritos de un gen específico. Sin embargo, se ha observado que no existe una correlación directa entre la disminución en la cantidad de proteína detectada y las alteraciones producidas por esta disminución (Ohkumo et al. 2008). En general, los fenotipos que se han observado con esta aproximación corresponden a alteraciones en el tiempo de vida, el número de descendencia viable, la tasa de crecimiento, la variación en la sensibilidad a anestésicos, la variación térmica estrés oxidante y en menor medida cambios en la morfología mitocondrial (Ichimiya et al. 2002; Lee et al. 2003).

Relación entre gránulos de RNA y mitocondrias

En muchos animales la determinación de las células germinales se da con la segregación diferencial de contenido citoplasmático denominado plasma germinal. En *C. elegans* éste se compone únicamente de gránulos P. En otros animales como *Xenopus*, rata y ratón también las mitocondrias forman parte del citoplasma germinal, así como gránulos de RNA cuyo nombre depende de la especie y la etapa de diferenciación del gameto. Estos dos organelos suelen asociarse entre sí, de hecho a los gránulos germinales se les ha llegado a llamar cemento intermitocondrial (ICM o *nuage*) (Morrone et al. 2008; Reunov & Reunova 2016; Voronina et al. 2011). Aunque se ha estudiado mucho sobre el papel de los gránulos en la línea germinal, se sabe poco del papel de las mitocondrias.

En *Drosophila* se ha observado que proteínas de los gránulos germinales (AGO-3 y Zuc) coordinan la localización de la nube mitocondrial. Estas proteínas también se encargan de regular el paso de otras proteínas entre estos gránulos y mitocondrias, estableciendo una interacción funcional entre estos dos organelos (Huang et al. 2014).

En *Xenopus* el transporte de mitocondrias vía microtubulos participa en la agregación de los gránulos germinales de las células germinales primordiales (PGCs). Sin embargo, las moléculas que conectan a estos dos organelos no se han identificado (Tada et al. 2016).

La mayoría de los estudios postulan que proteínas localizadas en la membrana externa mitocondrial participan en la biogénesis de piRNAs que se lleva a cabo en los

gránulos germinales (Honda et al. 2013; Ipsaro et al. 2012; Nishimasu et al. 2012; Pane, Wehr, & Schüpbach 2007; Shiromoto et al. 2013; Watanabe et al. 2011). Los piRNAs son un grupo de RNAs pequeños específicos de la línea germinal que se encargan del silenciamiento de transposones (Czech & Hannon 2016; Lim et al. 2013).

Una de las proteínas que más se ha estudiado es mitoPLD de mamíferos y su ortólogo en *Drosophila* Zuc. mitoPLD es una proteína con actividad de fosfolipasa y endonucleasa. Un mutante para su gen no es capaz de formar el ICM (H. Huang et al. 2011; Voronina et al. 2011; Watanabe et al. 2011). La formación del ICM puede medirse por la señalización de lípidos, particularmente el ácido fosfatídico (PA) y lisofosfatídico (LPA). Además, como se menciona en la sección anterior, se ha observado que mitoPLD/Zuc también tiene un papel en la regulación de la morfología mitocondrial al promover su fusión (H. Huang et al. 2011; Zhang et al. 2016).

En el trabajo de Huang se proponen dos actividades posibles de mitoPLD: i) Proveer de PA a partir de la hidrólisis de cardiolipina, posteriormente el PA se hidroliza por lipina-1 formando LPA. Estos lípidos se requieren para mantener la estructura del ICM; ii) un papel directo de la actividad de nucleasa para la generación de piRNAs. Aunque no descarta la posibilidad de que el procesamiento se dé por una proteína que requiera mitoPLD para ser reclutada (H. Huang et al. 2011).

Sumado a esto, ovocitos de ratones mutantes para mitoPLD no pueden terminar la meiosis. mitoPLD se expresa en la línea germinal tanto masculina como femenina, y, efectivamente, mutantes en este gen dejan que los transposones se expresen. En ausencia

de mitoPLD, tanto mitocondrias como componentes del ICM se localizan inapropiadamente (Watanabe et al. 2011).

En el genoma de *C. elegans* no parece haber un homólogo de mitoPLD. Sin embargo, un grupo propone a una glicerol-3 fosfato aciltransferasa mitocondrial (mt-GPAT) como aquella que nutre de LPA al sistema para su papel en la fusión mitocondrial, este grupo no analiza el efecto de mt-GPAT en gránulos de RNA (Ohba et al. 2013). GPAT de mamíferos sí se ha visto asociada a la biogénesis de piRNAs (Shiromoto et al. 2013).

Por último, no solo los gránulos germinales se relacionan con las mitocondrias. Un estudio demuestra en distintas líneas celulares (somáticas de mamífero) que la mayoría de los cuerpos P se encuentran en contacto con mitocondrias. Estos contactos son transitorios. Muchos de los cuerpos P que no están en contacto con mitocondrias eventualmente lo están. Además, un tratamiento con un inhibidor de la fosforilación oxidativa (CCCP) no cambia la frecuencia de los contactos mitocondria-cuerpo P, pero si reduce una de las funciones de estos: el silenciamiento de RNA (fisiológico). Esto se debe a que actividad mitocondrial se requiere para la formación de RISC (*RNA-induced silencing complex*) (L. Huang et al. 2011).

Planteamiento del problema

Los seres vivos estamos sujetos a diversos cambios ambientales que pueden ser independientes de nuestras actividades, pero debemos ser capaces de sobrellevarlos. En el caso de los animales, es de especial relevancia proteger a las células germinales, pues son ellas las que como linaje perdurarán dando lugar a la siguiente generación y es en ellas en quien recae la responsabilidad de preservar la especie. Para proteger a las células germinales se han desarrollado diversos mecanismos. En el caso de la línea germinal del *C. elegans* se han descrito: incremento en la apoptosis, la formación de gránulos de estrés y en esta tesis describimos el re-arreglo de la morfología mitocondrial. Si este cambio de estructura y localización tiene algún efecto positivo en la reproducción o supervivencia del nematodo es parte de lo que trataremos de responder y discutir en este proyecto, en particular si tiene alguna relación con los gránulos de estrés, ya que estos dos se forman en el mismo compartimento del sincicio y se ha visto que estos dos organelos pueden estar relacionados.

Hipótesis

Los agregados mitocondriales que se forman en el canal central de la gónada durante el estrés son necesarios para la formación o posicionamiento de los gránulos de estrés que se forman en el mismo sitio.

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es determinar si la formación de los gránulos de estrés y la agregación de las mitocondrias en el centro de la gónada son procesos interdependientes.

Objetivos particulares

- Describir la morfología mitocondrial a lo largo de la gónada de *C. elegans* en condiciones basales y al ser sometidos a estrés.
- Determinar si el cambio en la morfología mitocondrial depende de la formación de gránulos de estrés al silenciar de forma independiente los genes *tiar-1* y *gla-3*, necesarios para la formación de gránulos de estrés.
- Estudiar si el proceso de agregación de mitocondrias en condiciones de estrés depende de la fusión o la fisión mitocondrial al silenciar por medio de RNAi a los genes *fzo-1* y *drp-1*, de forma independiente, los cuales son necesarios para que haya fusión y fisión mitocondrial respectivamente.

Materiales y métodos

Materiales biológicos

Nombre	Genotipo	Referencia
N2	Silvestre	(Brenner 1974)
RN015	<i>[Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3utr; Cb-unc-119 (+)]</i> II	(Fernández-Cárdenas et al. 2017)
DG3922	<i>tiar-1(tn1545[tiar-1::s::tev::GFP])</i> II	(Huelgas-Morales et al. 2016)
RN079	<i>[Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3utr; Cb-unc-119 (+)]</i> II; <i>tiar-1(tn1545[tiar-1::s::tev::GFP])</i> II	Este trabajo
WS2973	<i>gla-3 (op312)</i> I	(Kritikou et al. 2006)
RN80	<i>gla-3 (op312)</i> I; <i>[Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3utr; Cb-unc-119 (+)]</i> II	Este trabajo
DG3929	<i>tiar-1(tn1543[loxP::Cbr-unc-119(+)::loxP])</i> II	(Huelgas-Morales et al. 2016)
RN078	<i>[Pmex-5::tomm-20::mcherry::tbb-2 3utr; Cb-unc-119 (+)]</i> II; <i>tiar-1(tn1543[loxP::Cbr-unc-119(+)::loxP])</i> II	Este trabajo
CU5991	<i>fzo-1 (tm1133)</i> II	(Breckenridge et al. 2008)

Tabla 2. Cepas de *C. elegans* utilizadas para los experimentos desarrollados en esta tesis.

Nombre	Genotipo	Uso	Referencia
OP50	<i>E. coli</i>	Mantenimiento de cepas	(Brenner 1974)
HT115	<i>E. coli [F-, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, rnc14::Tn10(DE3 lysogen: lavUV5 promoter -T7 polymerase)]</i>	Experimentos de RNAi	

Tabla 3. Cepas de *E. coli* utilizadas para los experimentos desarrollados en esta tesis.

Mantenimiento de cepas

Las cepas de *C. elegans* fueron cultivadas (5 gusanos por caja) en medio NGM-lite (Nematode Growth Medium lite) el cual es una modificación del NGM original (Sun and Lambie 1997). El medio NGM-lite por cada litro contiene: 2g de NaCl, 4g de bacto triptona, 3g de KH_2PO_4 , 0.5g de K_2HPO_4 , 20g de agar y 8mg de colesterol. Una vez preparado el medio se esterilizó, se colocó en cajas de Petri (60 mm de diámetro) y se dejó secar una noche. Al día siguiente fue inoculado con *E. coli* de la cepa OP50, la cual sirve como alimento a los nematodos. Las bacterias OP50 provienen de un cultivo de toda la noche en medio Luria Bertani (LB) con de estreptomina, el cual contiene 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 5g de NaCl y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina. El cultivo se mantuvo en agitación a 37°C toda la noche. Las cajas de NGM con OP50 fueron utilizadas inmediatamente o almacenadas a 4°C hasta por tres semanas. Las cepas fueron obtenidas del CGC o del laboratorio y se mantuvieron a 20°C o 24°C de acuerdo a las indicaciones de cada cepa. Bajo un microscopio Nikon SMZ745 se observaron a los animales y se manipularon con ayuda de un alambre de platino acoplado a una pipeta Pasteur de vidrio (Brenner 1974).

Inducción de estrés

Ayuno: Los animales hermafroditas adultos de un día fueron colocados, uno a uno con el asa de platino, sobre NGM-lite en una caja sin comida, donde se limpian de residuos de bacterias, posteriormente se colocan en una segunda caja sin comida, donde permanecen por 6 horas antes de ser observados al microscopio o teñidos (Salinas et al. 2006).

Choque de calor: Los animales hermafroditas adultos de un día fueron colocados sobre NGM- lite con bacterias en una caja de 30mm, la cual fue sellada con parafilm. La caja se colocó en

un baño de agua de temperatura controlada a 31°C durante 3 horas. Para observar la morfología mitocondrial se montan y observan inmediatamente. Para las tinciones contra CGH-1, son fijados y teñidos inmediatamente (Salinas et al. 2006).

En cada caso los animales del grupo control fueron obtenidos del mismo lote que el experimental, siendo de la misma edad, ya que ambos fueron sincronizados al mismo tiempo y se mantuvieron a 20°C con comida.

Inmunofluorescencia contra CGH-1

Para evaluar si se lleva a cabo la formación de gránulos de estrés en la gónada de *C. elegans* se realiza una inmunofluorescencia contra CGH-1 (Navarro et al. 2001b), una helicasa de RNA que funciona como marcador de gránulos de RNA. El método fue descrito previamente por Navarro et al en 2001.

Una vez terminadas las condiciones a evaluar se colocaron aproximadamente 30 animales sobre un cubreobjetos con 30µl del amortiguador M9, el cual contiene: 6g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 5g de NaCl y 0.25g de MgSO₄ por litro. En esa solución se disecaron las gónadas. Después se colocó el cubreobjetos sobre un portaobjetos, que había sido cubierto con poli-lisina. Posteriormente se sumergieron en nitrógeno líquido. Ya congeladas las muestras salieron del nitrógeno líquido, se retiró el cubreobjetos y se sumergieron en metanol a -20°C durante 1 minuto. Las placas se fijaron durante 30 minutos en una solución que contiene PBS, HEPES 0.08M (pH 6.9), MgSO₄, EGTA 0.8Mm y 3.7% de paraformaldehído. Una vez transcurrido el tiempo de fijado las muestras se sumergieron en PBT (PBS-Tween 0.5%) por 10 minutos. Posteriormente las muestras se colocaron en una cámara húmeda perfectamente nivelada y se bloquearon con 30µl de una solución de suero de cabra (suero

de cabra al 30% diluida en PBT con azida de sodio al 0.5%) por 30 minutos. Posteriormente se lavaron las placas al sumergirlas en PBT por 5 minutos y se colocaron en una cámara húmeda para incubar con el anticuerpo primario que reconoce a un epítotope de la proteína CGH-1 (hecho en rata, diluido 1:25 y disuelto en una solución de suero de cabra al 30% diluida en PBT y con azida de sodio al 0.5% hecho por Navarro et al. 2001) a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se colocaron las placas en PBT por 10 minutos para retirar el exceso de anticuerpo primario, y posteriormente se incuban con una solución que contiene el anticuerpo secundario (anti-IgG de rata conjugado con Cy3 hecho en burro (Jackson ImmunoResearch)) y DAPI (4',6-Diamino-2-fenilindol) a una concentración de 1 ng/ μ g, ambos diluidos 1:100 en una solución de suero de cabra (suero de cabra al 30% diluida en PBT con azida de sodio al 0.5%) por una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Al término del tiempo de incubación se lavan las placas con PBT por 10 minutos y después se agrega 10 μ L de solución de montaje Vectashield (Vector laboratories) sobre cada placa, se cubre con un cubreobjetos, se sellan con barniz y pueden ser observadas al microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

RNA de interferencia

En el laboratorio contamos con una biblioteca comercial de RNA de interferencia v1.1 (Open Biosystems). Las secuencias correspondientes a 11,000 genes se encuentran clonadas en el vector L4440 doble T7. Éstos están almacenados en la cepa HT115(DE3) la cual contiene la secuencia de la polimerasa T7 bajo la regulación del promotor *lac*, por lo que la producción del RNA de doble cadena es inducible por IPTG (Walhout et al. 2000).

Una vez seleccionada la clona que corresponde al gen de interés se crecen cultivos para aislar el plásmido por un kit de miniprep (Qiagen), se verifica por secuenciación que corresponda al

gen de interés. La clona verificada se crece a 37°C en medio 2XYT líquido con 100µg/mL de ampicilina y 12.5µg/mL de tetraciclina hasta una densidad óptica de 0.6. Se agrega IPTG para inducir la síntesis de dsRNA a una concentración final de 0.4mM. Se mantiene a 37°C durante dos horas. Finalmente, los cultivos son centrifugados a 7,000 g por 15 minutos a 4°C y el botón se resuspende en 10% del volumen original en medio para congelar compuesto de 50% medio 2xYT, 50% glicerol al 50%, tetraciclina, ampicilina e IPTG a las mismas concentraciones. En este punto se hacen alícuotas y se congelan a -70°C.

