



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la relación entre el estrés, la fusión celular y la apoptosis en la gónada de *Caenorhabditis elegans*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ENRIQUE MORALES OLIVA

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
[Facultad de Química, UNAM](#)
DR. VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2020



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, del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN208918 y del Instituto de Fisiología Celular.

Enrique Morales Oliva 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 registro 966468.

Agradecimientos al Comité Tutorial:

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez

Agradecimientos al jurado:

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

Dra. Denhi Schnabel Peraza

Dr. Juan Miranda Ríos

Dra. Marina Macías Silva

Dra. María Soledad Funes Argüello

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 Instituto de Fisiología Celular por su valiosa asistencia técnica:

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

A la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular: Ruth Rincón y Abraham Rosas Arellano.

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.

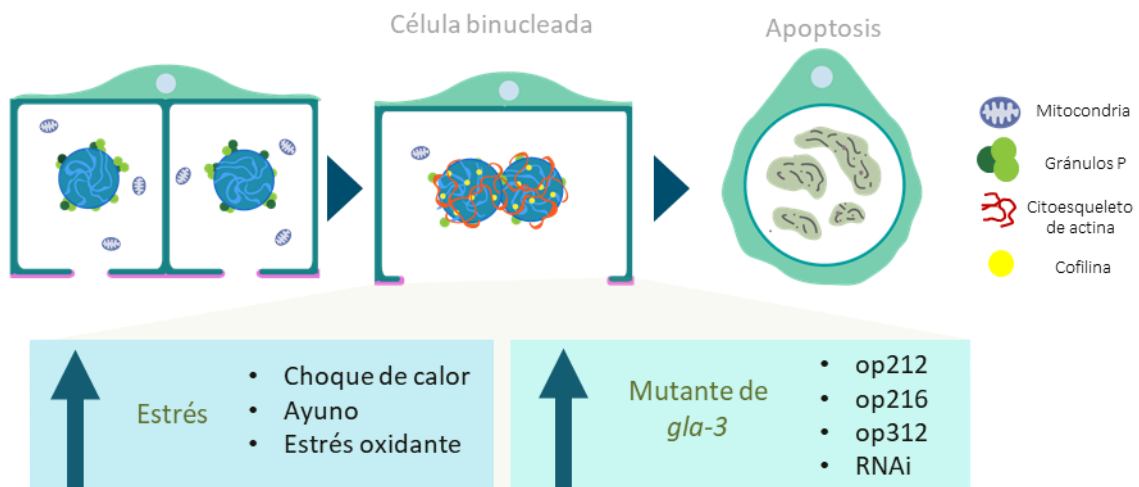
Al personal del taller Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides.

RESUMEN

Durante la ovogénesis en *C. elegans*, aproximadamente el 50% de las células germinales son eliminadas por apoptosis. Otros estudios han identificado que la apoptosis también puede ser inducida por diferentes tipos de estrés o bajo ciertos fondos genéticos. Recientemente se detectó que algunas células germinales se fusionan y forman células binucleadas. Generalmente las células binucleadas son detectadas y eliminadas por apoptosis, aunque algunas llegan a formar ovocitos binucleados. Las razones por las que las células germinales se fusionan y cómo es que son detectadas para ser eliminadas son aún desconocidas.

Mediante la visualización de la morfología nuclear se identificó que durante el choque de calor, ayuno y estrés oxidante el número de células binucleadas incrementa en la gónada de nematodos silvestres. Proponemos que la mayoría de estas células son eliminadas por apoptosis; aunque algunas pueden llegar a formar ovocitos con dos núcleos principalmente en aquellas cepas que no pueden desencadenar apoptosis, como en el caso de mutantes en la proteína de unión a RNA TIAR-1. Además, observamos que las condiciones de estrés como el choque de calor provocan cambios estructurales en la gónada; particularmente observamos que el raquis se adelgaza y las células germinales se hinchan y algunas células se apilan unas sobre otras. Proponemos que estos cambios pudiesen estar provocando la fusión de algunas células germinales. Igualmente encontramos en mutantes con pérdida de función de *gla-3* (op212, op216 y op312) un incremento en el número de células germinales binucleadas. GLA-3/TTP es una proteína de unión a RNA con dedos de zinc cuya ausencia genera problemas de fertilidad, de meiosis, elevada apoptosis entre otros defectos. En este trabajo describimos que la estructura de la gónada de animales *gla-3* (RNAi) está afectada y presenta células germinales apiladas.

Nuestro trabajo sugiere que hay una fuerte correlación entre la estructura de la gónada, la fusión de células y la apoptosis.



Resumen gráfico

Abstract

During oogenesis in *C. elegans*, approximately 50% of germ cells are eliminated by apoptosis. Other studies identified that different types of stress or under certain genetic backgrounds apoptosis increase. Recently it was proved that some germ cells fuse and form binucleate cells. Most of the time, binucleated cells are eliminated by apoptosis, but some binucleate cells can form binucleated oocytes. The reasons why germ cells fuse and how they are eliminated are still unknown.

By visualizing the nuclear morphology, we identified that during heat shock, starvation and oxidative stress the number of binucleated cells increases in the gonad of wild type animals. We propose that most of these cells are eliminated by apoptosis; although some can form oocytes with two nuclei, mainly in those strains that cannot trigger apoptosis, like the TIAR-1 RNA-binding protein.

Furthermore, we observed that stress such as heat shock cause structural changes in the gonad; In particular, we observed a diameter rachis reduction and germ cells swell and some cells stack on top of each other. We believe that these changes could be causing the fusion. We also found in mutants with loss of function of *gla-3* (*op212*, *op216* and *op312*) an increase in binucleated germ cells. GLA-3 / TTP is an RNA-binding protein with zinc fingers, the absence of which generates problems with fertility, meiosis, high apoptosis, among other defects. In this work we describe that the structure of the gonad of *gla-3* animals (iRNA) is affected and presents stacked germ cells.

Our work suggests that there is a strong correlation between gonad structure, cell fusion, and apoptosis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
Generalidades del nematodo <i>C. elegans</i>	7
El ciclo de vida.....	8
La línea germinal del nematodo	9
Apoptosis en la gónada de <i>C. elegans</i>	12
Cambios morfológicos que se presentan durante la apoptosis.	14
Formación de células binucleadas.	18
Fusión celular.....	19
Células binucleadas y apoptosis	23
La proteína de unión a RNA Tristetraprolina.....	23
GLA-3 es uno de los homólogos de TTP en <i>C. elegans</i>	25
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
OBJETIVO GENERAL	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Mantenimiento de cepas.....	27
Sincronización de nematodos.....	27
Silenciamiento mediante dsRNA.....	28
Inducción de estrés	28
Visualización de células binucleadas.....	29
Estudio de la arquitectura de la gónada	30
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	31
Las mutantes de <i>gla-3</i> presentan un incremento en el número de células binucleadas	31
El estrés promueve la formación de células binucleadas	35
Cuando la apoptosis falla, las células binucleadas prevalecen y forman ovocitos	38
El estrés genera cambios en la estructura de las células germinales	39
MPK-1/ERK puede participar en la formación de células binucleadas.....	41
DISCUSIÓN	42
La vía de las MAP cinasas tipo ERK participa en eventos de fusión celular y apoptosis.....	43
GLA-3/TTP y su posible papel en la fusión celular	44
Ovocitos con más de un núcleo	44
Los fusógenos AFF-1 y EEF-1 parecen no participar en la fusión de las células germinales.....	45
CONCLUSIONES	47
PERSPECTIVAS	48
ANEXO.....	50
REFERENCIAS.....	52

INTRODUCCIÓN

Generalidades del nematodo *C. elegans*.

El nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* pertenece al *Phylum* Nematoda, habita en el suelo y en la materia en descomposición, se encuentra distribuido en todo el mundo generalmente en hábitats tropicales y su alimentación se basa principalmente en bacterias, organismos unicelulares eucariontes y levaduras.

En 1963, Sydney Brenner propuso el uso de *C. elegans* como organismo modelo para estudiar la biología del desarrollo y neurobiología. En la actualidad, su genoma se encuentra completamente secuenciado y es utilizado como organismo modelo para estudiar diversas disciplinas tales como la genética, la biología de sistemas, molecular, celular, del desarrollo, el envejecimiento y el comportamiento (Frézal & Félix, 2015).

Entre las características que posee *C. elegans* que lo hacen un buen modelo está su tamaño pequeño, ya que las larvas pueden presentar longitudes promedio de 0.25 mm y los adultos de hasta 1 mm. Además, este nematodo es transparente lo que permite la visualización de estructuras internas con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC), presenta un número constante de células somáticas (957 células) (Sulston & Horvitz, 1977) y debido a que tiene una gran descendencia (300 hijos aproximadamente) es posible realizar experimentos con mayor robustez estadística (Breimann et al., 2019). Este modelo fue el primer animal utilizado para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) y junto con el desarrollo de nuevas técnicas, es posible marcar proteínas y seguirlas a lo largo del desarrollo (Chalfie et al., 1994).