El día que se siembran los gusanos se descongela una alícuota, se centrifuga a 8,200 rpm 2 minutos, se retira el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 100µL de LB con ampicilina, tetraciclina e IPTG a las mismas concentraciones del cultivo original para sembrarse sobre cajas de NGM-LITE con ampicilina, tetraciclina e IPTG a las mismas concentraciones del cultivo original. Se siembran 5 gusanos y a los 4 días se analiza por medio de microscopía el fenotipo de la descendencia (Fire et al. 1998).

Cruzas para obtener genotipos compuestos

Para obtener combinaciones de mutantes y o transgénicos se aprovechó las cepas almacenadas en el CGC o producidas previamente en el laboratorio y se cruzaron.

Se obtuvo una población enriquecida en machos al someter a 15 gusanos en estadio larvario L4 a una temperatura de 29°C por 8 horas, tres días después se colectaron machos de la descendencia y se usaron para mantener una población enriquecida en machos, cruzándolos con la misma cepa, o para cruzar y obtener los genotipos deseados (Anderson, Morran, and Phillips 2010).

Para las cruces se usaron en cajas chicas (35mm) con poca comida, se colocaron 12 machos adultos con 3 hermafroditas L4 (generación P0). Los hijos (F1 heterocigos) fueron separados en la etapa L4 en 5 cajas chicas de forma individual (un gusano por caja). Después de dos días se tomó el F1 de cada caja y se verificó el genotipo correspondiente al macho, para las cepas de este trabajo los machos siempre fueron *tomm20::mcherry*, por lo que se buscó la fluorescencia correspondiente a *tomm20::mcherry*. De una de las cajas positivas se separaron 16 gusanos F2 en una caja nueva cada uno. Después de dos días se verificaron ambos fenotipos por fluorescencia y se corroboraron ambos genotipos ya fuera por fluorescencia o por PCR.

En el caso de la microscopía se verifica el genotipo del parental por frecuencias alélicas, contando la proporción de animales fluorescentes en 30 de los animales de la descendencia. Esto se repitió hasta que en una generación todos los animales expresaran la fluorescencia correspondiente a los genotipos buscados. Finalmente se repite una generación para corroborar el resultado.

En el caso de las PCRs los oligos fueron diseñados para obtener bandas de distintos tamaños de acuerdo al alelo que presentaba el gusano, lo que nos permitió distinguir entre homocigos silvestres (una banda), homocigos mutantes (una banda de menor tamaño para *gla-3(op312)* una deleción parcial o que no amplifica para *tiar-1 tn1543*) ya que es una deleción total) y heterocigos (ambas bandas para *gla-3*).

Finalmente, cuando una caja se consideraba homociga para los dos genes de interés se verificaba una generación más, se expandía, se congelaba y se usaba en los experimentos pertinentes.

Nombre	Secuencia	TM (en °C)	Tamaño del amplificado silvestre	Tamaño del amplificado mutante
<i>gla-3(op312)</i> FOR	CTCTCACCACCGGAGATCTC	63.9	1111pb	846pb
<i>gla-3(op312)</i> REV	AGCTAGTGTCAAGAGCGGC	62.4		
C18 FOR	CAGAAACTCTTGCTTGCTCGC	69	907pb	No amplifica
C18 REV	TCTTGTAGCCCAATTGGTACGG	68.5		

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en las PCRs para genotipificar las cruizas.

Microscopía

Para observar a los nematodos son colocados en colchones de agarosa al 2% en un portaobjetos, se colocan 30 uL de tetramizol a 10mM para inmovilizarlos. Para los conteos poblacionales se observan con un filtro de Nomarski ó epifluorescencia bajo un microscopio Nikon eclipse E600 acoplado a una cámara AxioCam MRc de Zeiss, las imágenes se obtuvieron con el software Axiovision de Zeiss. La adquisición de imágenes fue llevada a cabo utilizando el objetivo CFI Plan Fluor 40x de inmersión en aceite, con apertura numérica de 1.30 y una distancia de trabajo de 0.24mm.

Para obtener las imágenes de alta definición y determinar el estado morfológico de las mitocondrias y su localización con respecto a los gránulos se utilizó un microscopio confocal LSM800 de Zeiss con

el programa Zen2 blue edition de Zeiss. Las fotografías se obtuvieron con el objetivo Plan-APOCHROMAT 40x de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1.4 y una distancia de trabajo de 0.13mm y el objetivo Plan-APOCHROMAT 63x de inmersión en aceite, con una apertura numérica de 1.4 y una distancia de trabajo de 0.19mm.

Se utilizó el software FIJI para ajustar el brillo y contraste de las imágenes obtenidas (Schindelin et al. 2012).

Análisis estadísticos

Todos los datos se recolectaron en un archivo del programa GraphPad Prism 5. El mismo se usó para graficarlos y realizar los análisis estadísticos de comparaciones múltiples. Se realizó la prueba de ANOVA de dos vías seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni usando el programa GraphPad Prism versión 5 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Para los experimentos de estrés y RNAi se analizaron 30 animales por cada condición (con o sin estrés de cada genotipo) y se registró el promedio de individuos que presentaban agregados mitocondriales en cada experimento independiente. Los experimentos se repitieron tres veces. Exceptuando las curvas temporales y las observaciones en el confocal.

Resultados

La morfología mitocondrial en las células germinales del nematodo cambia en respuesta a estrés

En el laboratorio nos enfocamos en entender cómo se afectan las células germinales cuando los animales son sometidos a estrés. *C. elegans* nos permite analizar y estudiar todos los estadios de desarrollo de las células germinales gracias a que es transparente y en su etapa adulta produce ovocitos continuamente a partir de un nicho de células troncales germinales. En este trabajo nos enfocamos en estudiar cómo se afectan las mitocondrias de la línea germinal cuando los animales son sometidos a estrés. Para observar la morfología mitocondrial utilizamos el animal transgénico que contiene la construcción *tomm20::mCherry* (Figura 8). Dicha construcción se expresa específicamente en las mitocondrias de las células germinales (Fernández-Cárdenas et al. 2017).



Figura 8. Esquema que representa la construcción utilizada para visualizar las mitocondrias de las células germinales del nematodo. Esquema de la construcción que tiene el nematodo transgénico *tomm20::mcherry*: el promotor de mex-5 (*Pmex-5*), un gen codifica para una proteína de unión a RNA que participa en el desarrollo de las células germinales, la MTS (*Mitochondrial Targeting Sequence*) correspondiente a la proteína residente de mitocondria TOMM20 (*Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20*), la secuencia codificante de la proteína fluorescente roja mCherry y la secuencia 3'UTR del gen *tbb-2* (tubulina- β 2) que se traduce en toda la gónada. Fue generada por Emmanuel Villanueva para el artículo de Fernández-Cárdenas et al. 2017.

Para estudiar cómo se afecta la morfología mitocondrial al someter a los animales a estrés, expusimos a los animales *tomm20::mcherry* a dos tipos de estrés que se encuentran con frecuencia en la naturaleza: ayuno y choque de calor. En ambos casos los animales fueron sincronizados y mantenidos a 20°C en cajas con medio sólido con una capa de *E. coli* como alimento. Cuando llegaron a la etapa de adultos de un día se pasaron a cajas de medio sólido sin alimento y se mantuvieron ahí por 6 horas en el caso del ayuno; o bien, en el caso del choque de calor, la caja original con bacterias fue sellada con *parafilm* y colocada en un baño húmedo a 31°C por 3 horas. Después de esto montamos a los animales sobre un colchón de agarosa y los observamos. En los animales control las mitocondrias se distribuyen de manera homogénea exceptuando los núcleos, donde no hay mitocondrias. En la espermateca la fluorescencia siempre es más intensa, esto se lo atribuimos al número de espermias y que, al ser motiles, presentan un gran número de mitocondrias (Figura 9A). Nuestra primera observación de manera general es que la gónada de los animales estresados se ve un poco más delgada que la de los animales control; y la fluorescencia de mCherry es más intensa en el canal central de la gónada en los gusanos que fueron sometidos a un estrés (Figura 9B y 9C). A este fenómeno le llamamos agregación mitocondrial.

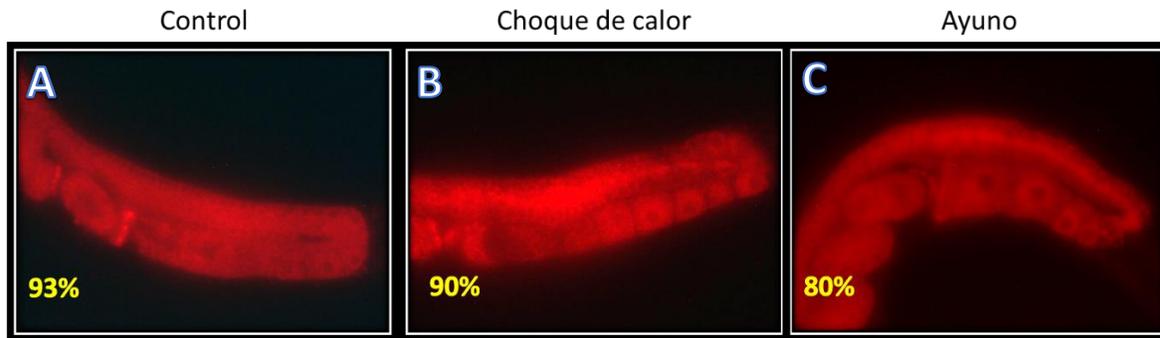


Figura 9. Formación de agregados mitocondriales en respuesta a estrés. Animales adultos de un día *tomm20::mcherry* fueron A) mantenidos en condiciones control, B) expuestos a choque de calor (31°C por 3 horas) o C) ayuno (sin alimento por 6 horas). Posteriormente fueron montados en colchones de agarosa y observados al microscopio de epifluorescencia para evaluar la estructura de la red mitocondrial. Las imágenes son representativas del porcentaje (en amarillo) de animales con ese fenotipo. Se realizaron tres replicados con una N de 30 animales por grupo para un total de 90 animales analizados.

Como no había sido anteriormente descrita la morfología mitocondrial de las células germinales del nematodo adulto, nos dimos a la tarea de describirla. En particular de animales controles y de aquellos que fueron sometidos a choque de calor. Para esto utilizamos el transgénico *tomm20::mcherry* y el microscopio confocal LSM800 de Zeiss. En la figura 10 se muestra una representación de la gónada que resalta las regiones a las que nos referimos en este trabajo (Figura 10A) y un esquema de un ovocito con los morfotipos considerados: mitocondrias reticulares (Figura 10B), alargadas (Figura 10C) o fisionadas (Figura 10D).

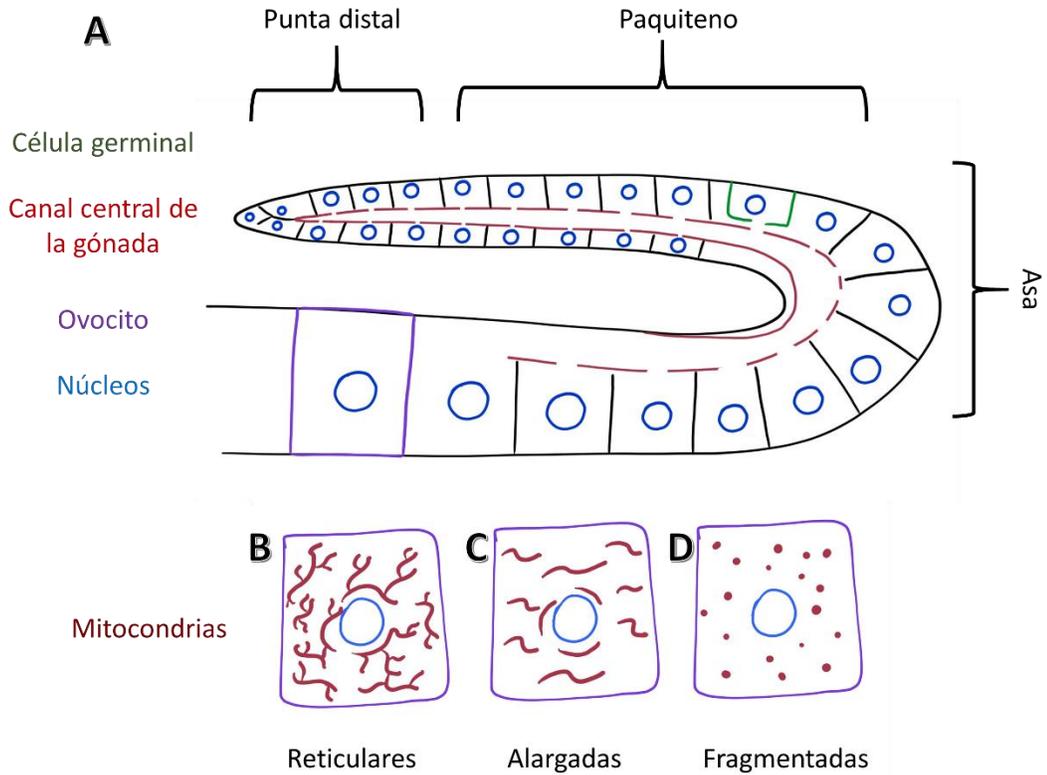


Figura 10. Esquema que representa la morfología de la gónada y los tipos de mitocondrias. A) Esquema de la gónada del nematodo. En azul los núcleos, en verde se representa la membrana parcial que delimita una célula germinal, en rojo el canal central de la gónada y en morado un ovocito ya celularizado. B-D) Esquema de los tres tipos de morfología que observamos para describir las mitocondrias: B) Reticular, con mitocondrias alargadas y con ramificaciones; C) Alargadas, como líneas; D) Fragmentadas, puntos separados distribuidos a lo largo de toda la célula.

Como se muestra en la figura 10A las células germinales forman un sincicio. Ya que se encuentran conectadas por un canal central de citoplasma compartido hasta poco antes de la fertilización. En la figura 11 se observan imágenes representativas de las fotografías tomadas con microscopía confocal para determinar con detalle la estructura mitocondrial que corresponde a cuatro zonas de la gónada: I) Punta distal, corresponde a la zona de proliferación; II) Paquiteno, en dónde el canal central de la gónada es más evidente; III) Asa,

que corresponde a la salida de paquiteno, principal región donde las células son susceptibles a apoptosis y; IV) Ovocitos, ya celularizados, estos últimos ya no forman parte del sincicio.

En animales adultos de un día en condiciones control (20°C con alimento) observamos que, en la punta distal todas las mitocondrias se encuentran fragmentadas, (Figura 11A). En la zona de paquiteno las mitocondrias son alargadas (Figura 11B). Las mitocondrias del asa que se encuentran en el centro se encuentran fragmentadas (Figura 11C), mientras que las mitocondrias que se encuentran dentro de las células germinales del asa tienen una morfología alargada (Figura 11C). En los ovocitos se puede apreciar que la estructura mitocondrial tiene una disposición reticular (Figura 11D). Nuestras observaciones muestran que la estructura de las mitocondrias varía a lo largo del proceso de ovogénesis.

En la segunda columna de la figura 11 se muestran imágenes representativas de gónadas de los animales que fueron expuestos a choque de calor. Observamos que en la punta distal las mitocondrias se alargan, especialmente en la parte central (Figura 11A'). En el centro de la zona de paquiteno se forma una acumulación de mitocondrias alargadas y de fluorescencia mucho más intensa a comparación del control (Figura 11B'). Por el contrario, las mitocondrias que se encuentran en las células germinales de esta misma zona ahora están fragmentadas (Figura 11B'). Esta diferencia entre regiones dentro de la zona de paquiteno no se observa en el control (Figura 11B). En la zona del asa observamos un fenotipo intermedio entre mitocondrias fragmentadas y alargadas (Figura 11C'). Las mitocondrias de los ovocitos ahora están totalmente fragmentadas (Figura 11D').

Control

Choque de calor

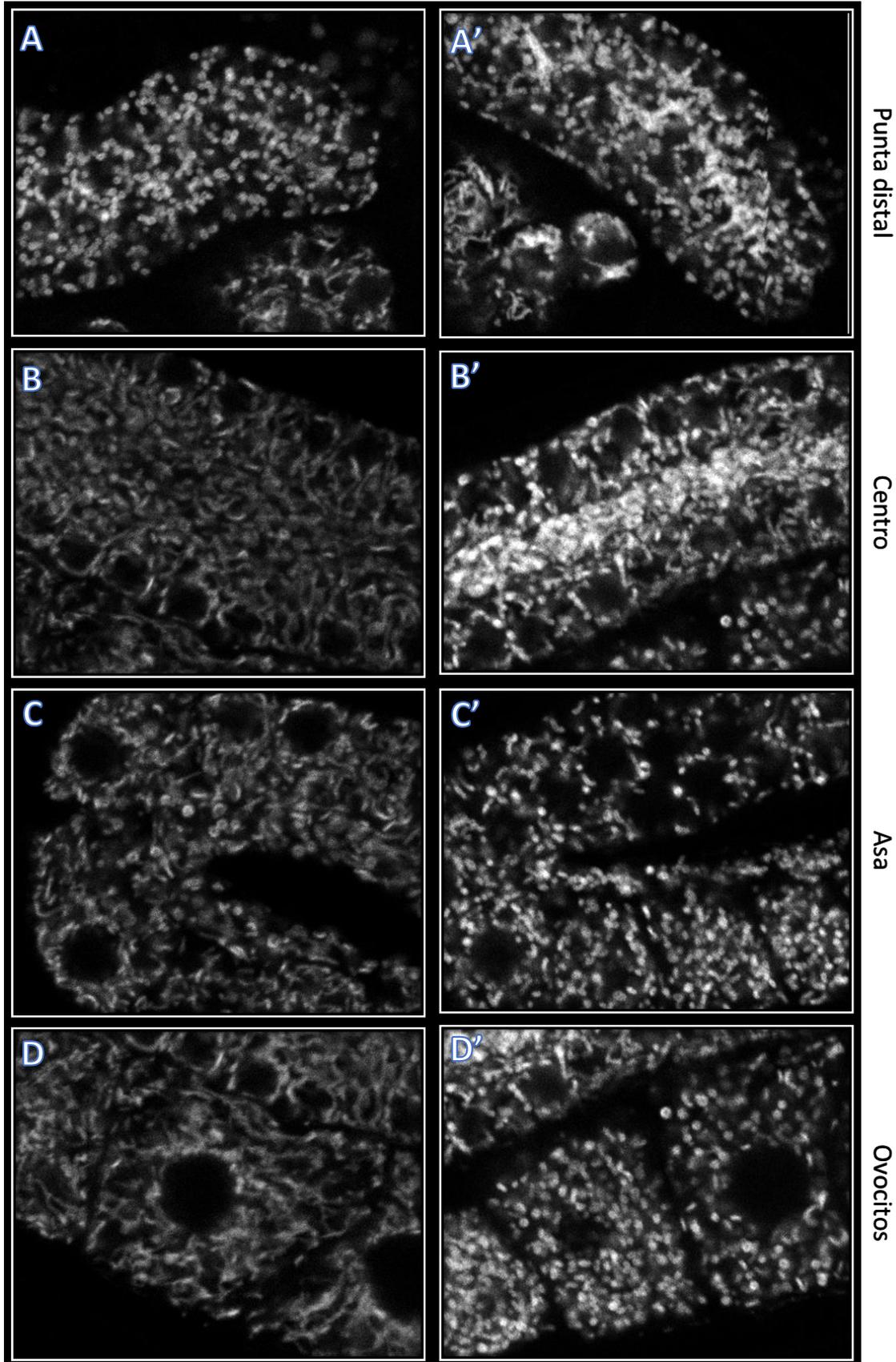


Figura 11. La morfología mitocondrial varía durante la ovogénesis y cambia en respuesta al choque de calor. Nematodos *tomm20::mcherry* adultos de un día fueron mantenidos en condiciones control (20°C) (A-D) o sometidos a choque de calor (31°C por 3 horas) (A'-D'), posteriormente se visualizaron en el microscopio confocal LSM800 de Zeiss. Se seleccionaron imágenes correspondientes a I) la punta distal (A y A'), II) centro (B y B'), III) el asa (C y C') y IV) ovocitos (D y D'). Imágenes representativas de 10 animales observados para cada condición (5 repeticiones con una N de 2 animales por condición).

Con estas observaciones concluimos que la morfología mitocondrial es diferente en cada zona de la gónada del nematodo y que en respuesta a estrés la morfología mitocondrial cambia de forma específica en cada región.

Nos interesamos en la agregación de mitocondrias en el canal central de la gónada que se observa en respuesta a choque de calor y ayuno, por ser el cambio más evidente. Nos preguntamos entonces cuánto tiempo tarda en darse este cambio durante el choque de calor o ayuno, y si éste es un proceso reversible. Seguimos la dinámica del cambio morfológico mitocondrial contabilizando el número de individuos que presentaban agregados mitocondriales al observarlos bajo un microscopio de epifluorescencia al tiempo cero, es decir antes de exponerlos a estrés y cada hora a partir del inicio del estrés. Una vez concluido el estrés se siguió observando a los animales cada hora después de volver a su temperatura de crecimiento (20°C) en el caso de choque de calor o después de colocar a los gusanos en cajas con comida para el caso del ayuno, hasta que las mitocondrias regresaran a su morfología original (Figura 12). Observamos que a las 3 horas de choque de calor el 80 por ciento de gusanos presentan el fenotipo de agregación mitocondrial (Figura 12A). En el caso del ayuno, el 80 por ciento de los gusanos presentan agregados mitocondriales a las 5 horas (Figura 12B), es decir que la inducción es más lenta. Una vez terminado este estrés,

las mitocondrias recuperan su morfología original dos horas después de terminar el choque de calor (Figura 12A) o tres horas después de terminar el ayuno (Figura 12B). En ningún caso llegamos a observar un fenotipo intermedio, por lo que suponemos que el reordenamiento de mitocondrias, en este caso, es un proceso muy rápido una vez que se ha iniciado.

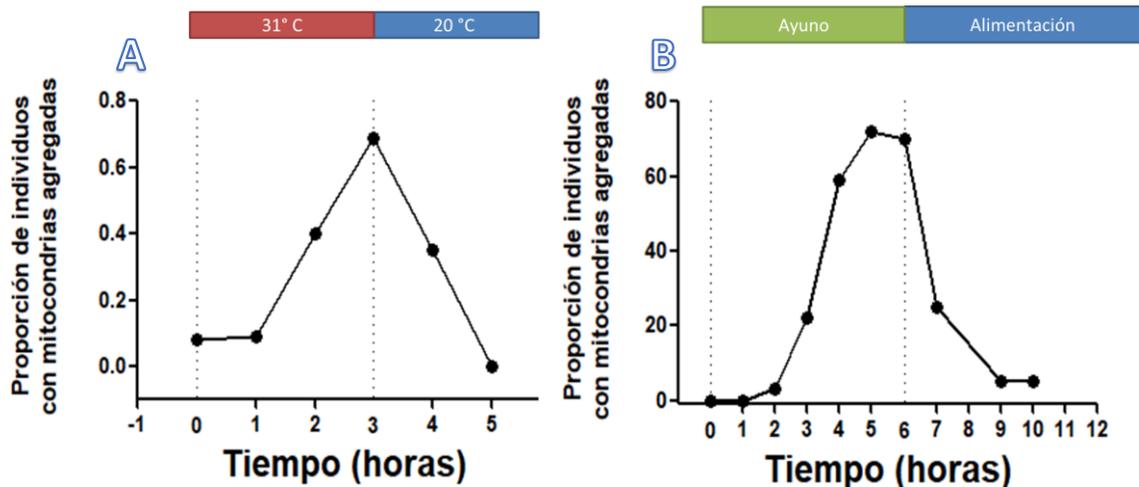


Figura 12. Dinámica de la agregación mitocondrial en el canal central de la gónada del nematodo durante estímulos de estrés. Los animales *tomm20::cherry* fueron A) sometidos a un choque de calor o B) a ayuno y cada hora durante el estrés y en su recuperación fueron montados y observados en un microscopio de epifluorescencia. El porcentaje de animales que mostraron agregados mitocondriales en el canal central de la gónada se graficó. Las líneas verticales punteadas representan el inicio y término del estrés. A) colocados a 31°C por tres horas y posteriormente devueltos a su temperatura de crecimiento 20°C o B) colocados en cajas petri con NGM sin bacteria por 6 horas y posteriormente regresados a cajas petri con su alimento habitual (OP50). Se analizaron 35 animales por cada punto temporal.

Los agregados mitocondriales se forman en la misma región que los gránulos de estrés

Datos previos del laboratorio han demostrado la formación de gránulos de estrés en el canal central de la gónada (Huelgas-Morales 2016). En dicho trabajo los gránulos de estrés se observaron con el transgénico *tiar-1::gfp* y con inmunotinciones contra CGH-1 (Figura 3). Además, se demostró que la formación de estos gránulos de estrés depende de la proteína de unión a RNA: TIAR-1 (Figura 4). Cabe recordar que en la gónada en estrés todos los gránulos que se observan en la figura 2 se vuelven más evidentes y los podemos distinguir como gránulos P (perinucleares), cuerpos de procesamiento, gránulos de estrés en el canal central de la gónada, gránulos de estrés periféricos y gránulos de estrés en los ovocitos.

Nos pareció interesante que los agregados mitocondriales descritos en esta tesis, se forman en el canal central de la gónada al igual que algunos de los gránulos de estrés. Nos propusimos estudiar la localización de los gránulos de estrés con respecto a las mitocondrias de los agregados mitocondriales que se forman en respuesta a estrés. Para ello realizamos una cruce de los transgénicos *tomm20::mcherry* y *tiar-1::gfp*, lo que nos permitió visualizar las mitocondrias y los gránulos de estrés, *in vivo* y simultáneamente. Los animales control presentan una distribución homogénea de mitocondrias (Figura 13A) con la morfología que se describió en la figura 11. La expresión de *tiar-1::gfp* en los animales control es difusa y está distribuida a lo largo de toda la gónada, resaltan los gránulos P en la periferia de los núcleos (Figura 13B). Al someter a estos gusanos a choque de calor y observarlos con microscopía confocal encontramos que los gránulos de estrés marcados con la proteína de

fusión TIAR-1::GFP (Figura 13E) se encuentran situados en el canal central de la gónada al igual que la mayor densidad de mitocondrias de los agregados mitocondriales que observamos con TOMM20::mCherry (Figura 13D, 13E y 13F).

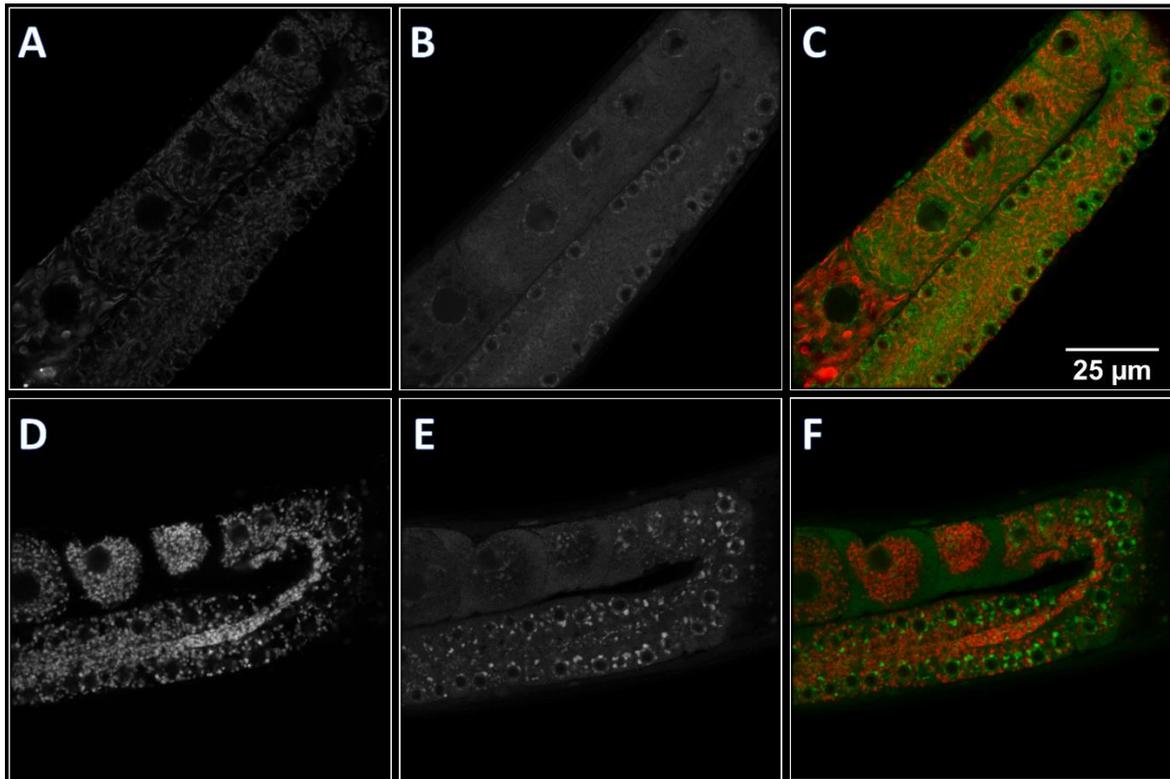


Figura 13. Los gránulos de estrés se encuentran muy próximos a las mitocondrias del centro de la gónada. Animales *tomm20::mCherry tiar-1::gfp* adultos de un día fueron A-C) mantenidos en condiciones control o E-F) sometidos a choque de calor (31°C por 3 horas), posteriormente se montaron en colchones de agarosa y visualizaron con el de 63x de un microscopio confocal LSM800 de Zeiss. Las fotos corresponden a A y D) TOMM20::mCherry, B y E) TIAR-1::GFP, C y F) Empalme. Las fotografías son representativas de tres repeticiones de 3 a 5 animales por condición por ensayo.

Si nos acercamos a los agregados mitocondriales podemos observar que los gránulos de estrés se forman entre las mitocondrias de los agregados (Figura 14 B). Esta observación nos llevó a preguntarnos si existía una relación funcional entre estos dos organelos.