La población de *C. elegans* está conformada por hermafroditas y machos, la proporción de estos últimos es muy baja (0.1-0.2%). El sexo de estos nematodos está definido por la presencia del cromosoma X, los organismos hermafroditas presentan dos cromosomas X mientras que los machos presentan un solo cromosoma X. *C. elegans* no presenta cromosoma Y, por lo que el genotipo de los machos es XO (Zarkower, 2006).

Los hermafroditas tienen la capacidad de autofecundarse, esta característica permite que a partir de un solo animal se pueda generar una población completa, que la progenie sea idéntica, y que se puedan mantener mutaciones con homocigosis. Los organismos hermafroditas también pueden ser fecundados por los machos, cuando ocurre esta fecundación la proporción de machos puede aumentar hasta 50% (Corsi et al., 2015).

El ciclo de vida

Una de las ventajas por la cual *C. elegans* ha sido utilizado como modelo de estudio es su ciclo de vida corto, el cual a 25°C dura 3 días, desde el estadio embrionario hasta el adulto. El ciclo de vida de este nematodo está conformado por la etapa embrionaria, cuatro etapas larvales (L1-L4) determinadas por la síntesis de nueva cutícula y el estadio adulto.

Cuando el embrión presenta 558 células, éste eclosiona y comienza el desarrollo post-embriionario, el cual es regulado por la disponibilidad de alimento, ya que las divisiones celulares se llevan a cabo solo en presencia de alimentos (Altun & Hall, 2009). Una vez que se reanuda la mitosis, continúa el desarrollo de los estadios larvales, estos se inician con la etapa L1 que tiene una duración aproximada de 16 horas y durante este periodo comienza el desarrollo del sistema reproductivo (durante la segunda mitad de L1) y del sistema nervioso (al final de este estadio) (Kimble & Hirsh, 1979). Cada etapa larvaria termina con la muda de la cutícula y la formación de una nueva.

El desarrollo de la larva L2 tiene una duración promedio de 12 horas y se caracteriza porque el desarrollo del sistema nervioso continúa al igual que el sistema reproductivo, en donde las células somáticas y germinales se organizan adoptando la estructura general que presentará la gónada, en donde las células de la punta distal (las cuales dirigen la proliferación de las células germinales) se posicionan en los extremos anterior y posterior de la gónada (Altun & Hall, 2009; Kimble & Hirsh, 1979).

Al término del estadio L2, si las condiciones ambientales no son las óptimas (como serían una alta densidad poblacional, ausencia de alimento o altas temperaturas) los nematodos pueden entrar a un estadio morfológicamente especial llamado *dauer* caracterizado por una disminución en el tamaño de la larva, incremento en el grosor de la cutícula, cierre de la cavidad bucal que evita la ingesta de alimento y disminución en la locomoción (Altun & Hall, 2009), cuando las condiciones vuelven a ser óptimas, las larvas pueden continuar con su desarrollo.

Durante la etapa L3 y la primera parte de L4, se forman los precursores de gónadas somáticas que van a dar origen a la gónada anterior y posterior, las espermatecas y el útero, además los brazos de las gónadas comienzan a reorientarse y los precursores de la vulva comienzan a generar células terminales vulvales a principios del estadio L4 (Kimble & Hirsh, 1979). Al término del estadio L3 se comienzan a formar las espermatidas y durante el estadio L4 inicia la espermatogénesis (Hirsh et al., 1976)

Una vez que termina el estadio L4, los nematodos adultos comienzan con su periodo reproductivo en donde el periodo fértil dura de 3 a 4 días y durante este tiempo los nematodos hermafroditas pueden poner aproximadamente 300 embriones. Terminando el periodo fértil los nematodos viven de 10 a 15 días (Altun & Hall, 2009).

La línea germinal del nematodo

Los nematodos hermafroditas presentan una gónada en forma tubular conformada por dos brazos idénticos que adoptan la forma de U las cuales están recubiertas por epitelio conocido como vaina. Cada brazo de la gónada está compuesto por las células germinales y por componentes de origen somático. Estructuralmente la gónada está conformada por las espermatecas, útero y vulva. En el extremo distal de cada uno de los brazos de la gónada se encuentra la célula de la punta distal (DTC). A la parte más alejada de la punta distal se conoce como el extremo proximal y a la región más cercana al útero en donde se encuentra la espermateca se le conoce como gónada proximal (Figura 1A).

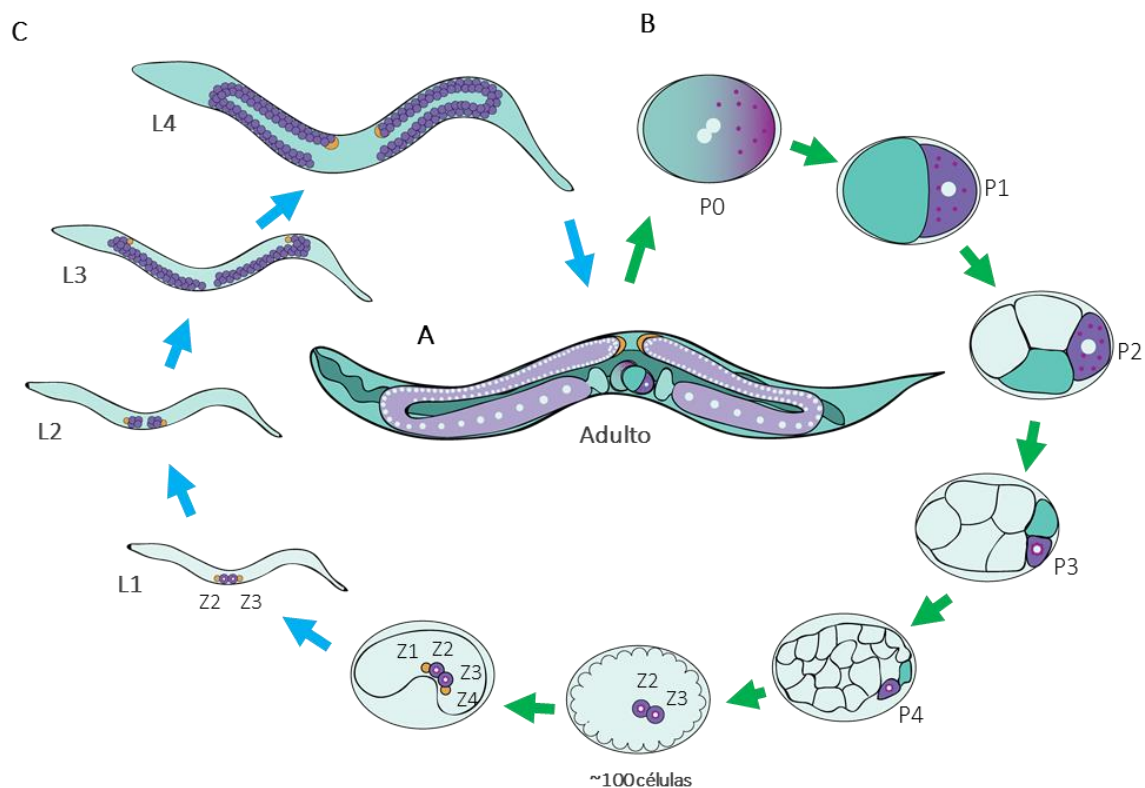


Figura 1. Desarrollo de la línea germinal en *C. elegans*. Esquema del desarrollo de la gónada, los nematodos adultos hermafroditas (A) presentan una gónada con dos brazos (morado) en donde forman los gametos; los ovocitos maduros son fertilizados al pasar por la espermateca (verde) y los embriones tempranos son almacenados en el útero. El panel B representa el desarrollo embrionario, en donde posterior a la fertilización en el embrión de una célula, el plasma germinal (morado) se concentra en el polo posterior. Las divisiones asimétricas siguientes generan que el plasma germinal se concentre solo en las células P2, P3y P4. Finalmente, la división de la célula P4 origina a la célula Z2 y Z3, Previo a la eclosión del embrión, las células somáticas Z1 y Z2 se posicionan a los costados de las células Z2 y Z3. El inicio del desarrollo larval (C) inicia con L1 en donde las células Z2 y Z3 comienzan a proliferar; mientras que las células Z1 y Z4 darán origen a las células DTC (anaranjado). La proliferación de las células germinales continúa durante los estadios larvarios siguientes (L2, L3 y L4) hasta formar ambos brazos de la gónada.