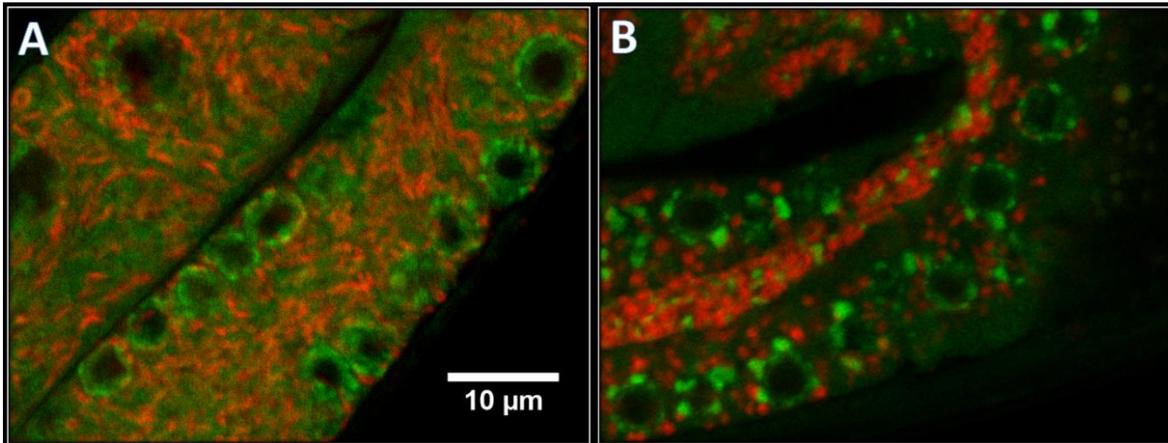


Figura 14. Los gránulos de estrés se encuentran muy próximos a las mitocondrias del centro de la gónada. Animales *tomm20::mCherry tiar-1::gfp* adultos de un día fueron A) mantenidos en condiciones control o B) sometidos a choque de calor (31°C por 3 horas), posteriormente se montaron en colchones de agarosa y visualizaron con el de 63x de un microscopio confocal LSM800 de Zeiss. Las fotos corresponden a ampliaciones de las figuras 13 C y D. Las fotografías son representativas de tres repeticiones de 3 a 5 animales por condición por ensayo.

Los gránulos de estrés no se requieren para la agregación de mitocondrias

Dada la proximidad entre los gránulos de estrés y los agregados mitocondriales postulamos la hipótesis de que estos dos procesos podrían estar relacionados entre sí. Primero analizamos si la formación de los gránulos de estrés es necesaria para la agregación mitocondrial. Para responder esta pregunta, silenciamos de forma independiente, mediante la técnica de RNAi a genes necesarios para la formación de gránulos: *tiar-1* (Huelgas-Morales 2016) y *gla-3* (Dámazo-Hernández 2017). Las bacterias utilizadas para esto provienen de una biblioteca comercial de RNA de interferencia v1.1 de Open Biosystems que tenemos en el laboratorio. Como control utilizamos animales que se alimentaron de la misma cepa de bacterias que los gusanos RNAi y fueron sometidas a inducción por IPTG, pero estas contienen el plásmido vacío. A los animales de los tres fondos genéticos: 1) *tomm20::mcherry* (Plásmido Vacío), 2) *tomm20::mcherry gla-3(RNAi)*, 3) *tomm20::mcherry tiar-1(RNAi)* los sometimos a las mismas condiciones de estrés que hemos estado utilizando. Después del estrés montamos a los animales en colchones de agarosa, los observamos con un microscopio de epifluorescencia y contamos el número de gusanos que presentaban agregados mitocondriales en condiciones control, ayuno y choque de calor. En la figura 15 se muestran imágenes representativas de la formación de agregados mitocondriales en respuesta al choque de calor para cada fondo genético y la gráfica correspondiente en la que se muestran también los resultados del ayuno.

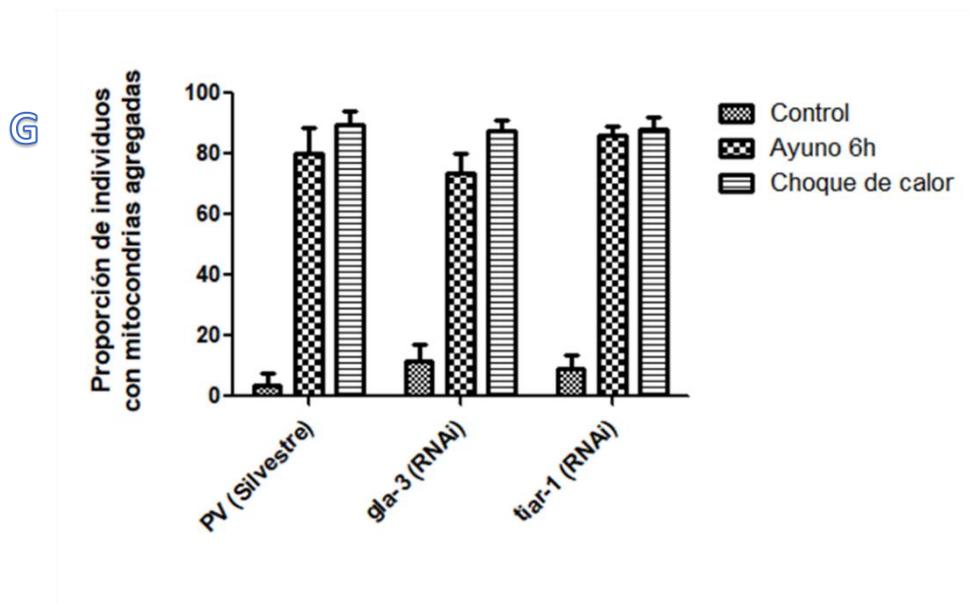
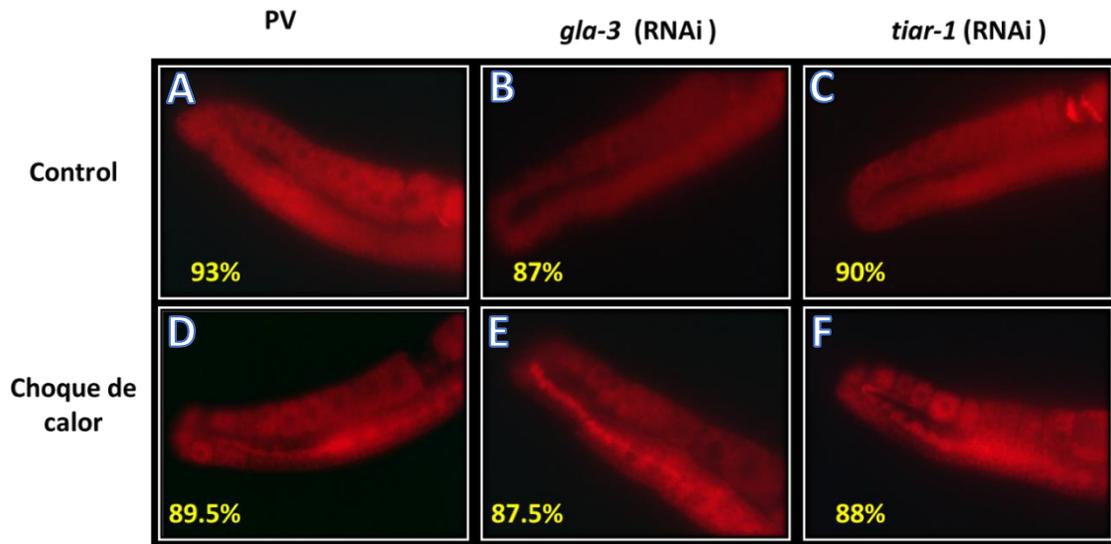


Figura 15. La agregación mitocondrial no depende de la formación de gránulos de estrés. Nematodos *tomm20::mCherry*, *tomm20::mCherry gla-3* (RNAi) y *tomm20::mCherry tiar-1* (RNAi) adultos de un día fueron A-C) mantenidos en condiciones control (20°C con comida), D-F) sometidos a choque de calor (31°C por 3 horas) o a un ayuno de 6 horas (G), posteriormente se montaron en colchones de agarosa, se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y se contabilizó la proporción de gusanos que presentaban agregados mitocondriales. En G se muestran los resultados graficados de la proporción de gusanos que presentaban agregados mitocondriales en condiciones control, ayuno o choque de calor para los tres fondos genéticos. Se realizaron tres replicados experimentales, en cada uno se utilizaron 30 animales por condición. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos (entre controles, ayunos ni choques de calor).

Con el silenciamiento de *tiar-1* y *gla-3* la morfología mitocondrial en la gónada del gusano adulto no se ve alterada en condiciones control (20°C con comida) (Figura 15A, 15B y 15C). Cuando los gusanos silenciados son sometidos a estrés las mitocondrias se agregan en la misma proporción que en los gusanos silvestres (Figura 15D, 15E y 15F), tanto en el caso de ayuno como en el de choque de calor (Figura 15G). Estos datos demuestran que la formación de gránulos de estrés no es necesaria para la agregación mitocondrial en condiciones de estrés.

Decidimos corroborar nuestros resultados realizando un experimento de choque de calor en las cepas mutantes *gla-3 (op312)* (una delección del extremo carboxilo que es suficiente para impedir la formación gránulos de estrés) y *tiar-1(tn1543)* (una delección total del gen). Para lo que fue necesario realizar la cruce de cada uno de estas mutantes con el transgénico *tomm20::mCherry*. Animales adultos de un día fueron sometidos a choque de calor y se contabilizó el número de gusanos que presentaban el fenotipo de agregación mitocondrial en cada genotipo. La morfología mitocondrial en las gónadas de los nematodos en condiciones control de los tres genotipos son iguales (Figura 16A, 16B y 16C). Presentan una distribución homogénea y no hay presencia de agregados. Cuando estos gusanos son sometidos a choque de calor se forman agregados mitocondriales en el canal central de la gónada en los gusanos *tomm20::mcherry* (Figura 16D), *tomm20::mcherry;gla3(op312)* (Figura 16E) y *tomm20::mcherry;tiar-1(tn1543)* (Figura 16F). Estos resultados corroboran que la agregación mitocondrial no depende de la formación de gránulos de estrés.

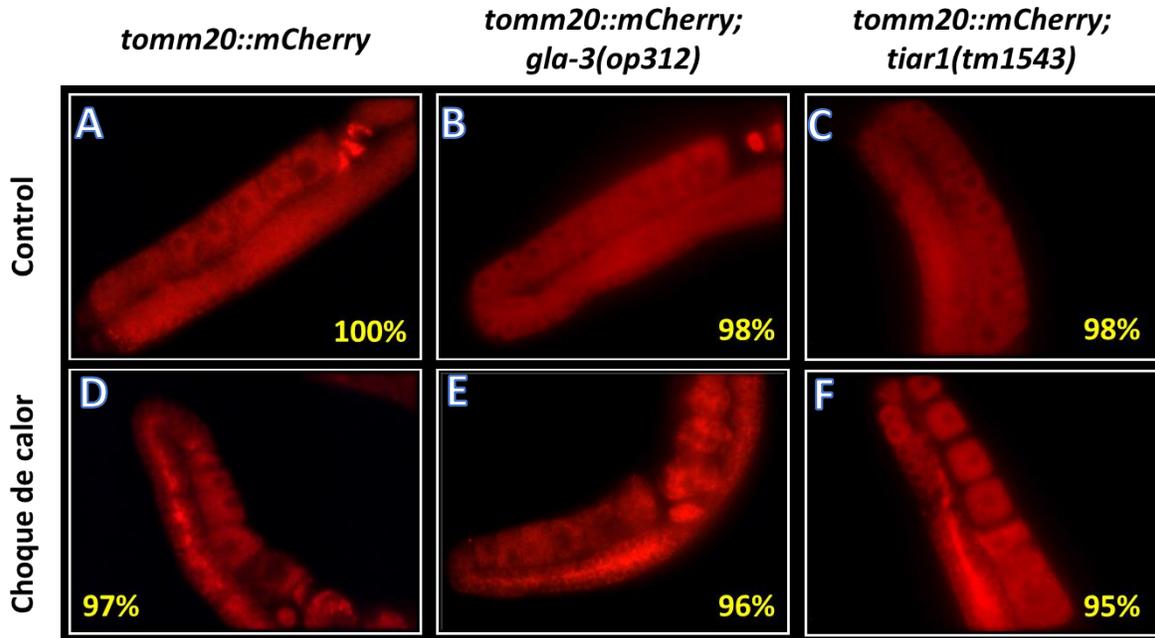


Figura 16. La formación de agregados mitocondriales no depende de la formación de gránulos de estrés. Animales adultos de un día *tomm20::mcherry*, *tomm20::mcherry;gla3(op312)*, *tomm20::mcherry;tiar-1(tm1543)* fueron mantenidos en condiciones control (A-B) o expuestos a choque de calor (31°C por 3h) (D-E). Posteriormente fueron montados en colchones de agarosa y observados al microscopio de epifluorescencia para evaluar la formación de agregados mitocondriales. Los porcentajes corresponden a los individuos que se observan como en la foto. Se realizaron tres replicados experimentales, en cada uno se utilizaron 30 animales por condición.

La fusión mitocondrial participa en la formación de los agregados mitocondriales

Para determinar si la agregación observada es mediada por la dinámica mitocondrial, comenzamos por silenciar el gen *drp-1*, necesario para la fisión mitocondrial. Animales *tomm20::mcherry* (plásmido vacío) y *tomm20::mcherry drp-1(RNAi)* adultos de un día fueron mantenidos en condiciones control o sometidos a estrés por choque de calor o ayuno, al término del estrés los animales se montaron en colchones de agarosa y se observaron con un microscopio de epifluorescencia. Observamos que la morfología mitocondrial se ve severamente afectada en la gónada de los animales *drp-1(RNAi)* no estresados: la distribución de mitocondrias no es homogénea, aparecen cúmulos de mitocondrias a lo largo del sincicio y los ovocitos tienen distintas cantidades de mitocondrias (Figura 17D). Incluso en condiciones control encontramos agregados mitocondriales en el 20% de las gónadas (Figura 17G).

Cuando los animales *drp-1 (RNAi)* son sometidos a estrés, ya sea ayuno (Figura 17E) o choque de calor (Figura 17F) se forman agregados mitocondriales en el canal central de la gónada en las mismas proporciones que el control, como se muestra al graficar los resultados (Figura 17G). En los animales *drp-1(RNAi)* los agregados mitocondriales que aparecen en respuesta a ayuno son más largos y evidentes que aquellos que se forman en el caso de los animales silvestres. Por lo que concluimos que la fisión no es necesaria para formar los agregados mitocondriales, sino que parece favorecerlos.

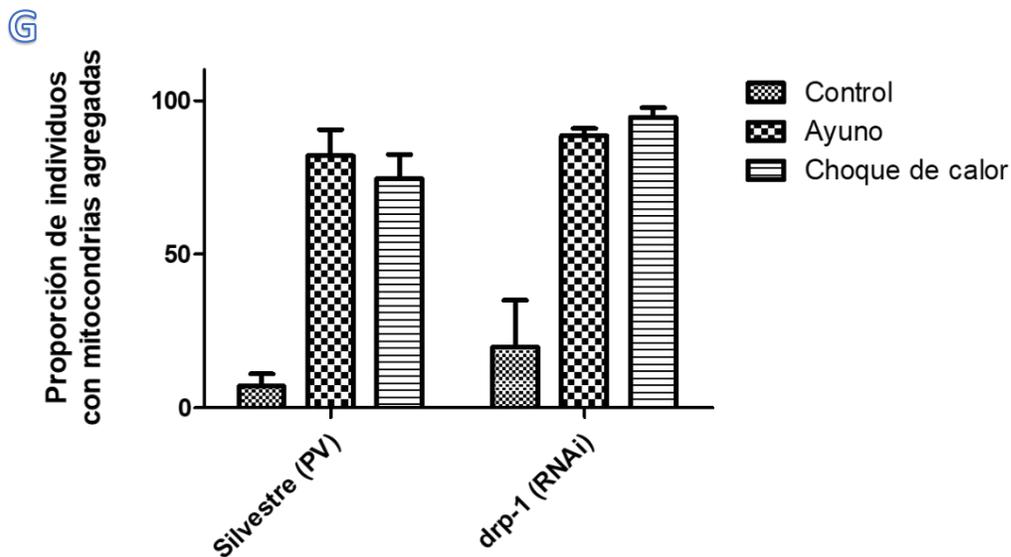
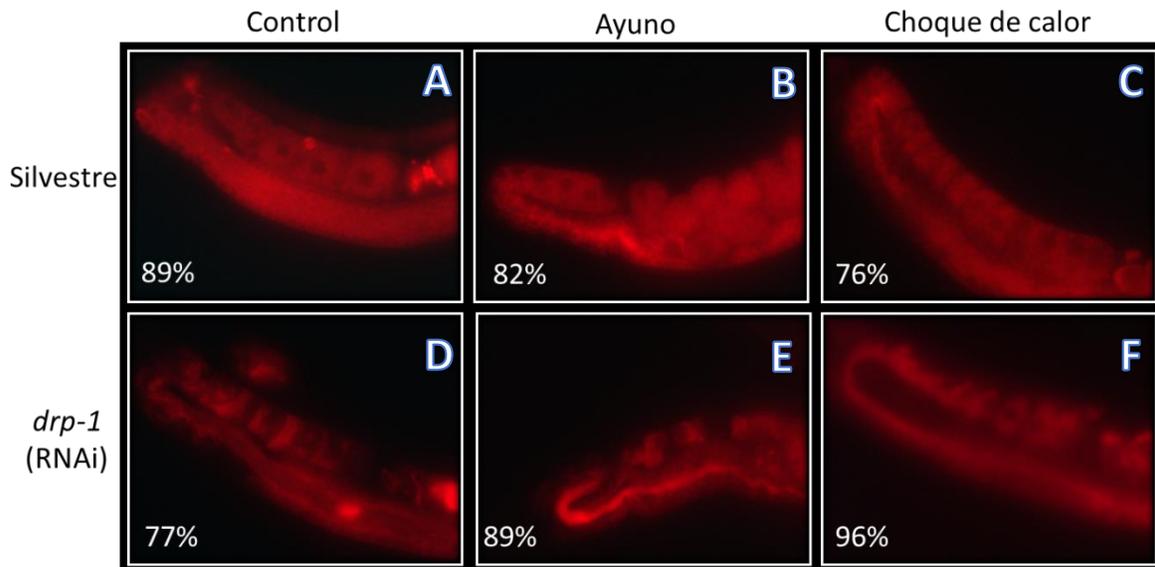


Figura 17. La fisión mitocondrial no participa en la formación de agregados mitocondriales. Nematodos *tomm20::mcherry* (plásmido vacío) (A-C) y *tomm20::mcherry drp-1*(RNAi) (D-E) fueron sincronizados y alimentados desde L1 con HT115 que expresaban dsRNA para degradar al mensajero de *drp-1* o con un plásmido vacío (PV). Los gusanos adultos de un día fueron mantenidos a 20°C con comida (A y D), sometidos a un ayuno (6 horas sin alimento) (B y E) o sometidos a un choque de calor (31°C por 3 horas) (C y F). Al término del estrés los gusanos se montaron en colchones de agarosa, se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y se contabilizó la proporción de gusanos que presentan agregados mitocondriales en el canal central de la gónada. Los porcentajes en los paneles A-F corresponden a la proporción de individuos que se observaban como en la foto. Los resultados se presentan en forma de gráfica en el panel G. Se realizaron tres replicados experimentales, en cada uno se utilizaron 30 animales por condición.

Después nos preguntamos si el silenciamiento de *drp-1* afectaba la dinámica de formación y desensamble de los agregados mitocondriales que se forman durante el estrés. Utilizando animales *tomm20::mcherry* (plásmido vacío) y *tomm20::mcherry drp-1(RNAi)* seguimos la dinámica del cambio morfológico mitocondrial en el canal central de la gónada contabilizando el número de individuos que presentaban agregados mitocondriales al observarlos bajo un microscopio de epifluorescencia al tiempo cero, es decir antes de exponerlos a estrés por choque de calor, cada hora durante el choque de calor y se siguió observando los gusanos cada hora después de volver a su temperatura normal de crecimiento (20°C), hasta que las mitocondrias regresaran a su morfología original o hasta 24 horas en el caso de los animales *tomm20::mcherry drp-1(RNAi)* (Figura 12A). Encontramos que la dinámica de agregación mitocondrial no se ve afectada durante el estrés, ya que la proporción de individuos que presentan agregados mitocondriales en el canal central de la gónada aumenta de manera similar al control cada hora hasta el término del estrés (Figura 18). Cuando se observan los gusanos en recuperación se aprecia que los controles se recuperan totalmente una hora después de haber terminado el choque de calor, sin embargo, en los animales *tomm20::mcherry drp-1(RNAi)* los agregados mitocondriales se mantienen por más tiempo. A las 24 horas el 50% de la población aún no ha desensamblado los agregados mitocondriales (Figura 18A). Estos resultados sugieren que la fusión mitocondrial participa en la formación de los agregados mitocondriales, ya que la fisión mitocondrial es necesaria para regresar las redes mitocondriales a su morfología original cuando termina el estrés (Figura 18A). Por eso en los gusanos que no

pueden fisionar (*tomm20::mcherry drp-1(RNAi)*) el proceso de recuperación de la morfología de sus mitocondrias es mucho más lento.

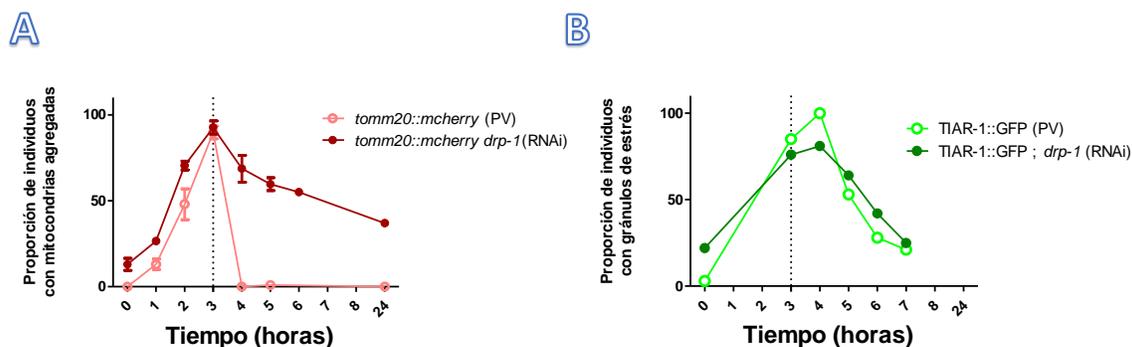


Figura 18. Los agregados mitocondriales producidos durante el estrés son producto de fusión mitocondrial. Nematodos *tomm20::mCherry;tiar-1::gfp* fueron sincronizados y alimentados desde L1 con HT115 que expresaban dsRNA para degradar al mensajero de *drp-1* o que no expresaban nada (PV). Los adultos de un día fueron sometidos a choque de calor (31°C por 3 horas). Cada hora se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y se contabilizó A) la proporción de gusanos que presentaban agregados mitocondriales en el canal central de la gónada y B) La proporción de animales que presentaban gránulos de estrés en el canal central de la gónada. El tiempo cero corresponde a los gusanos antes de someterse a estrés. La línea punteada marca el final del estrés y el inicio de la recuperación. Se realizaron tres replicados experimentales para la formación de agregados mitocondriales y dos para la formación de gránulos, en cada uno se utilizaron 30 animales por condición y punto temporal.

Decidimos evaluar si en los animales en los animales *tomm20::mcherry drp-1(RNAi)*, que tardan en desensamblar los agregados mitocondriales, se afecta el desensamble de los gránulos de estrés. Para contestar esta pregunta silenciamos *drp-1* en animales *tiar-1::gfp* y estudiamos la dinámica de formación de gránulos. Contamos el número de animales que formaron gránulos de estrés en el canal central de la gónada antes del estrés, y cada hora después del estrés por choque de calor (Figura 18B). Observamos que la formación de

gránulos de estrés y el desensamble gránulos de estrés no se ven alteradas, a pesar de que el silenciamiento de *drp-1* afecta el desensamble de los agregados mitocondriales.

La fusión mitocondrial es necesaria para la formación de gránulos de estrés

Por último, nos preguntamos si la formación de los gránulos de estrés depende de la fusión mitocondrial. Utilizamos la cepa *fzo-1(tm1133)*, una mutante de pérdida de función en el gen necesario para la fusión de la membrana externa mitocondrial. Expusimos animales adultos de un día de dicho genotipo y silvestres a estrés por choque de calor, disecamos las gónadas y realizamos una tinción contra CGH-1 para evaluar la formación de gránulos (Figura 19).

En los gusanos N2 y *fzo-1(tm1133)* en condiciones control no se observan gránulos de estrés (Figura 19A y 19B), pero cuando los animales silvestres son estresados forman gránulos de estrés en los ovocitos y en el canal central de la gónada. De forma interesante en los mutantes de *fzo-1* se formaron gránulos de estrés en los ovocitos, pero no en el canal central de la gónada (Figura 19D). Con estos experimentos concluimos que la fusión mitocondrial es necesaria para la formación de los gránulos de estrés del canal central de la gónada, sin embargo, la formación de gránulos de estrés en los ovocitos no se ve afectada, lo que nos habla de que los gránulos de estrés de la gónada del nematodo se regulan de forma diferencial de acuerdo a su localización.

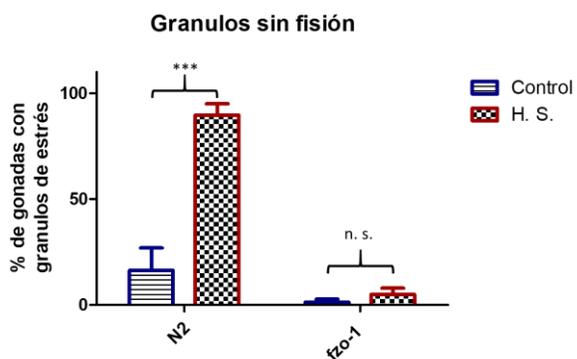
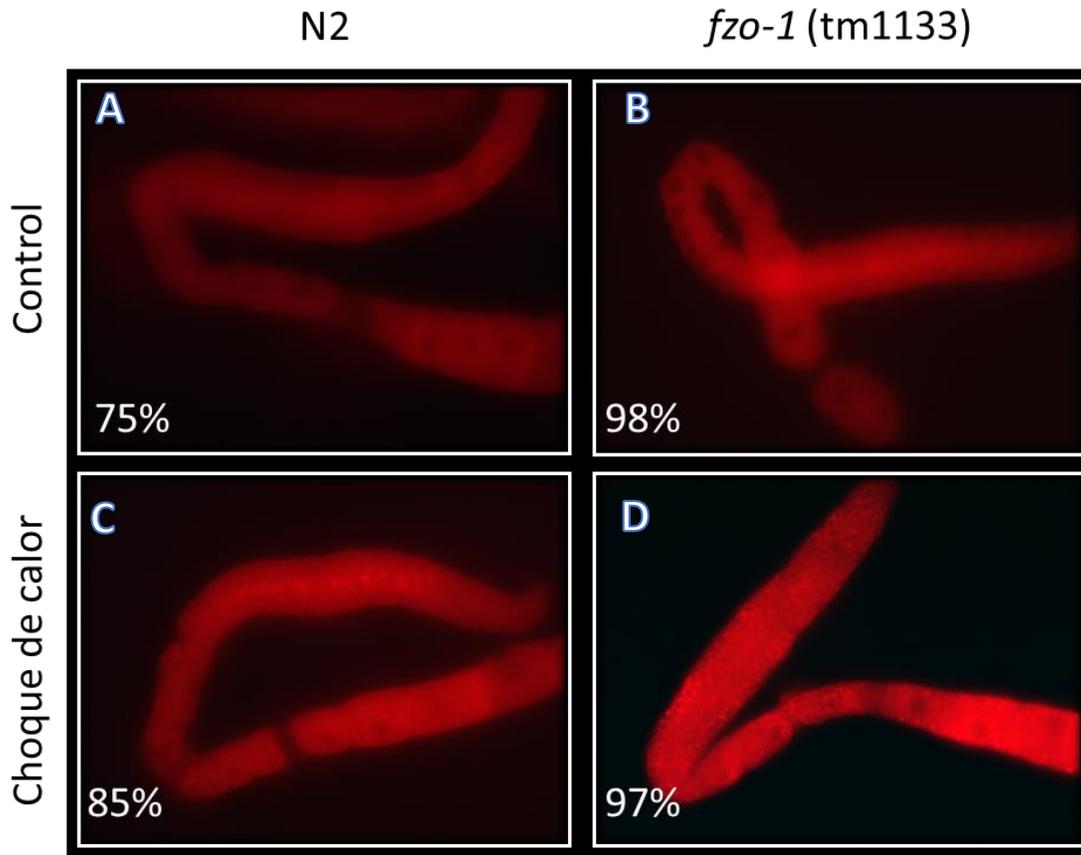


Figura 19. Inmunotinción contra CGH-1 en gónadas disecadas de animales con defectos en la dinámica mitocondrial. Animales adultos de un día silvestres (N2), *fzo-1*(tm1133) que no pueden fusionar mitocondrias, y *drp-1*(tm1108), que no pueden fisurar mitocondrias, fueron mantenidos en condiciones control o expuestos a choque de calor (31°C por 3h). Posteriormente se disecaron las gónadas y se realizó una inmunotinción contra CGH-1 para evaluar la formación de gránulos de estrés. Los porcentajes corresponden a los individuos que se observan como en la foto. Se realizaron tres replicados experimentales, en cada uno se utilizaron 30 animales por condición. En la parte inferior se muestra la gráfica de los resultados obtenidos. Analizados con anova de dos vías y la prueba *post oc* de Bonferroni.

Conclusiones

- La morfología mitocondrial cambia a lo largo de la gónada de *C. elegans*: Las mitocondrias del extremo distal están fragmentadas. Las mitocondrias de la zona de paquiteno son alargadas. Las mitocondrias del asa son fragmentadas en el canal central de la gónada y alargadas dentro de las células germinales. Las mitocondrias de los ovocitos son reticulares.
- La morfología mitocondrial de las células germinales cambia en respuesta a estrés: Aquellas que tenían forma alargada o reticular se fragmentan, mientras que aquellas que se encontraban fragmentadas se alargan. El cambio más evidente ocurre en el canal central de la gónada donde se dormán lo que aquí llamamos agregados mitocondriales.
- Los gránulos no se requieren para la formación de los agregados mitocondriales.
- La fusión mitocondrial participa en la formación de los agregados mitocondriales que se forman en respuesta a estrés.
- La fusión mitocondrial se requiere para la formación de gránulos de estrés en el canal central de la gónada.