La especificación de la línea germinal se lleva a cabo durante la embriogénesis (Figura 1B). Posterior a la fertilización, el plasma germinal enriquecido de proteínas y RNAs mensajeros (mRNA) se polariza en la región posterior del embrión de una célula, lo cual permite que en las divisiones asimétricas posteriores el plasma germinal se segregue al blastómero P1 (en el embrión de 2 células) y al blastómero P2 (en el estadio de 4 células).

En el estadio previo a las 28 células, ocurre la última división asimétrica a partir de la cual se genera el blastómero somático y la célula germinal primordial denominada P4. Durante la gastrulación (100 células), la división simétrica de P4 da origen a las células Z2 y Z3 quienes no se vuelven a dividir por lo que resta del desarrollo embrionario (Sulston et al., 1983). Durante este estadio, la célula primordial somática también se divide y forma a las células Z1 y Z4 quienes en estadios posteriores darán origen a la DTC y a las células precursoras de las gónadas somáticas (Kimble & Hirsh, 1979).

Después de la eclosión del embrión durante la mitad del estadio L1, las células germinales comienzan a dividirse. Al finalizar el estadio L2, las células somáticas rodean a las células germinales y las células de la punta distal se posicionan y recubren los extremos de las gónadas, esta interacción promueve el destino proliferativo de las células germinales y controla el crecimiento morfogénico de la gónada mediante procesos de migración (Kimble & White, 1981; Pazdernik & Schedl, 2013).

Durante el estadio L3 continúa la proliferación celular y se forma el asa de la gónada (Kimble & White, 1981), la cual termina de formarse en el estadio L4. En el estadio L4 se termina de formar la gónada y es posible apreciar ambos brazos de la gónada con forma de U; al término del estadio L4 se detiene la espermatogénesis y las células germinales que se encuentran en la región proximal comienzan a diferenciarse a ovocitos.

La pérdida de la interacción de las células germinales con la DTC permite que inicie la meiosis, la cual ocurre en la zona de transición. Durante la profase I de la meiosis (leptoteno y zigoteno), los cromosomas se condensan, los cromosomas homólogos se aparean para formar el complejo sinaptonémico. Después de la zona de transición encontramos núcleos en paquiteno, en donde se está llevando a cabo la sinapsis y el entrecruzamiento génico activamente, al finalizar el paquiteno comienza a desensamblarse el complejo sinaptonémico. En la zona del asa, los núcleos entran en diploteno en donde ya se encuentra el complejo sinaptonémico completamente desensamblado y el DNA comienza a compactarse.

En la región más proximal se lleva a cabo la diacinesis, en donde los cromosomas homólogos permanecen unidos por medio de quiasmas, sitios en donde hubo recombinación. En esta etapa la meiosis se detiene en la profase I y se reanuda hasta que el ovocito sea fertilizado (Kimble & Hirsh, 1979; Pazdernik & Schedl, 2013).

Los ovocitos maduros son fertilizados por los espermatozoides al pasar a través de la espermateca y una vez fertilizados son depositados en el útero (J. Kimble & Hirsh, 1979; Pazdernik & Schedl, 2013).

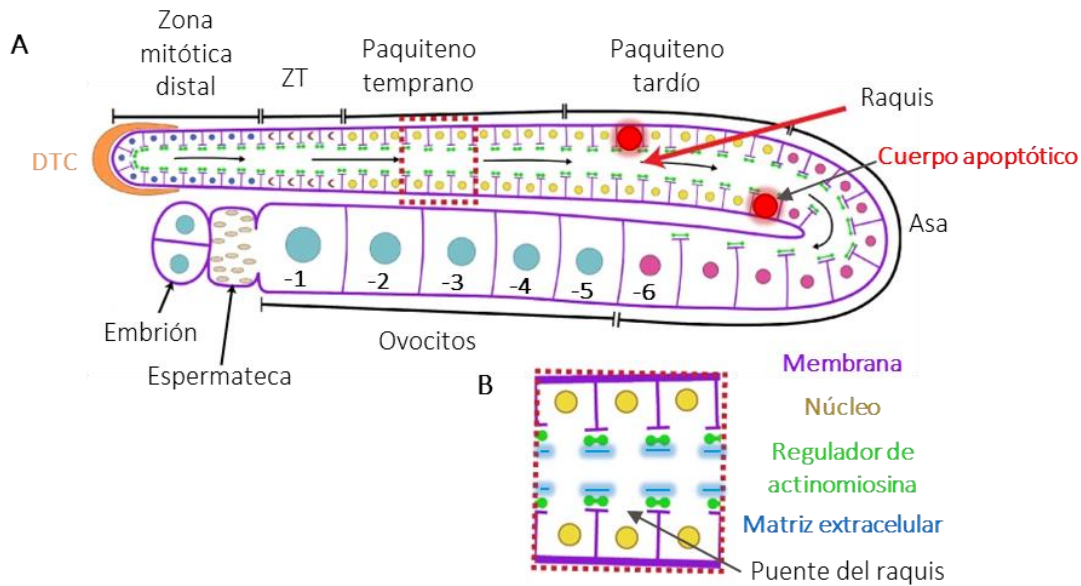


Figura 2. Esquema de la gónada de *C. elegans*. La gónada del nematodo hermafrodita cuenta con dos brazos idénticos en forma de U y por simplicidad se ilustra con detalle la morfología de un brazo. (A). En la zona mitótica distal (la más alejada del útero), las células se mantienen en proliferación debido a una señalización que está dada por la célula de la punta distal o DTC (naranja) las células progresan hacia la zona de transición (ZT), pierden el contacto con la DTC y entran a meiosis. La etapa de paquiteno continúa a lo largo de la gónada hasta la región del asa en donde las células germinales entran a diploteno. Posteriormente, los ovocitos entran a diacinesis y se arrestan en la profase I de la meiosis en la parte proximal de la gónada. (B) La gónada es un sincicio, las células están parcialmente rodeadas por la membrana formando un sincicio que permite que éstas permanezcan conectadas por medio del raquis. Después del asa las células germinales se celularizan. Imagen tomada y modificada de Priti *et al.* (2018)

Una característica importante de la línea germinal de los organismos es que las células están conectadas formando un sincicio (Figura 2). En el caso del *C. elegans*, la gónada forma un tubo en el cual los núcleos de las células germinales (a excepción de los ovocitos maduros) están parcialmente rodeados por las membranas plasmáticas, lo cual permite que su citoplasma esté conectado mediante un canal citoplasmático central conocido como raquis (Hirsh *et al.*, 1976; Riddle *et al.*, 1997).

Por convención, a los núcleos con membranas parciales les llamamos células germinales aunque propiamente no están separadas. Hasta la región proximal de la gónada, los ovocitos succionan del tubo una gran cantidad de citoplasma y se separan del sincicio (Riddle *et al.*, 1997)

Al dividirse las células germinales, quedan conectadas por puentes intercelulares estables (Figura 2B), los cuales son denominados puentes del raquis, estas estructuras están enriquecidas por proteínas de matriz extracelular y actina como es el caso de HIM-4 (Lan *et al.*, 2019) y del regulador de actinmiosina ANI-1/2 (Amini *et al.*, 2014) respectivamente (Figura 3). La presencia de estas proteínas permite que los puentes del raquis permanezcan abiertos formando un anillo (Hirsh *et al.*, 1976).

Apoptosis en la gónada de *C. elegans*

Se ha propuesto que la apoptosis fisiológica se requiere para mantener la fertilidad en los hermafroditas (Andux & Ellis, 2008), ya que regula la producción y calidad de los ovocitos (Angelo & Van Gilst, 2009; Gumienny et al., 1999). Se ha observado que las células apoptóticas pueden fungir como células nodriza para aquellas células que formarán los ovocitos (Wolke et al., 2007).

Entre las proteínas principales que participan en el proceso de muerte celular están: EGL-1/BH3-only, CED-9/Bcl2, CED-4/Apaf-1 y CED-3/caspasa (Figura 3A). La proteína CED-9 se encuentra anclada a la membrana externa mitocondrial y a su vez se encuentra unida a un dímero de CED-4. Para que se lleve a cabo la apoptosis se requiere que la proteína CED-9/Bcl2 sea desactivada. La manera en que se desactiva a CED-9/Bcl2 varía según el mecanismo por el que se active la apoptosis (Gumienny et al., 1999), en su lugar se ha identificado que LIN-13/Rb puede actuar como represor transcripcional de CED-9 (Schertel & Conradt, 2007).

En el caso de la apoptosis somática, se ha identificado que la proteína pro-apoptótica EGL-1 cuenta con un dominio único de BH3 que interactúa con CED-9/Bcl-2 provocando un cambio conformacional que promueve la liberación de CED-4. Una vez que CED-4 se encuentra libre se forma el apoptosoma, el cual está conformado por un tetrámero de CED-4 y proCED-3, mediante una ruptura proteolítica CED-3 es liberada y activada lo cual desencadena la apoptosis (Darland-Ransom et al., 2009; Lettre & Hengartner, 2006).