Discusión

La morfología mitocondrial en las células germinales

Este trabajo comenzó con la observación de las mitocondrias en la gónada del nematodo en condiciones control y de estrés (Figura 11). La primera observación que describimos es que la morfología mitocondrial en las células germinales cambia a lo largo del sincicio, esto concuerda con reportes de que la morfología mitocondrial cambia de acuerdo al estado celular (Salazar-Roa and Malumbres 2017; Scott and Youle 2010; Wai and Langer 2016). Las mitocondrias fragmentadas en la parte distal pueden deberse a que en ese sitio las células están en constante división. El hecho de que se alarguen en paquiteno probablemente responde al hecho de que es la región transcripcionalmente más activa, por lo que requiere más energía. La estructura reticular en los ovocitos se puede atribuir a la necesidad de acumular energía para las siguientes divisiones. La fragmentación en el canal central de la gónada es necesaria para el transporte y segregación de las mismas (Figura 20).

En condiciones de estrés como choque de calor o ayuno las mitocondrias de la línea germinal del nematodo se hiperfusionan en el centro del sincicio, mientras que en los ovocitos se fisianan. Esto es un reflejo de la regulación diferencial de la morfología mitocondria acorde al microambiente celular, ya que estamos viendo que el mismo linaje celular (germinal) puede responder distinto de acuerdo a su etapa en el desarrollo (Figura 20).

Los ovocitos que ya estaban formados y los que se formaron al momento del estrés producirán progenie no viable, mientras que las células de la zona del nicho, de la zona de paquiteno y de la zona del asa sí logran contender al estrés y su viabilidad no se ve afectada,

por lo que después de un par de horas el gusano vuelve a la producción normal de embriones (Huelgas-Morales 2016). Deben existir múltiples factores que permitan la protección de estas células germinales. En el trabajo de Huelgas-Morales se reportó que es necesaria la formación de gránulos de estrés, sin embargo, estos también se forman en los ovocitos, por lo que no son suficientes para prevenir la falla en la viabilidad de la célula.

El re-arreglo mitocondrial descrito en el presente trabajo, puede ser otro de los factores implicados en la protección de las células germinales de la zona de paquitenio y la zona del asa. Esta hipótesis se apoya en estudios que muestran que la regulación de la morfología mitocondrial durante la ovogénesis está relacionada con la viabilidad de la progenie (Udagawa et al. 2014; Wakai et al. 2014). En estos se describe que, al disminuir la fisión, ya sea por una mutante de drp-1 o la sobreexpresión de mitofusinas, los ovocitos de ratón presentan errores en la señalización por calcio y en la segregación cromosómica. Esto genera ovocitos no fertilizables o embriones no viables. Así, alteraciones en la morfología mitocondrial afectan la viabilidad de los ovocitos. En cuanto a nuestras observaciones la fusión promovería la sobrevivencia de las células germinales, mientras que la fisión promovería fallas en las mismas. Faltaría realizar experimentos que alteren la dinámica mitocondrial y evaluar sus efectos directos en la viabilidad de los ovocitos.

Los agregados mitocondriales parecen nuclearse en la zona del asa, ya que siempre que los agregados mitocondriales están presentes se pueden observar en esa zona sin importar el tamaño o longitud de los mismos. La fusión mitocondrial puede aumentar por un exceso de mitofusinas (FZO-1 en *C. elegans*) (van der Bliet et al. 2013; Chaudhari & Kipreos 2017; Wakai et al. 2014) o por modular el estado de fosforilación de DRP-1 que

posee tres sitios fosforilables, dos inhiben y uno activa a DRP-1 (van der Blik et al. 2013; Giorgi et al. 2009; Salazar-Roa & Malumbres 2017). Sería interesante evaluar cambios en FZO-1 y DRP-1 para entender mejor el proceso de formación de estos agregados mitocondriales.

La fusión mitocondrial participa en la formación de los agregados mitocondriales

El hecho de que en ausencia de DRP-1 los agregados mitocondriales se formen, pero tardan más en desensamblarse sugiere que estos agregados son resultado de un proceso de fusión mitocondrial (Figura 18). Sin embargo, no descarta la participación de otros procesos como el transporte de mitocondrias. Falta comprobar que en ausencia de FZO-1 no pueda formarse los agregados mitocondriales. También sería interesante evaluar cambios en los niveles de expresión de FZO-1, la principal proteína descrita del proceso fusión de la membrana externa mitocondrial y en mtGPAT ya que esta se ha asociado a la fusión mitocondrial en *C. elegans* (Ohba et al. 2013).

La hiperfusión mitocondrial inducida por estrés es un fenómeno que ya se ha reportado y caracterizado previamente, tanto en *C. elegans* como en otros organismos (Ghose et al. 2013; Salazar-Roa & Malumbres 2017; Wai & Langer 2016). La hiperfusión se produce por ayuno, anoxia, radiación UV, entre otros tipos de estrés. Parece que promueve la actividad de la ETC y permite el intercambio de moléculas de DNA y proteína entre las mitocondrias de la célula, permitiendo el “rescate” de mitocondrias defectuosas por complementación y previendo la autofagia de las mismas.

La formación de agregados mitocondriales no puede ser explicada únicamente por una alteración de la dinámica de fusión y fisión mitocondrial, debe existir un mecanismo que medie el desplazamiento de las mitocondrias de forma dirigida al centro de la gónada para explicar el aumento en la intensidad de fluorescencia. Otra posibilidad es que sea causado por un incremento en la síntesis proteica global, lo cual contradiría los datos previos que demuestran que en condiciones de estrés la traducción se detiene (Anderson & Kedersha 2006), otra posibilidad es un incremento en la biogénesis mitocondrial, lo cual permanece como un dato por explorar.

Los agregados mitocondriales coinciden en localización subcelular con la región donde se forman los gránulos de estrés

Al observar que los agregados mitocondriales se localizan en la misma región que los gránulos de estrés, es decir en el canal central de la gónada, nos preguntamos si podría haber relación entre estos (Figura 14). Como se revisó en la introducción se ha visto interacción de las mitocondrias con los cuerpos P (Noble et al. 2008). Y diversos trabajos han postulado una relación entre mitocondrias y gránulos germinales en *Drosophila*, *Xenopus*, ratón y rata. En estos casos especialmente se demuestra que proteínas pasan de un organelo a otro, que la localización de los gránulos germinales depende de las mitocondrias y el papel de proteínas mitocondriales en la producción de piRNAs (Honda et al. 2013; Ipsaro et al. 2012; Nishimasu et al. 2012; Pane, Wehr, & Schüpbach 2007;

Shiromoto et al. 2013; Watanabe et al. 2011). Sin embargo, esta relación no se ha estudiado en *C. elegans*.

Los gránulos de estrés no se requieren para la formación de agregados mitocondriales

Desconocíamos la dirección que podría tener, de haberla, la relación entre gránulos de estrés y agregados mitocondriales. Ya que nuestro laboratorio está más familiarizado con los gránulos que con las mitocondrias, comenzamos por alterar la formación de los gránulos de estrés al silenciar las proteínas TIAR-1 y GLA-3, necesarias para la formación de gránulos (Dámazo-Hernández 2017; Huelgas-Morales et al. 2016). Y encontramos que los agregados mitocondriales aún eran capaces de formarse en respuesta a estrés (Figuras 15 y 16). Para corroborar estos resultados utilizamos a las mutantes de los mismos genes. Así demostramos que la formación de gránulos de estrés no se requiere para la formación de los agregados mitocondriales.

La fusión mitocondrial es necesaria para la formación de gránulos de estrés

De acuerdo a nuestros resultados la fusión mitocondrial participa en la formación de agregados (Figura 18). Esto nos llevó a utilizar la mutante *fzo-1 (tm1133)*, una delección parcial del gen *fzo-1*. Con ella realizamos inmunotinciones contra CGH-1 en animales estresados por choque de calor y sin estresar (Figura 19). En condiciones control no se forman gránulos. En condiciones de estrés se forman gránulos de estrés en los ovocitos, pero no en el canal central de la gónada. Con esto demostramos que cuando la fusión

mitocondrial es limitada por la ausencia de FZO-1 los gránulos de estrés del canal central de la gónada no pueden formarse (Figura 19). Esto nos dice que la fusión mitocondrial es necesaria para la formación de estos gránulos de estrés.

Puede ser que los agregados mitocondriales funcionen como un andamio para posicionar a los gránulos de estrés en el canal central de la gónada, apoyándonos en las imágenes que muestran que durante el estrés los gránulos se localizan entre las mitocondrias (Figura 14). Por ello en ausencia de fusión no se forma este tipo de gránulos. Inesperadamente, cuando los agregados permanecen por más tiempo los gránulos de estrés son capaces de desensamblarse al mismo ritmo que el control (Figura 18). Esto quiere decir que; aunque los agregados mitocondriales se requieren para la formación inicial (nucleación) de los gránulos de estrés, no es necesario que los agregados mitocondriales se disgreguen para que los gránulos de estrés lo hagan.

Existen distintos mecanismos posibles que expliquen la nucleación de gránulos mediada por mitocondrias. Una propuesta de interés para nuestros datos es la participación de mt-GPAT en la producción de lípidos, en particular el PA y el LPA, ya que estos participan en la fusión mitocondrial, son la relación de los gránulos germinales y las mitocondrias en mamíferos y también se producen en *C. elegans* (Ohba et al. 2013; Shiromoto et al. 2013).

La nucleación de gránulos germinales en espermatozoides de ratón, denominados cuerpos cromatoides, está relacionada con una fosfolipasa D mitocondrial (mitoPLD) (Watanabe et al. 2011; H. Huang et al. 2011), la cual no se encuentra conservada en nuestro modelo. Lo más cercano es la vía análoga de síntesis de PA y LPA que se menciona en el

párrafo anterior (mt-GPAT) codificada por el gen *acl-6*. Sería interesante explorar si dicho gen participa en la formación de los agregados mitocondriales aquí descritos. De forma interesante la señalización de LPA, pero en este caso mediada por sus receptores en la membrana plasmática, es necesaria para la espermatogénesis/fertilidad en humanos (Daaka 2002). No sería extraño que este hecho pueda estar relacionado, dados los ejemplos de modulación positiva de producción de lípidos.

En resumen, este trabajo describe el cambio en la morfología mitocondrial que ocurre en respuesta a un estímulo estresante, y postula un modelo celular para estudiar la regulación diferencial de la morfología mitocondrial asociado a la transición por las etapas de la meiosis cuyo impacto puede recaer en la fertilidad del organismo. Además, propone una relación entre gránulos y mitocondrias que no se había explorado. Es necesario continuar con el estudio de esta relación para esclarecer los mecanismos que por una parte regulan el cambio en la morfología mitocondrial y por qué la fusión mitocondrial es necesaria para la formación de gránulos de estrés en el canal central de la gónada y no en los ovocitos.

Es posible que, dadas las limitaciones y diferencias del modelo con otros organismos, los resultados que se obtengan no se puedan traslapar directamente. Aun así, a nivel celular los principios de la relación entre estos dos organelos deben ser conservados.

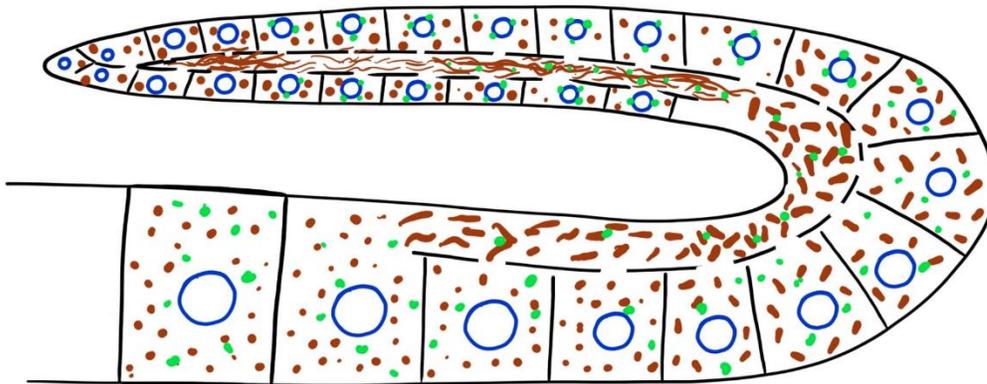
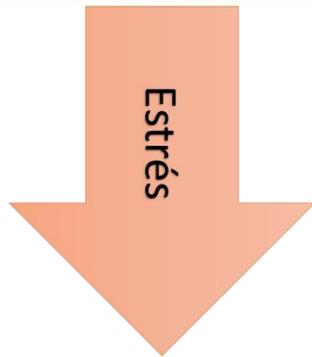
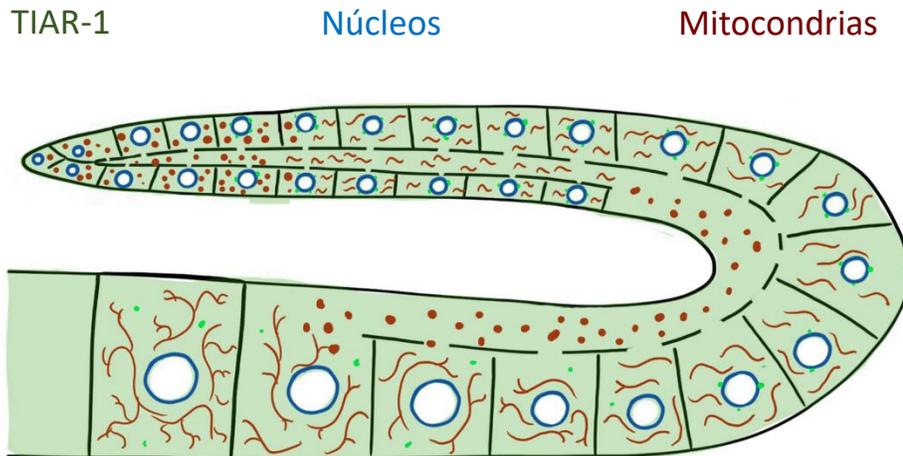


Figura 20. Cambios en las células germinales en respuesta a estrés. Este diagrama resume los cambios que observamos en la morfología mitocondrial cuando los gusanos son sometidos a estrés mostrados en la figura 10. La estructura de la mitocondria hace referencia a las descritas en los paneles B a D de la figura 9.

Perspectivas

Falta mucho por hacer. Primero nos gustaría describir los agregados de una forma más cuantitativa.

También planeamos corroborar que FZO-1 sea necesario para la formación de los agregados mitocondriales con una cruce de *tomm20::mcherry* con *fzo-1 (tm1133)*.

Por otro lado, nos interesaría ver si la ruta de LPA participa en la formación de agregados mitocondriales o de gránulos de estrés.

Finalmente falta evaluar la relevancia de este proceso, si encontramos un mecanismo de formación de estos agregados podemos detenerlos para entonces evaluar su relevancia en la respuesta a estrés en las células germinales.

Bibliografia

- Anderson, Jennifer L., Levi T. Morran, and Patrick C. Phillips. 2010. "Outcrossing and the Maintenance of Males within *C. Elegans* Populations." *The Journal of Heredity* 101 Suppl 1(Suppl 1):S62-74. Retrieved January 15, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20212008>).
- Anderson, Paul and Nancy Kedersha. 2006. "RNA Granules." *The Journal of Cell Biology* 172(6):803–8. Retrieved May 22, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16520386>).
- Anding, Allyson L. and Eric H. Baehrecke. 2017. "Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles." *Developmental Cell*.
- Andux, Sara and Ronald E. Ellis. 2008. "Apoptosis Maintains Oocyte Quality in Aging *Caenorhabditis Elegans* Females" edited by S. E. Mango. *PLoS Genetics* 4(12):e1000295. Retrieved May 18, 2018 (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1000295>).
- Avery, Leon and H. Rober. Horvitz. 1987. "A Cell That Dies during Wild-Type *C. Elegans* Development Can Function as a Neuron in a *Ced-3* Mutant." *Cell* 51(6):1071–78. Retrieved October 9, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867487905939?via%3Dihub>).
- Bailly, Aymeric and Anton Gartner. 2013. "Germ Cell Apoptosis and DNA Damage Responses." Pp. 249–76 in. Springer, New York, NY. Retrieved January 10, 2019 (http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4015-4_9).
- Bennett, Christopher F. and Matt Kaeberlein. 2014. "The Mitochondrial Unfolded Protein Response and Increased Longevity: Cause, Consequence, or Correlation?" *Experimental Gerontology*.
- van der Blik, Alexander M., Qinfang Shen, and Sumihiro Kawajiri. 2013. "Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(6):a011072. Retrieved May 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732471>).
- Boag, Peter R., Arzu Atalay, Stacey Robida, Valerie Reinke, and T. Keith Blackwell. 2008. "Protection of Specific Maternal Messenger RNAs by the P Body Protein CGH-1 (*Dhh1/RCK*) during *Caenorhabditis Elegans* Oogenesis." *The Journal of Cell Biology* 182(3):543–57. Retrieved October 4, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695045>).
- Booth, Lauren N. and Anne Brunet. 2016. "The Aging Epigenome." *Molecular Cell* 62(5):728–44. Retrieved July 30, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276516301502?via%3Dihub>).
- Breckenridge, David G. et al. 2008. "Caenorhabditis Elegans Drp-1 and Fis-2 Regulate Distinct Cell-Death Execution Pathways Downstream of *Ced-3* and Independent of *Ced-9*." *Molecular Cell* 31(4):586–97. Retrieved February 10, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722182>).
- Brenner, S. 1974. "New Directions in Molecular Biology." *Nature* 248(5451):785–87. Retrieved October 9, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4835550>).
- Brenner, S. 1973. *THE GENETICS OF CAENORHABDITIS ELEGANS*. Retrieved October 9, 2018 (<http://www.genetics.org/content/genetics/77/1/71.full.pdf>).
- Brenner, Sydney. 2003a. "Nature's Gift to Science (Nobel Lecture)." *ChemBioChem* 4(8):683–87.

- Retrieved January 14, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898617>).
- Brenner, Sydney. 2003b. "Worms and Science." *EMBO Reports* 4(3):224–26. Retrieved January 14, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634832>).
- Buchan, J. Ross and Roy Parker. 2009. "Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation." *Molecular Cell*.
- California Institute of Technology. 2000. "WormBase." *Database*. Retrieved January 10, 2019 (<https://www.wormbase.org>).
- Cao, Xinmin and Yong Chen. 2009. "Mitochondria and Calcium Signaling in Embryonic Development." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20:337–45. Retrieved September 4, 2018 (https://ac.els-cdn.com/S1084952109000044/1-s2.0-S1084952109000044-main.pdf?_tid=d8b6850e-8ac0-4175-8375-123c9a075ebb&acdnat=1536098707_7eb671c5e846f4da37451e0c55324f74).
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher. 1994. "Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression." *Science (New York, N.Y.)* 263(5148):802–5. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303295>).
- Chaudhari, Snehal N. and Edward T. Kipreos. 2017. "Increased Mitochondrial Fusion Allows the Survival of Older Animals in Diverse *C. Elegans* Longevity Pathways." *Nature Communications* 8(1):182. Retrieved December 7, 2017 (<http://www.nature.com/articles/s41467-017-00274-4>).
- Chen, Qun, Edwin J. Vazquez, Shadi Moghaddas, Charles L. Hoppel, and Edward J. Lesnefsky. 2003. "Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III." *The Journal of Biological Chemistry* 278(38):36027–31. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12840017>).
- Chiaratti, Marcos Roberto et al. 2018. "The Role of Mitochondria in the Female Germline: Implications to Fertility and Inheritance of Mitochondrial Diseases." *Cell Biology International* 42(6):711–24. Retrieved May 30, 2018 (<http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10947>).
- Chipuk, Jerry Edward et al. 2015. "Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes Microenvironment: Targeting Autophagic and Apoptotic Pathways in Cancer Therapy Cell Death and Autophagy."
- Chrencik, Jill E. et al. 2015. "Crystal Structure of Antagonist Bound Human Lysophosphatidic Acid Receptor 1 Structural Analyses of a Human Lysophosphatidic Acid Receptor Reveal Plasticity in Ligand Recognition and Suggest Mechanisms for Modulation of Receptors with Distinct Functions by Common Ligand Scaffolds. Crystal Structure of Antagonist Bound Human Lysophosphatidic Acid Receptor 1." *Cell* 161:1633–43. Retrieved April 16, 2017 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.002>).
- Cinquin, Olivier, Sarah L. Crittenden, Dyan E. Morgan, and Judith Kimble. 2010. "Progression from a Stem Cell-like State to Early Differentiation in the *C. Elegans* Germ Line." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(5):2048–53. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080700>).
- Collins, Y. et al. 2012. "Mitochondrial Redox Signalling at a Glance." *Journal of Cell Science*.

- Corsi, Ann K., Bruce Wightman, and Martin Chalfie. 2015. "A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis Elegans* *." *Caenorhabditis Elegans* 1. Retrieved (<http://www.wormbook.org>).
- Czech, Benjamin and Gregory J. Hannon. 2016. "One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and PiRNA-Guided Silencing." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Daaka, Yehia. 2002. "Mitogenic Action of LPA in Prostate." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Dámazo-Hernández, Angel. 2017. "La Proteína de Unión a RNA GLA-3 Participa En La Respuesta Al Estrés En La Gónada Del *Caenorhabditis Elegans*." Universidad Nacional Autonoma de México.
- Daniele, Joseph R., Kartoosh Heydari, Edgar A. Arriaga, and Andrew Dillin. 2016. "Identification and Characterization of Mitochondrial Subtypes in *Caenorhabditis Elegans* via Analysis of Individual Mitochondria by Flow Cytometry." *Analytical Chemistry* 88(12):6309–16. Retrieved January 8, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27210103>).
- DeHaan, Hunter et al. 2017. "An in Vivo Proteomic Analysis of the Me31B Interactome in *Drosophila* Germ Granules." *FEBS Letters*.
- elegans Sequencing Consortium, The C. 1998. *Genome Sequence of the Nematode C. Elegans: A Platform for Investigating Biology*. Retrieved October 9, 2018 (www.sanger.ac.uk/Projects/C_elegans/).
- Feichtinger, René G., Wolfgang Sperl, Johann W. Bauer, and Barbara Kofler. 2014. "Mitochondrial Dysfunction: A Neglected Component of Skin Diseases." *Experimental Dermatology* 23(9):607–14. Retrieved May 15, 2018 (<http://doi.wiley.com/10.1111/exd.12484>).
- Fernández-Cárdenas, L. P. et al. 2017. "Caenorhabditis Elegans ATPase Inhibitor Factor 1 (IF1) MAI-2 Preserves the Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\psi_m$) and Is Important to Induce Germ Cell Apoptosis." *PLoS ONE*.
- Fire, Andrew et al. 1998. "Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*." *Nature* 391(6669):806–11. Retrieved October 9, 2018 (<http://www.nature.com/articles/35888>).
- Florey, Oliver, Sung Eun Kim, Cynthia P. Sandoval, Cole M. Haynes, and Michael Overholtzer. 2011. "Autophagy Machinery Mediates Macroendocytic Processing and Entotic Cell Death by Targeting Single Membranes." *Nature Cell Biology*.
- Frezal, Lise and Marie Anne Félix. 2015. "C. Elegans Outside the Petri Dish." *ELife*.
- Georg Stoecklin, Tiffany Stubbs, Nancy Kedersha, Stephen Wax, William FC Rigby, T Keith Blackwell, Paul Anderson. 2004. "MK2-induced Tristetraprolin:14-3-3 Complexes Prevent Stress Granule Association and ARE-mRNA Decay." *The EMBO Journal* 18(23):1313–24. Retrieved November 30, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487749>).
- Ghose, Piya, Eun Chan Park, Alexandra Tabakin, Nathaly Salazar-Vasquez, and Christopher Rongo. 2013. "Anoxia-Reoxygenation Regulates Mitochondrial Dynamics through the Hypoxia Response Pathway, SKN-1/Nrf, and Stomatin-Like Protein STL-1/SLP-2" edited by D. A. Garsin. *PLoS Genetics* 9(12):e1004063. Retrieved June 10, 2018

(<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004063>).

- Giorgi, Carlotta, Diego De Stefani, Angela Bononi, Rosario Rizzuto, and Paolo Pinton. 2009. "Structural and Functional Link between the Mitochondrial Network and the Endoplasmic Reticulum." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Grad, Leslie I., Leanne C. Sayles, and Bernard D. Lemire. 2007. "Isolation and Functional Analysis of Mitochondria From the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." Pp. 51–66 in. Humana Press. Retrieved January 8, 2019 (http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-365-3_4).
- Grimm, Stefan. 2012. "The ER-Mitochondria Interface: The Social Network of Cell Death." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.
- Grishok, Alla et al. 2001. "Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs That Control *C. Elegans* Developmental Timing." *Cell* 106(1):23–34. Retrieved October 9, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867401004317?via%3Dihub>).
- Guil, Sonia, Jennifer C. Long, and Javier F. Cáceres. 2006. "HnRNP A1 Relocalization to the Stress Granules Reflects a Role in the Stress Response." *Molecular and Cellular Biology* 26(15):5744–58. Retrieved January 8, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847328>).
- Hall, David H. et al. 1999. *Ultrastructural Features of the Adult Hermaphrodite Gonad of Caenorhabditis Elegans: Relations between the Germ Line and Soma*. Retrieved January 14, 2019 (<http://www.idealibrary.com>).
- Heim, Roger and Roger Y. Tsien. 1996. "Engineering Green Fluorescent Protein for Improved Brightness, Longer Wavelengths and Fluorescence Resonance Energy Transfer." *Current Biology* 6(2):178–82. Retrieved January 10, 2019 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982202004505?via%3Dihub#FIG2>).
- Hillers, Kenneth J., Verena Jantsch, Enrique Martinez-Perez, and Judith L. Yanowitz. 2015. "Meiosis." Retrieved December 7, 2018 (<http://dx.doi.org/10.1895/wormbook.1.73.1>).
- Honda, Shozo et al. 2013. "Mitochondrial Protein BmpAPI Modulates the Length of Mature PiRNAs." *RNA (New York, N.Y.)* 19(10):1405–18. Retrieved January 12, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970546>).
- Horbay, Rostyslav and Rostyslav Bilyy. 2016. "Mitochondrial Dynamics during Cell Cycling." *Apoptosis*.
- Hsieh, Hsi-Lung and Chuen-Mao Yang. 2013. "Role of Redox Signaling in Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases." *BioMed Research International* 484613(18). Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/484613>).
- Huang, Haidong et al. 2014. "AGO3 Slicer Activity Regulates Mitochondria-Nuage Localization of Armitage and PiRNA Amplification." *The Journal of Cell Biology* 206(2):217–30. Retrieved May 18, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25049272>).
- Huang, Huiyan et al. 2011. "PiRNA-Associated Germline Nuage Formation and Spermatogenesis Require MitoPLD Profusogenic Mitochondrial-Surface Lipid Signaling." *Developmental Cell*

- 20(3):376–87. Retrieved May 18, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580711000323?via%3Dihub>).
- Huang, Lue et al. 2011. "Mitochondria Associate with P-Bodies and Modulate MicroRNA-Mediated RNA Interference." *Journal of Biological Chemistry*.
- Huelgas-Morales, Gabriela, Carlos Giovanni Silva-García, Laura S. Salinas, David Greenstein, and Rosa E. Navarro. 2016. "The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis Elegans*." *G3 (Bethesda, Md.)* 6:1031–47. Retrieved January 24, 2017 (www.g3journal.org/lookup/suppl/).
- Ichimiya, Harumi et al. 2002. "Complex II Inactivation Is Lethal in the Nematode *Caenorhabditis Elegans*." *Mitochondrion*.
- Ipsaro, Jonathan J., Astrid D. Haase, Simon R. Knott, Leemor Joshua-Tor, and Gregory J. Hannon. 2012. "The Structural Biochemistry of Zucchini Implicates It as a Nuclease in PiRNA Biogenesis." *Nature* 491(7423):279–83. Retrieved January 12, 2019 (<http://www.nature.com/articles/nature11502>).
- Ishii, Takamasa et al. 2016. "Infertility and Recurrent Miscarriage with Complex II Deficiency-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Animal Models." *Mechanisms of Ageing and Development* 155:22–35. Retrieved May 9, 2018 (https://ac.els-cdn.com/S0047637416300185/1-s2.0-S0047637416300185-main.pdf?_tid=f467a310-0237-46fd-aa5d-8220c8358d4e&acdnat=1525901812_72187f97121aa1b1fba651eb65242627).
- Jackson, Richard J., Christopher U. T Hellen, and Tatyana V Pestova. 2010. "The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11.
- Jagasia, Ravi. 2005. "Mitochondrial Dynamics in *Caenorhabditis Elegans* Programmed Cell Death." Retrieved May 21, 2017 (https://edoc.ub.uni-muenchen.de/4281/1/Jagasia__Ravi.pdf).
- Jantsch, J., V. Martinez-Perez, E. L. Yanowitz, and J. L. Meiosis. 2017. "Meiosis *." Retrieved November 28, 2018 (<http://www.wormbook.org>).
- Jovaisaite, Virginija, Laurent Mouchiroud, and Johan Auwerx. 2014. "The Mitochondrial Unfolded Protein Response, a Conserved Stress Response Pathway with Implications in Health and Disease." *The Journal of Experimental Biology* 217(Pt 1):137–43. Retrieved October 14, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24353213>).
- Karnkowska, Anna et al. 2016. "A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle." *Current Biology*.
- Kedersha, N. et al. 2000. "Dynamic Shuttling of TIA-1 Accompanies the Recruitment of MRNA to Mammalian Stress Granules." *The Journal of Cell Biology* 151(6):1257–68. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121440>).
- Kedersha, N. L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. "RNA-Binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of EIF-2 Alpha to the Assembly of Mammalian Stress Granules." *The Journal of Cell Biology* 147(7):1431–42. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613902>).
- Kedersha, Nancy et al. 2005. "Stress Granules and Processing Bodies Are Dynamically Linked Sites of MRNP Remodeling." *The Journal of Cell Biology* 169(6):871–84. Retrieved January 8, 2019