La apoptosis fisiológica en las células germinales ocurre en la región del asa de la gónada cuando están saliendo de paquiteno. La apoptosis fisiológica también es ejecutada por la maquinaria central de apoptosis (CED-9/Bcl-2, CED-4/Apaf-1 y CED-3/caspasa). Sin embargo, este tipo de muerte no es activada por la proteína pro-apoptótica EGL-1/BH3. Esta muerte es activada parcialmente por la proteína LIN-35 (homóloga del gen de retinoblastoma) quien reprime la expresión del gen *ced-9* (Schertel & Conradt, 2007). Las mutantes de *lin-35* presentan un incremento en *ced-9* lo cual promueve que la apoptosis fisiológica se vea disminuida (Schertel & Conradt, 2007). Además de la apoptosis fisiológica, diversos estímulos externos pueden activar la apoptosis de las células germinales, uno de ellos es la presencia de patógenos, en donde se ha identificado que se requiere de la activación de EGL-1 pero por la vía de CEP-1/p53 (Aballay & Ausubel, 2001).

Otro estímulo que induce apoptosis es el daño a DNA en donde se ha descrito que requiere de CEP-1/p53 (Figura 3C), quien induce la transcripción de EGL-1 y de esta manera induce la apoptosis (Schumacher et al., 2005). Además, se ha demostrado que la radiación ionizante promueve la activación de MPK-1/ERK (Perrin et al., 2013), componente de la vía MAPK activada por Ras. MPK-1 es requerida para promover la salida de las células germinales del paquiteno y para la inducción de apoptosis por daño al DNA (Gartner et al., 2005; Rutkowski et al., 2011).

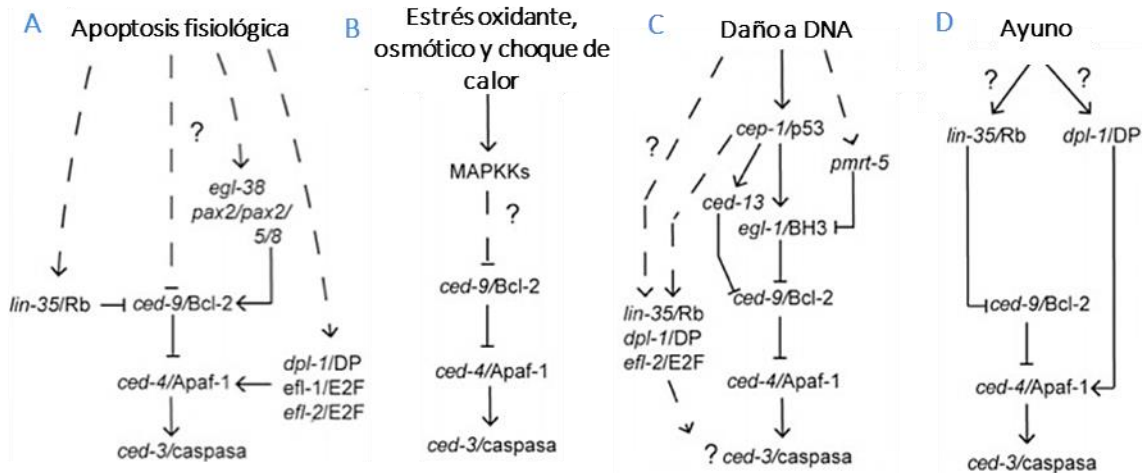


Figura 3. Vías de inducción de apoptosis de las células germinales. La maquinaria central de apoptosis esta mediada por las proteínas CED-9/Bcl-2, CED-4/Apaf-1 y CED-3/caspasa, sin embargo, la inducción de esta varía dependiendo de las condiciones ambientales. **A.** La apoptosis fisiológica puede ser iniciada por las proteínas EGL-38 y PAX-2 quienes promueven la transcripción de *ced-9*, esta vía puede ser reprimida por LIN-35, además en esta vía participan otros genes como *dpl-1/DP*, *efl-1/E2F* y *efl-2/E2F*, pero se desconoce sus mecanismos de regulación. **B.** En condiciones de estrés térmico, oxidante u osmótico se activa la vía de MAPKK, la cual activa la maquinaria central de apoptosis mediante un mecanismo desconocido. **C.** Bajo condiciones de daño a DNA la apoptosis es inducida por *cep-1/p53* y *egl-1/BH3*, los cuales pueden indiciar la activación de *ced-9*. **D.** La apoptosis inducida por ayuno está regulada por los genes *lin-35/Rb* y *dpl-1/DP*, en donde el primero inhibe la expresión de *ced-9*, mientras que *dpl-1* promueve la expresión y activación de *ced-4*. Imagen tomada y modificada de (Lascarez-Lagunas et al., 2014).

La forma en la que MPK-1 participa en la apoptosis es mediante la regulación de los niveles de expresión de GLD-1, quien es el represor de CEP-1 (Rutkowski et al., 2011). Que MPK-1 se encuentre activa depende de la fosforilación de esta proteína, la cual es controlada por la fosfatasa LIP-1, quien a su vez es regulada por la proteína de unión a RNA GLA-3 (Gartner et al., 2005; Kritikou et al., 2006) la cual es motivo de nuestro estudio. Análisis de doble híbrido han identificado que MPK-1 y GLA-3 se encuentran asociadas (Kritikou et al., 2006) por lo cual se ha propuesto que GLA-3 puede participar como regulador negativo de MPK-1 y de esta forma evitar que se induzca apoptosis (Figura 4) (Perrin et al., 2013).

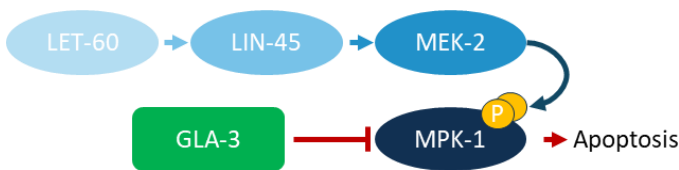


Figura 4. Modelo de apoptosis regulada por GLA-3. La activación de MPK-1/ERK requiere de la participación de los componentes de la vía de MAPK LET-60/Ras, LIN-45/Raf y MEK-2/Mek, en donde este último fosforila a MPK-1. La forma difosforilada de MPK-1 puede inducir apoptosis. GLA-3 es un regulador negativo de MPK-1.

Bajo condiciones de estrés como ayuno, choque de calor, estrés oxidante u osmótico la apoptosis de las células germinales también se encuentra incrementada (Salinas et al., 2006). En ninguna de estas condiciones la apoptosis es regulada por EGL-1. La apoptosis inducida por choque de calor, estrés osmótico y oxidante es activada por la vía de las MAP cinasas cinasas de p38/MEK-1 y Jnk-1/SEK-1, sin embargo, se desconoce cómo es que estas cinasas regulan a las proteínas ejecutoras de la apoptosis (Salinas et al., 2006).

Durante la apoptosis de ayuno se ha identificado que la expresión del mRNA de *lin-35*/RB incrementa y este correpresor transcripcional desregula la expresión de genes necesarios para inducir la apoptosis (*ced-9* y *ced-4*) (Lascarez-Lagunas et al., 2014). El mecanismo por el cual LIN-35 es activado durante el ayuno aún es desconocido y actualmente se está estudiando en el laboratorio.

Cambios morfológicos que se presentan durante la apoptosis.

Una vez que se activó la apoptosis, se llevan a cabo otras dos fases que son la ejecución y eliminación de las células. Las células en apoptosis tienen una serie de cambios en su estructura, algunos de los cuales son utilizados como marcadores para estudiar la muerte celular. La fase de ejecución conlleva una serie de cambios en la morfología celular, algunos de los cuales son descritos a continuación y esquematizados en la Figura 5.

- **Condensación de la cromatina.**

Una particularidad de las células en apoptosis es la condensación y degradación del DNA, lo cual previene la replicación del DNA y la transcripción génica de material comprometido o dañado (He et al., 2009; Samejima & Earnshaw, 2005). Esto se lleva a cabo por la formación de redes de microtúbulos que rodean al núcleo, los cuales provocan que este se contraiga (Raiders et al., 2018).

Acoplado a la condensación, se lleva a cabo la degradación del DNA. Inicialmente se forman fragmentos de alto peso molecular (50-300 kb), los cuales son procesados en fragmentos de bajo peso molecular (180 pb); una vez que las células son fagocitadas, los fragmentos pequeños son degradados completamente a nucleótidos en los fagosomas (Samejima & Earnshaw, 2005). Estos eventos están mediados por nucleasas, en mamíferos se ha identificado la participación de la nucleasa CAD/DFP40. Esta enzima se encuentra inactiva y su activación se da por la caspasa 3 (Liu et al., 1997). La endonucleasa G también participa en la ruptura de los ácidos nucleicos, esta se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria y cuando se activa la apoptosis, se libera y se transloca al núcleo (He et al., 2009).

En el genoma de *C. elegans* no hay homólogos de las nucleasas CAD, por lo que la degradación del DNA es llevada a cabo por las nucleasas NUC-1 (homólogo de la DNAasa II de mamíferos) y por la endonucleasa CPS-6 (homólogas de la endonucleasa G) (He et al., 2009; Wu et al., 2000), la cual durante la apoptosis es liberada de la mitocondria y traslocada al núcleo en donde actúa como nucleasas, el mecanismo por el cual estas enzimas son activadas así como la forma en la degradan

en DNA aún no está completamente descrito, sin embargo, se ha identificado que nematodos mutantes de estas nucleasas son incapaces de cortar el DNA (Parrish et al., 2001).

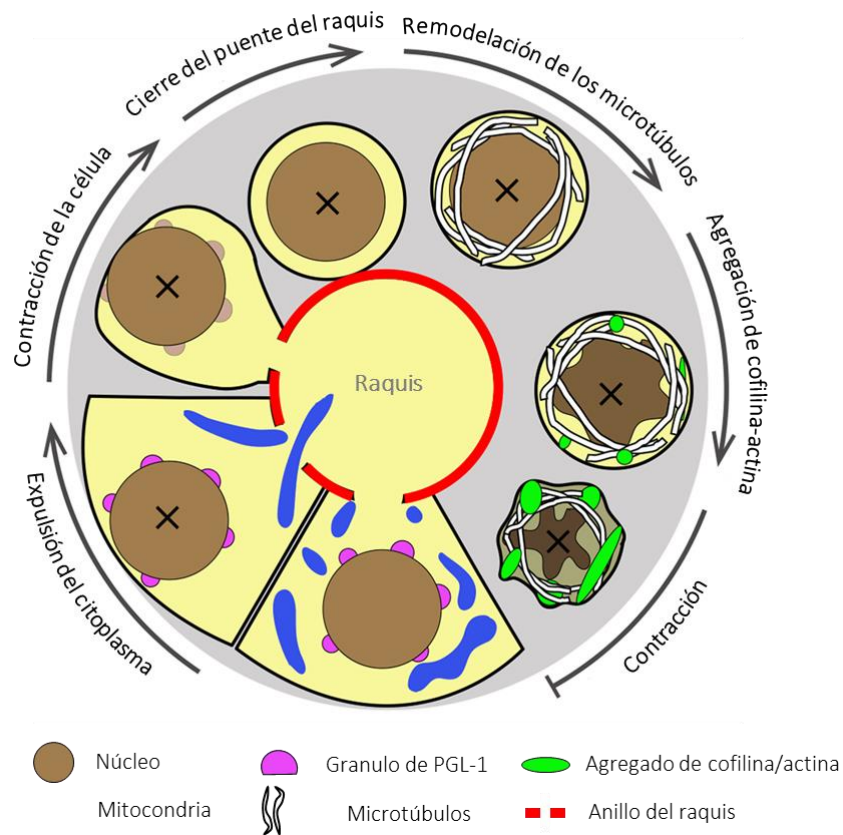


Figura 5. Cambios estructurales de las células germinales asociados a la muerte celular. Durante la apoptosis, las células germinales sufren una serie de modificaciones. Utilizando mutantes del gen *ced-1*, las cuales presentan defectos en la eliminación de las células apoptóticas se observaron los siguientes cambios. Ante la activación de la apoptosis, las células expulsan algunos de los componentes citoplasmáticos (como gránulos P, mitocondrias y el aparato de Golgi) a través de los anillos del raquis. Algunos gránulos de PGL-1 no salen de la célula y permanecen asociados con la membrana nuclear. Posteriormente la célula disminuye su tamaño. Después de la reducción en el tamaño de la célula se promueve el cierre de los anillos de raquis, evitando que el resto de los componentes citoplasmáticos salgan. Los microtúbulos cambian de orientación y rodean al núcleo, formándose agregados de actina y cofilina. Estos cambios promueven la contracción de la célula y la compactación del núcleo y del citoplasma restante. Finalmente, estas células son rodeadas por las células de la vaina para ser eliminadas. Imagen tomada y modificada de (Raiders et al., 2018).

- **Reorganización del citoesqueleto.**

La fase de ejecución de la apoptosis está caracterizada por la contracción celular, en la cual se lleva a cabo la reorganización del citoesqueleto que está mediada por diversas caspasas que participan en su desensamblado.

El citoesqueleto está conformado por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, los cuales participan de manera coordinada para mantener la integridad de la membrana plasmática, participan en la división celular, contribuyen en la morfología celular y proporciona una red para el transporte celular (Ndozangue-Touriguine et al., 2008).

En células en apoptosis de mamífero se han identificado dos procesos de modificación de los microtúbulos, el primero se lleva a cabo durante estadios tempranos de apoptosis en donde los microtúbulos no se despolimerizan, sino que adquieren una organización concéntrica rodeando al núcleo, lo cual promueve la contracción del anillo de actinmiosina y la disminución del tamaño de la célula (Oropesa-Avila et al., 2017). Esto también ha sido observado en la apoptosis de las células germinales de *C. elegans*, en donde se han descrito que ocurren dos eventos de contracción celular, el primero es la “contracción rápida” en donde la célula germinal en proceso de muerte celular disminuye su área aproximadamente 80 minutos antes de ser refráctil (al ser observada al microscopio) y posterior a esto se da la segunda contracción o “contracción lenta” caracterizada por el cierre del puente del raquis (Raiders et al., 2018). Finalmente, cuando las caspasas se encuentran activas, se promueve la despolarización de los microtúbulos (Oropesa-Avila et al., 2017; Povea-Cabello et al., 2017).

Los filamentos de actina también tienen un papel muy importante durante el proceso de muerte celular, se ha observado que en células cultivadas de mamífero el citoesqueleto de actina se fragmenta, ya que es sustrato de caspasas, que rompen la actina en fragmentos pequeños (14kDa) (Mashima et al., 1999).

Se ha propuesto que los filamentos de actina son elementos iniciadores y reguladores de la apoptosis tanto intrínseca (dependiente de caspasas) como extrínseca, ya que la desestabilización de la actina provoca una respuesta apoptótica (Desouza et al., 2012).

Además de la ruptura de los filamentos de actina por caspasas, el desensamble del citoesqueleto también puede ser regulado por proteínas de unión a actina como son las proteínas de la familia ADF/cofilina, las cuales regulan el recambio de filamentos de actina cortando y despolimerizando los filamentos de actina existentes (Desouza et al., 2012). En células en apoptosis de *C. elegans* se ha observado la agregación de estas proteínas alrededor del núcleo (Raiders et al., 2018).

- **Alteración en la membrana plasmática.**

Muchos de los cambios en la integridad de la membrana plasmática son generados por la remodelación del citoesqueleto durante la fase de ejecución de la apoptosis. Dentro de los cambios más notables de la membrana se encuentra la formación de protuberancias circulares, proceso también conocido en inglés como *blebbing* y la formación de los característicos cuerpos apoptóticos (Zhang et al., 2018).

En células de mamífero se ha identificado que la formación de las protuberancias es dependiente de la caspasa 3, la cual activa a ROCK1, encargada de regular el ensamblaje de los filamentos de

actina-miosina (Sebbagh et al., 2001). En *C. elegans* se observó la activación de LET-502/ROCK1 durante condiciones de estrés metabólico como la falta de alimento (Gurkar et al., 2013).

Uno de los cambios más tempranos en la estructura de la membrana plasmática de las células en iniciar apoptosis es la traslocación de fosfolípidos. De hecho, es uno de los marcadores usados para detectar fases iniciales de la apoptosis (Chaurio et al., 2009). Los fosfolípidos se distribuyen de manera asimétrica en la membrana plasmática de las células eucariotas, generalmente la fosfatidilcolina y los esfingolípidos se encuentran orientados hacia afuera de la célula mientras que la fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina y los fosfoinosítidos se encuentran enriquecidos en la capa lipídica que se orienta hacia el interior celular; durante la apoptosis ocurre la traslocación de PS, la cual ahora es orientada hacia el espacio extracelular, esta traslocación promueve que las células que entran en apoptosis sean reconocidas y fagocitadas, ya que la PS puede ser reconocida por diversos receptores o adaptadores (Chaurio et al., 2009; van den Eijnde et al., 1998).