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15967811>).
- Kimble, J. E. and J. G. White. 1981. "On the Control of Germ Cell Development in *Caenorhabditis Elegans*." *Developmental Biology* 81(2):208–19. Retrieved October 15, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160681902840?via%3Dihub>).
- Kimble, Judith. 2011. "Molecular Regulation of the Mitosis/Meiosis Decision in Multicellular Organisms." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Kimble, Judith, Susan Strome, E. Jane Albert Hubbard, and David Greenstein. 2005. "Introduction to the Germ Line *." in *Wormbook*. WormBook. Retrieved October 15, 2018 (http://www.wormbook.org/chapters/www_introgermline/introgermline.pdf).
- Krichevsky, A. M. and K. S. Kosik. 2001. "Neuronal RNA Granules: A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation." *Neuron* 32(4):683–96. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11719208>).
- Kritikou, Ekaterini A. et al. 2006. "C. Elegans GLA-3 Is a Novel Component of the MAP Kinase MPK-1 Signaling Pathway Required for Germ Cell Survival." *Genes & Development* 20(16):2279–92. Retrieved January 13, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912277>).
- Lant, Benjamin and Kenneth B. Storey. 2010. "An Overview of Stress Response and Hypometabolic Strategies in *Caenorhabditis Elegans*: Conserved and Contrasting Signals with the Mammalian System." *International Journal of Biological Sciences*.
- Lee, Siu Sylvia et al. 2003. "A Systematic RNAi Screen Identifies a Critical Role for Mitochondria in *C. Elegans* Longevity." *Nature Genetics* 33(1):40–48. Retrieved January 8, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447374>).
- Lehmann, Ruth. 2012. "Germline Stem Cells: Origin and Destiny." *Cell Stem Cell*.
- Lim, A. K. et al. 2013. "The Nuage Mediates Retrotransposon Silencing in Mouse Primordial Ovarian Follicles." *Development*.
- Melentijevic, Ilija et al. 2017. "C. Elegans Neurons Jettison Protein Aggregates and Mitochondria under Neurotoxic Stress." *Nature* 542(7641):367–71. Retrieved July 30, 2018 (<http://www.nature.com/articles/nature21362>).
- Mishra, Prashant and David C. Chan. 2014. "Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Morrioni, Manrico et al. 2008. "Intermitochondrial Cement (Nuage) in a Spermatocytic Seminoma: Comparison with Classical Seminoma and Normal Testis." *Virchows Archiv* 453(2):189–96. Retrieved November 28, 2017 (<http://link.springer.com/10.1007/s00428-008-0610-0>).
- Murley, Andrew and Jodi Nunnari. 2016. "The Emerging Network of Mitochondria-Organelle Contacts." *Molecular Cell*.
- Navarro, Rosa E., Eun Yong Shim, Yuji Kohara, Andrew Singson, and T. Keith Blackwell. 2001a. "Cgh-1, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. Elegans*." *Development* 128(17). Retrieved August 2, 2017 (<http://dev.biologists.org/content/128/17/3221.long>).
- Navarro, Rosa E., Eun Yong Shim, Yuji Kohara, Andrew Singson, and T. Keith Blackwell. 2001b.

- "Cgh-1, a Conserved Predicted RNA Helicase Required for Gametogenesis and Protection from Physiological Germline Apoptosis in *C. Elegans*." *Development* 128(17).
- Nicholls, David G. and Stuart J. Ferguson. 2013. "The Cell Biology of the Mitochondrion." *Bioenergetics* 207(November):303–25. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123884251000105>).
- Nishimasu, Hiroshi et al. 2012. "Structure and Function of Zucchini Endoribonuclease in PiRNA Biogenesis." *Nature* 491(7423):284–87. Retrieved January 12, 2019 (<http://www.nature.com/articles/nature11509>).
- Noble, Scott L., Brittany L. Allen, Lai Kuan Goh, Kristen Nordick, and Thomas C. Evans. 2008. "Maternal MRNAs Are Regulated by Diverse P Body-Related MRNP Granules during Early Caenorhabditis Elegans Development." *The Journal of Cell Biology* 182(3):559–72. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18695046>).
- Ohba, Yohsuke et al. 2013. "Mitochondria-Type GPAT Is Required for Mitochondrial Fusion." *The EMBO Journal* 32:1265–79. Retrieved July 10, 2017 (<http://emboj.embopress.org/content/embojnl/32/9/1265.full.pdf>).
- Ohkumo, Tsuyoshi, Chikahide Masutani, Toshihiko Eki, and Fumio Hanaoka. 2008. "Use of RNAi in *C. Elegans*." *Methods in Molecular Biology*.
- Paksa, Azadeh and Erez Raz. 2015. "Zebrafish Germ Cells: Motility and Guided Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 36:80–85. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.07.007>).
- Pane, Attilio, Kristina Wehr, and Trudi Schüpbach. 2007. "Zucchini and Squash Encode Two Putative Nucleases Required for RasiRNA Production in the Drosophila Germline." *Developmental Cell* 12(6):851–62. Retrieved January 12, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543859>).
- Pfanner, Nikolaus et al. 2014. "Uniform Nomenclature for the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System." *J Cell Biol* 204(7):1083–86. Retrieved January 9, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24687277>).
- Ploumi, Christina, Ioanna Daskalaki, and Nektarios Tavernarakis. 2017. "Mitochondrial Biogenesis and Clearance: A Balancing Act." *The FEBS Journal* 284:183–95.
- Protter, David S. W. and Roy Parker. 2016. "Principles and Properties of Stress Granules."
- Qin, Zhao and E. Jane Albert Hubbard. 2015. "Non-Autonomous DAF-16/FOXO Activity Antagonizes Age-Related Loss of *C. Elegans* Germline Stem/Progenitor Cells." *Nature Communications*.
- Rajyaguru, Purusharth and Roy Parker. 2008. "CGH-1 and the Control of Maternal MRNAs." *Trends in Cell Biology* 19(1). Retrieved July 25, 2017 ([http://www.cell.com/trends/cell-biology/pdf/S0962-8924\(08\)00280-8.pdf](http://www.cell.com/trends/cell-biology/pdf/S0962-8924(08)00280-8.pdf)).
- Reunov, Arkadiy A. and Yulia A. Reunova. 2016. "Pre-Meiotic Transformation of Germplasm-Related Structures during Male Gamete Differentiation in *Xenopus Laevis*." *Zygote* 24(01):42–47. Retrieved February 1, 2018 (http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0967199414000690).
- Richardson, Brian E. and Ruth Lehmann. 2010. "Mechanisms Guiding Primordial Germ Cell

- Migration: Strategies from Different Organisms." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Riley, Joel S. and Stephen W. G. Tait. 2016. "Mechanisms of Mitophagy: Putting the Powerhouse into the Doghouse." *Biological Chemistry* 397(7):617–35. Retrieved September 4, 2018 (<http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2016.397.issue-7/hsz-2016-0137/hsz-2016-0137.xml>).
- Rousakis, Aris et al. 2014. "Diverse Functions of mRNA Metabolism Factors in Stress Defense and Aging of *Caenorhabditis Elegans*" edited by D. L. Kontoyiannis. *PLoS ONE* 9(7):e103365. Retrieved January 10, 2019 (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0103365>).
- Runkel, Eva Diana, Ralf Baumeister, and Ekkehard Schulze. 2014. "Mitochondrial Stress: Balancing Friend and Foe." *Experimental Gerontology*.
- Salazar-Roa, María and Marcos Malumbres. 2017. "Fueling the Cell Division Cycle." *Trends in Cell Biology*.
- Salinas, Ls, E. Maldonado, and Re Navarro. 2006. "Stress-Induced Germ Cell Apoptosis by a P53 Independent Pathway in *Caenorhabditis Elegans*." *Cell Death and Differentiation* 13:2129–39.
- Schindelin, Johannes et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 9(7):676–82. Retrieved January 15, 2019 (<http://www.nature.com/articles/nmeth.2019>).
- Scott, Iain and Richard J. Youle. 2010. "Mitochondrial Fission and Fusion." *Essays in Biochemistry* 47:85–98. Retrieved May 24, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20533902>).
- Shaye, Daniel D. and Iva Greenwald. 2011. "OrthoList: A Compendium of *C. Elegans* Genes with Human Orthologs" edited by K. M. Iijima. *PLoS ONE* 6(5):e20085. Retrieved January 10, 2019 (<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0020085>).
- Shimomura, O. 1995. "Cause of Spectral Variation in the Luminescence of Semisynthetic Aequorins." *The Biochemical Journal* 306 (Pt 2)(2):537–43. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887908>).
- Shimomura, Osamu. 2009. "Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP) (Nobel Lecture)." *Angewandte Chemie International Edition* 48(31):5590–5602. Retrieved January 10, 2019 (<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200902240>).
- Shiromoto, Yusuke et al. 2013. "GPAT2, a Mitochondrial Outer Membrane Protein, in PiRNA Biogenesis in Germline Stem Cells." *RNA (New York, N.Y.)* 19(6):803–10. Retrieved January 12, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611983>).
- Sies, Helmut. 2017. "Hydrogen Peroxide as a Central Redox Signaling Molecule in Physiological Oxidative Stress: Oxidative Eustress." *Redox Biology*.
- Silva-García, Carlos Giovanni and Rosa E. Navarro. 2013. "The *C. Elegans* TIA-1/TIAR Homolog TIAR-1 Is Required to Induce Germ Cell Apoptosis." *Genesis* 51(10):690–707. Retrieved January 19, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/dvg.22418>).
- Sulston, J. E. and S. Brenner. 1974. *THE DNA OF CAENORHABDITIS ELEGANS*. Retrieved October 9, 2018 (<http://www.genetics.org/content/genetics/77/1/95.full.pdf>).
- Sulston, J. E. and H. R. Horvitz. 1977. "Post-Embryonic Cell Lineages of the Nematode,

- Caenorhabditis Elegans." *Developmental Biology* 56(1):110–56. Retrieved October 9, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160677901580?via%3Dihub>).
- Sun, A. Y. and E. J. Lambie. 1997. "Gon-2, a Gene Required for Gonadogenesis in Caenorhabditis Elegans." *Genetics* 147(3):1077–89. Retrieved January 15, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9383054>).
- Suthammarak, Wichit, Yu-Ying Yang, Phil G. Morgan, and Margaret M. Sedensky. 2009. "Complex I Function Is Defective in Complex IV-Deficient Caenorhabditis Elegans." *The Journal of Biological Chemistry* 284(10):6425–35. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19074434>).
- Tabara, H., A. Grishok, and C. C. Mello. 1998. "RNAi in C. Elegans: Soaking in the Genome Sequence." *Science (New York, N.Y.)* 282(5388):430–31. Retrieved October 9, 2018 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841401>).
- Tada, Haru, Yuya Taira, Keisuke Morichika, and Tsutomu Kinoshita. 2016. "Mitochondrial Trafficking through Rhot1 Is Involved in the Aggregation of Germinal Granule Components during Primordial Germ Cell Formation in Xenopus Embryos." *Development Growth and Differentiation*.
- Tsang, William Y. and Bernard D. Lemire. 2002. "Mitochondrial Genome Content Is Regulated during Nematode Development." Retrieved September 4, 2018 (<http://www.idealibrary.com>).
- Tsien, Roger Y. 1998. "THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN." *Annual Review of Biochemistry* 67(1):509–44. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>).
- Udagawa, Osamu et al. 2014. "Mitochondrial Fission Factor Drp1 Maintains Oocyte Quality via Dynamic Rearrangement of Multiple Organelles." *Current Biology*.
- Voronina, Ekaterina, Geraldine Seydoux, Paolo Sassone-Corsi, and Ippei Nagamori. 2011. "RNA Granules in Germ Cells." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(12).
- Wai, Timothy and Thomas Langer. 2016. "Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation." *Trends in Endocrinology and Metabolism*.
- Wakai, Takuya, Yuichirou Harada, Kenji Miyado, and Tomohiro Kono. 2014. "Mitochondrial Dynamics Controlled by Mitofusins Define Organelle Positioning and Movement during Mouse Oocyte Maturation." *Molecular Human Reproduction*.
- Walhout, Albertha J. M. et al. 2000. "GATEWAY Recombinational Cloning: Application to the Cloning of Large Numbers of Open Reading Frames or ORFeomes." *Methods in Enzymology* 328:575-IN7. Retrieved January 14, 2019 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007668790028419X?via%3Dihub>).
- Watanabe, Toshiaki et al. 2011. "MITOPLD Is a Mitochondrial Protein Essential for Nuage Formation and PiRNA Biogenesis in the Mouse Germline." *Developmental Cell*.
- Wolke, Uta, Erin A. Jezuit, and James R. Priess. 2007. "Actin-Dependent Cytoplasmic Streaming in C. Elegans Oogenesis." *Development (Cambridge, England)* 134(12):2227–36. Retrieved January 10, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17507392>).

- Wong, Ming-Ching and Jean E. Schwarzbauer. 2012. "Gonad Morphogenesis and Distal Tip Cell Migration in the *Caenorhabditis Elegans* Hermaphrodite." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1(4):519–31. Retrieved January 17, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/wdev.45>).
- Wood, Megan P., Angela Hollis, Ashley L. Severance, Megan L. Karrick, and Jennifer A. Schisa. 2016. "RNAi Screen Identifies Novel Regulators of RNP Granules in the *Caenorhabditis Elegans* Germ Line." *G3 (Bethesda, Md.)* 6:2643–54. Retrieved June 29, 2017 (<http://www.g3journal.org/content/ggg/6/8/2643.full.pdf>).
- Yasuda, Kayo et al. 2006. "Age-Related Changes of Mitochondrial Structure and Function in *Caenorhabditis Elegans*." *Mechanisms of Ageing and Development* 127(10):763–70. Retrieved April 10, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637406001667?via%3Dihub>).
- Yasuda, Kayo et al. 2011. "Interrelationships between Mitochondrial Fusion, Energy Metabolism and Oxidative Stress during Development in *Caenorhabditis Elegans*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404:751–55. Retrieved May 9, 2018 (https://ac.els-cdn.com/S0006291X10022424/1-s2.0-S0006291X10022424-main.pdf?_tid=304177a5-f646-4438-828c-dc16906db032&acdnat=1525901679_d19f14afbd9e18e056dc7a8a23e270b9).
- Zhang, Yongping et al. 2016. "Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis." *Molecular Cell* 61(1):111–24. Retrieved November 27, 2018 (<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515009090>).
- Zhou, Zheng, Erika Hartweg, and H. Robert Horvitz. 2001. "CED-1 Is a Transmembrane Receptor That Mediates Cell Corpse Engulfment in *C. Elegans*." *Cell* 104:43–56. Retrieved May 24, 2017 (http://ac.els-cdn.com/S0092867401001908/1-s2.0-S0092867401001908-main.pdf?_tid=a3fe7bfc-40ac-11e7-b08d-00000aacb361&acdnat=1495649768_bf0ed8370da5e3341f821c6a4b962955).