La traslocación de la PS puede ser realizada mediante tres mecanismos: 1. Mediado por ATPasas tipo P (flippasas o traslocasas) las cuales realizan el transporte activo de análogos de aminofosfolípidos. 2. Por escramblasas (*scramblases*) las cuales están implicadas en la pérdida de la asimetría de la membrana ya que son traslocadores de fosfolípidos independientes de ATP. 3. Por transportadores de casete de unión a ATP (ABC) los cuales forman canales impulsados por ATP, que transportan diversos sustratos, entre ellos lípidos. (Chaurio et al., 2009).

Se considera que la traslocación de la PS es un proceso conservado, el cual ha sido observado durante el desarrollo embrionario en diferentes modelos como ratón y pollo (van den Eijnde et al., 1998). En *C. elegans* se ha descrito que la traslocación depende principalmente de dos proteínas, las cuales son CED-7 (homólogo a los transportadores ABC) (Wu & Horvitz, 1998) y TAT-1 (homólogo a los transportadores ATPasas tipo P) (Züllig et al., 2007).

- **Cambios en la estructura de organelos citoplasmáticos.**

Dentro de los cambios que ocurren en los organelos citoplásmicos durante la apoptosis, destacan el cambio en la estructura del citoesqueleto (el cual fue previamente descrito) y modificaciones del retículo endoplásmico.

Hasta el momento, solo se ha descrito que la organización del sistema vacuolar que conforma al retículo endoplásmico alargándose incrementando su tamaño; además de que su distribución se vuelve menos uniforme (Bottone et al., 2013). Algo similar ocurre con el aparato de Golgi, del cual se ha descrito en cultivos celulares que durante la apoptosis disminuyen su número de cisternas, se fragmentan y se agregan en el citoplasma (Bottone et al., 2012).

Debido a que las mitocondrias participan en la apoptosis celular, se conoce con mayor profundidad los diferentes mecanismos que las afectan. En células de mamíferos se sabe que las mitocondrias de células en apoptosis reducen su densidad en un 30%, además de que se fragmentan, lo que provoca que se formen agregados y masas más compactas en el citoplasma mientras que otras

mitocondrias se agregan en la región perinuclear. Análisis de microscopía electrónica indican que las mitocondrias de células en apoptosis presentan alteraciones en sus crestas, son más pequeñas y algunas se hinchan (Bottone et al., 2013; Giansanti et al., 2013).

En *C. elegans* se ha observado que previo a la contracción de las células en apoptosis, las mitocondrias salen a través del puente del raquis del sincicio (Figura 5) y el movimiento está regulado por la reorganización de los microtúbulos y por las proteínas de transporte mitocondrial como kinesinas (Raiders et al., 2018), mientras que las mitocondrias que permanecen dentro de la célula en apoptosis se fragmentan (Rolland & Conradt, 2006).

Formación de células binucleadas.

Uno de los cambios estructurales de las células apoptóticas menos reportados en la literatura, es la formación de células binucleadas.

Diversos estudios han relacionado la presencia de células binucleadas (o multinucleadas) con el desarrollo de diferentes patologías, como es el cáncer ya que muestras histológicas o biopsias presentan células con más de un núcleo (Stoll et al., 2011) o con procesos de muerte celular (Nishimura et al., 2016; Raiders et al., 2018; Rios et al., 2016). Sin embargo, la formación de células binucleadas es requerida para el desarrollo normal de diferentes órganos sinciciales como el corazón, células musculares, progenitores de megacariocitos, parénquima hepático, vejiga, entre otros.

Diversos estudios indican que la formación de los sincicios puede darse por dos procesos, en el primero son sincicios programados fisiológicamente, es decir que forma parte de un programa de desarrollo normal o fisiológico controlado, mientras que en el segundo proceso la formación se da bajo condiciones patológicas en donde células diploides de animales o plantas son capaces de cambiar a un estado poliploide por la influencia de factores ambientales como virus (Weng et al., 2009), estrés oxidante (Pandit et al., 2013) o daño al DNA (Davoli & de Lange, 2012; Pandit et al., 2013), pero muchas veces la formación de células multinucleadas bajo condiciones patológicas es un proceso accidental, por lo cual se desconocen los mecanismos que lo regulan.

El estudio de los sincicios ha identificado que pueden formarse mediante dos mecanismos (Figura 6). El primer mecanismo consiste en defectos en la citocinesis, el cual es uno de los pasos finales de la división celular (Figura 6B), en donde defectos en la expresión y/o actividad de proteínas que participan en la escisión celular permiten que las células en división permanezcan conectadas por puentes citoplasmáticos (Burgess & Chang, 2005) o que las células compartan todo el citoplasma (Bai et al., 2020; Rahman et al., 2015).

De manera general los sincicios se pueden definir como células carentes de barreras membranosas entre núcleos adyacentes, por lo cual los sincicios también pueden ser considerados como células multinucleadas. El estudio de los sincicios ha permitido conocer algunos de los mecanismos por los cuales se pueden formar células bi o multinucleadas.

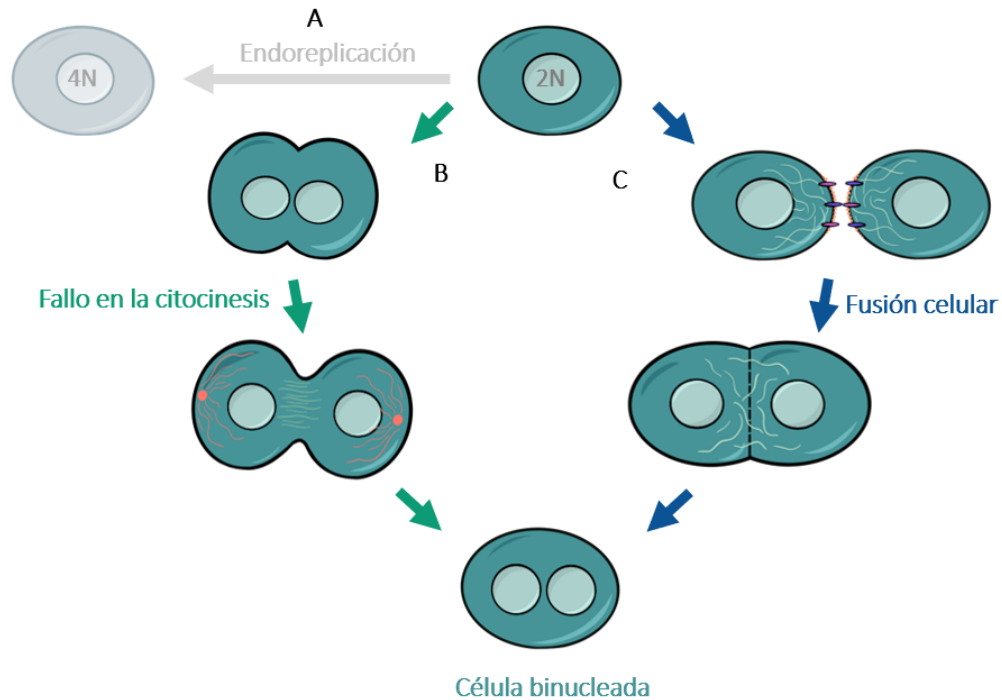


Figura 6. Mecanismos para la formación de células binucleadas. La formación sincicios se puede llevar a cabo por diferentes eventos. **A.** Durante la endoreplicación o endoduplicación, las células presentan variaciones en el ciclo celular ya que solo presentan G1 – S – G2 lo cual da como resultado células con un núcleo poliploide (Lee et al., 2009). Debido a que el producto final es una célula con un solo núcleo con doble carga génica esta vía no se considera que forme células binucleadas. **B.** Durante la mitosis, algunas células presentan alteraciones en la citocinesis, que es uno de los pasos finales para que permite que se separen las células. Estas alteraciones pueden presentarse durante la especificación del plano de escisión, la entrada del surco de escisión, la formación del anillo contráctil o la abscisión, lo cual da como resultado que las células queden conectadas por puentes citoplasmáticos. **C.** En el tercer mecanismo de formación de células binucleadas no interviene el ciclo celular; en su lugar dos células que están lo suficientemente cercanas fusionan sus membranas plasmáticas permitiendo que todos los componentes citoplasmáticos (incluidos los núcleos) interactúen.

El segundo mecanismo por el cual se forman los sincicios es por fusión celular (Figura 6C), en el cual dos células que se encuentran físicamente cercanas fusionan sus membranas plasmáticas y comparten su citoplasma. Se ha descrito que la fusión celular es el mecanismo que forma las células binucleadas la gónada de *C. elegans* hermafroditas adultos (Raiders et al., 2018).

Fusión celular

De manera general la fusión celular puede definirse como el proceso por el cual las células unen sus membranas plasmáticas para compartir su citoplasma (Figura 6C) (Oren-Suissa & Podbilewicz, 2010). Es un proceso altamente regulado y conservado evolutivamente, ya que en la mayoría de los organismos el inicio de la vida se origina a partir de la fusión de los gametos, además algunas estructuras embrionarias y órganos se forman mediante la fusión de células como son la placenta,

músculo esquelético, huesos, sistema inmune entre otros, además de que algunos procesos de regeneración como son la regeneración en hígado, cerebro, músculo, pulmón e intestino conllevan la fusión de células (Willkomm & Bloch, 2015).

Ya que las células fusionadas pueden estar presentes en diferentes tejidos, las funciones que se le han asociado son tan amplias como los tejidos que conforman, participando en procesos de inmunidad, transporte, locomoción, reproducción, crecimiento, alimentación, osmorregulación, percepción sensorial por mencionar algunos (Oren-Suissa & Podbilewicz, 2010). Las células fusionadas pueden formar sincicios, los cuales les permiten adoptar formas que funcionan eficientemente mediante la presencia de estructuras estables como anillos (Podbilewicz, 2000).

A pesar de que la fusión célula – célula está presente en una gran cantidad de organismos, no se conoce a profundidad cómo es que ocurre este proceso o cuáles son los elementos que lo regulan, se ha propuesto que la fusión celular es un proceso que se encuentra genéticamente programado, el cual está dividido en tres etapas:

- 1) Competencia: requieren células diferenciadas o competentes, es decir, que estas células sean capaces de responder y de generar respuestas extracelulares, como la capacidad de polarizarse, migrar, presentar cambios morfológicos y que presenten moléculas en la superficie que son requeridas para el siguiente paso.
- 2) Compromiso: durante este paso se debe de llevar a cabo la adhesión célula- célula, además de que las células deben de encontrarse polarizadas y la maquinaria de fusión debe encontrarse activa.
- 3) Fusión celular: en este último paso se lleva a cabo la correcta fusión de las membranas plasmáticas y los citoplasmas se conectan (Aguilar et al., 2013).

Para que ocurra el intercambio del contenido citoplásmico se requieren de diversos eventos que permitan que las células estén preparadas para fusionarse y uno de ellos es la polarización celular. Gran parte de la información de la polarización de las células proviene de modelos no animales, como son los hongos, principalmente de *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*.

En las levaduras se ha identificado que la fusión celular durante la conjugación requiere de un gradiente de feromonas, las cuales se une al receptor para activar una cascada de señalización mediada por las cinasas de la vía MAP. Como consecuencia, se detiene el ciclo celular en G1 y se induce la transcripción de más de 100 genes (Aguilar et al., 2010), dentro de los que se encuentran remodeladores del citoesqueleto de actina que polarizan a las células (Ydenberg & Rose, 2008).

En el paso de competencia uno de los requisitos para la fusión celular es la presencia de moléculas en la superficie de membrana. Algunas de ellas pueden ser receptores que le permitan identificar y responder ante una señal (como es el caso de las levaduras y la respuesta de polarización ante las feromonas) (Aguilar et al., 2010) pero también se han identificado otras moléculas que deben estar presentes, una de ellas es la fosfatidilserina.

En el apartado de apoptosis, se describió que uno de los marcadores de fagocitosis es la presencia de fosfatidilserina orientada hacia el espacio extracelular que permite que las células apoptóticas sean reconocidas y fagocitadas (Chaurio et al., 2009). También se ha visto que la PS puede ser una señal para promover la fusión celular (Figura 7A).

En cultivos de mioblastos se observó que previo a la fusión celular ocurría la traslocación de la PS y además se observó un enriquecimiento de esta en los puntos de contacto (Hochreiter-Hufford et al., 2015; Jeong & Conboy, 2011; Verma et al., 2018). La traslocación de la PS es llevada a cabo por ATPasas tipo P, que activan a diferentes GTPasas que a su vez regulan al citoesqueleto (Tsuchiya et al., 2018)

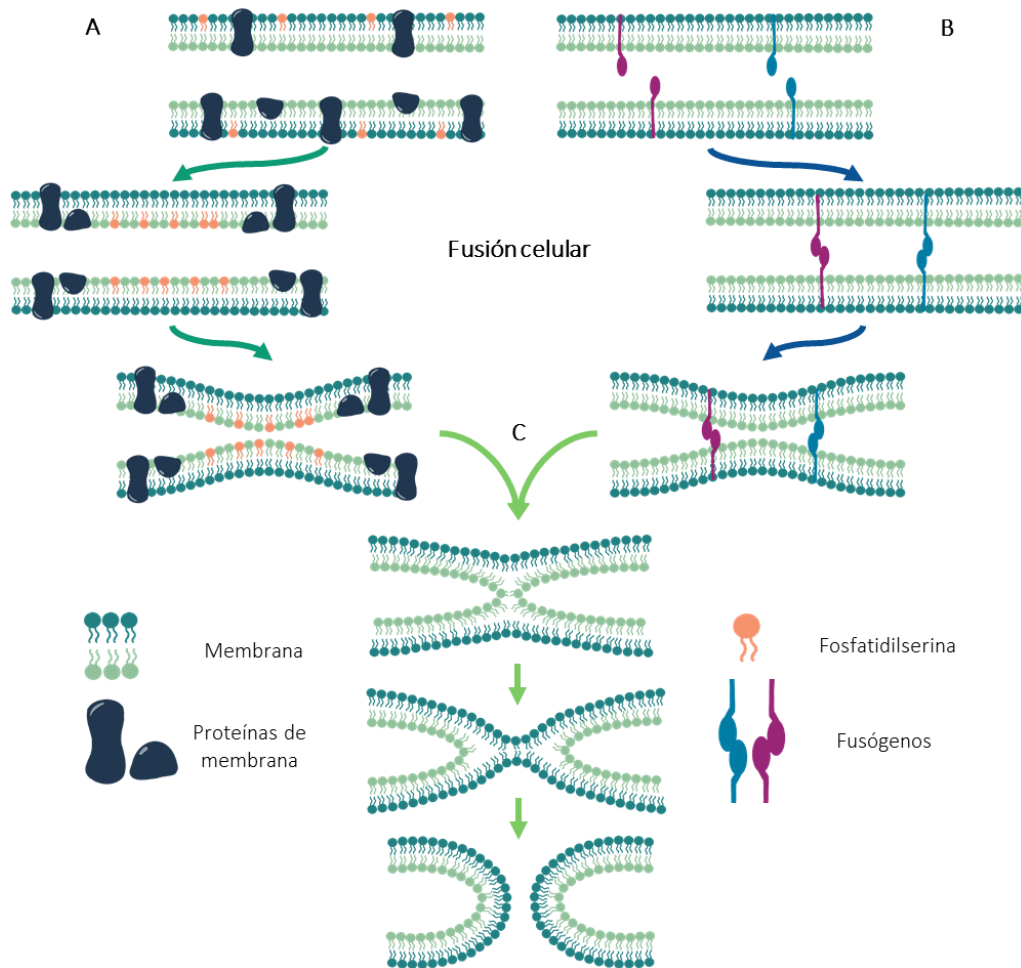


Figura 7. Modelos de fusión celular. La fusión celular puede llevarse a cabo por mecanismos dependientes o independientes de fusógenos. (A) Para que se pueda llevar a cabo la fusión se requiere de la remoción de las proteínas de membrana, ya que pueden ser un impedimento para que el citoesqueleto interactúe, además se lleva a cabo la traslocación de la PS la cual se orienta hacia el espacio extracelular y se agrega en las zonas de contacto. (B) En el caso de los fusógenos, estos deben estar expresados en ambas células. Los fusógenos promueven que las membranas se aproximen y que se lleve a cabo el intercambio celular. (C) Una vez que las membranas plasmáticas se encuentran lo suficientemente cercanas (ya sea por el mecanismo dependiente o independiente de fusógenos) las membranas plasmáticas se fusionan. Imagen basada en (Willkomm & Bloch, 2015).

Otros estudios han demostrado que la traslocación de la PS no solo se requiere para la fusión célula – célula, sino que esto también se observa durante la entrada de los virus a las células. Un ejemplo es el caso del virus del VIH-1, el cual induce mediante Ca^{2+} la traslocación de PS mediado por escramblasas, lo cual favorece la fusión de la membrana del virus con la membrana de la célula (Zaitseva et al., 2017).

Otro lípido que participa, pero de manera inversa en la fusión celular es la lisofosfatidilcolina ya que se ha visto que las células tratadas con este lípido son incapaces de formar canales de hemifusión (Chernomordik & Kozlov, 2003; Benjamin Podbilewicz et al., 2006; Verma et al., 2018).

Para que la fusión celular pueda llevarse a cabo, también es necesario la remoción de proteínas de membrana especialmente en los sitios de contacto (Figura 7A), ya que las proteínas de membrana pueden limitar el movimiento de las proteínas del citoesqueleto (Eitzen, 2003). Hasta ahora se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas de membrana son eliminadas, pero se ha propuesto que MUNC18 (UNC-13 en *C. elegans*) puede participar en la remoción (Martens & McMahon, 2008).

Para que las células puedan fusionarse correctamente se requiere que éstas se aproximen e interactúen, lo cual está regulado y mediado por fusógenos. Los fusógenos son proteínas que se encuentran sobre las membranas que facilitan o promueven que la fusión se lleve a cabo de manera controlada y regulada evitando que la reacción sea espontánea (Figura 7B) (Segev et al., 2018). Las primeras proteínas fusógenas fueron identificadas en membranas virales, las cuales son responsables de la unión y fusión de las membranas virales con las de la célula huésped, estas proteínas fueron identificadas en el virus de la gripe, VIH, hepatitis, dengue y zika (Segev et al., 2018).

Las fusógenos virales pueden ser clasificados en tres clases: Clase I: la proteína está conformada en su mayoría por α hélices; Clase II: están compuestos principalmente de láminas β ; y Clase III presentan una mezcla de α hélices y láminas β (Harrison, 2015). El mecanismo de las tres clases de fusógenos es parecido: inicia con la activación de los fusógenos, lo cual genera la exposición del péptido de fusión que entonces es insertado en la membrana de la célula hospedera. Esto promueve que se dé un cambio en la estructura del complejo fusogénico formando una horquilla que genera la fuerza de atracción que permite que las dos membranas se acerquen y se forma un tallo de hemifusión el cual tiene a expandirse por la fusión de las membranas (Figura 7C) (Brukman et al., 2019; Segev et al., 2018).

Actualmente, se han descrito varios fusógenos presentes en células animales, siendo los fusógenos AFF-1 y EFF-1 (*epitelial fusion-failure*) identificados en *C. elegans* de los mejor caracterizados. Estas proteínas de fusión participan en el desarrollo normal de los nematodos, promoviendo que las células epiteliales se fusionen durante el desarrollo embrionario (Mohler et al., 2002; Podbilewicz & White, 1994). Además, se ha observado que cuando estas proteínas son expresadas en otros tipos celulares (que normalmente no se fusionan) se promueve su fusión y la formación de células binucleadas (B. Podbilewicz et al., 2006; Sapir et al., 2007).

Células binucleadas y apoptosis

El mecanismo por el cual las células se fusionan y posteriormente son eliminadas por apoptosis aún es desconocido, sin embargo, esto ha sido observado en distintos modelos experimentales.

En líneas celulares humanas (HeLa) cultivadas en ausencia de medio de cultivo se observa una mayor incidencia de células binucleadas, de las cuales entre el 50 al 80% mueren por apoptosis, mientras que el resto puede continuar con su ciclo celular (Nishimura et al., 2016). Un patrón similar se observa en las células luminales de glándulas mamarias, las cuales pueden presentar células con dos núcleos en donde la mayoría son eliminadas por apoptosis (Rios et al., 2016).

Uno de los modelos del que existe una mejor descripción de la relación entre la formación de las células binucleadas y la apoptosis es la gónada de *C. elegans*. Se ha observado que entre el 20 y 30% de todas las células que son eliminadas por apoptosis presentan más de un núcleo (Raiders et al., 2018). Las células binucleadas han sido observadas en mutantes de *ced-1/p53*, *egl-1/BH3* componentes de la maquinaria central de apoptosis, *pch-2/TRIP13* quien codifica para una proteína que forma parte del complejo sinaptonémico y en menor proporción en nematodos silvestres (Bohr et al., 2016; Raiders et al., 2018)

En las mutantes antes mencionadas y en menor proporción en nematodos silvestres, la formación de células binucleadas se lleva a cabo en la región mitótica distal de la gónada, lo cual permite que las células binucleadas puedan progresar por el brazo distal hasta llegar al asa en donde son eliminadas por apoptosis, sin embargo, se ha observado que algunas llegan a formar ovocitos (Raiders et al., 2018).

Se ha identificado que las células binucleadas se forman al finalizar la mitosis, en la parte distal de la gónada por fusión celular, aunque se ha descartado que la fusión celular esté mediada por los fusógenos AFF-1 y EFF-1 (Raiders et al., 2018). Una vez que se forman las células binucleadas, estas pueden progresar a través de la gónada pasando por la zona de transición y llegan hasta la región de paquitenio, en donde la mayoría son eliminadas por apoptosis (Raiders et al., 2018).

A pesar de que se ha observado la presencia de células binucleadas, aún no se conocen los mecanismos que median la fusión celular, ni cual es la señal que favorece la formación de estas células.

La proteína de unión a RNA Tristetraprolina

Tristetraprolina (TTP) es una proteína de unión a RNA que forma parte de la familia TIS11. En mamíferos está conformada por cuatro miembros: TIS11 (ZFP36, TTP, Nup475, GOS24), TIS11b (Berg36, ERF-1, ZFP36L1, BRF1), TIS11d (ZFP36L2, ERF-2, BRF-2) y Zfp36l3, aunque este último miembro solo ha sido identificado en la placenta de roedores (Baou et al., 2009).

Dependiendo del organismo en el que se encuentre, esta proteína puede recibir diferentes nombres como NUP475, GOS24 y TIS11. La expresión de esta familia de proteínas ha sido

identificada en organismos vertebrados (a excepción de aves), insectos (un solo miembro), anfibios como *Xenopus laevis* y *Silurana tropicalis* (cuatro miembros), *S. cerevisiae* (dos miembros) y *C. elegans* (cinco genes codifican para proteínas con dominios de dedos de zinc) (Brooks & Blackshear, 2013; De et al., 1999; Lai et al., 2013).

Estructuralmente esta proteína está conformada por dominios tipo dedo de zinc CCCH en tándem, el cual se une a los elementos ricos en adenina/uridina (ARE) en las regiones 3' no traducidas (3'UTRs) de mRNA específicos (Patial & Blackshear, 2016).

Los mRNAs blanco de las proteínas TTP son variables, algunos de los primeros identificados fueron el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Taylor et al., 1996). Actualmente ya se han identificado más de una docena de mRNAs que codifican para genes de respuesta inmune (TNF, GM-CSF, IL2, IL3, IL6, IL10, IL12, Ccl2, Ccl3 y MIP-2), factores de crecimiento (VEGF), metabolismo (ciclooxigenasa y galactosiltransferasa), factores de transcripción (Fos, C-myc, Pitx2 y E47), ciclo celular (ciclina D1, p21 y polo-like cinasa 3) y el mRNA de la misma tristetraprolina (Baou et al., 2009). Algunos de los mRNAs que se unen a TTP se encuentran resumidos en la Figura 8.

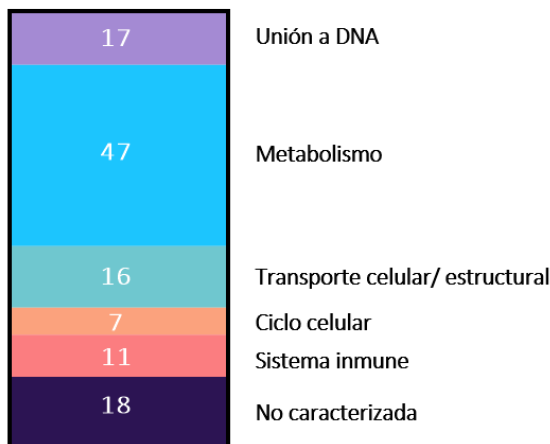


Figura 8. Gráfica que muestra el número de mRNA asociados a TTP por categoría. La mayoría de los mRNAs codifican para genes que participan en el metabolismo (47 genes que corresponden al 40.52%). También hay mensajeros cuyos productos participan en otros procesos celulares como transporte celular o proteínas asociadas a la remodelación del citoesqueleto (13.79%), sistema inmune (9.48%), RNAs mensajeros cuyos productos participan en el ciclo celular y otros que no han sido caracterizados. Datos obtenidos de (Stoecklin et al., 2008).

Análisis *in vitro* han identificado diferentes sitios de fosforilación para TTP (Cao & Lin, 2008). Algunas de las proteínas que fosforilan a TTP son MK2, ERK, p38 y JNK (Cao & Lin, 2008; Chrestensen et al., 2004). Se ha observado que la fosforilación de TTP puede regular a qué tipo de mRNA se encuentra asociada esta proteína (Cao & Lin, 2008).

Bajo condiciones de estrés, que induce que la transcripción se detenga, la proteína TTP puede agregarse formando gránulos de estrés (Stoecklin et al., 2004), los cuales contienen factores de inicio de la traducción y mRNA no traducidos (Brooks & Blackshear, 2013). La forma fosforilada de esta proteína permite que se forme un complejo con las proteínas 14-3-3, que las estabiliza y permiten la traducción de los mRNA que se asocian a ellas (Sandler & Stoecklin, 2008).

TTP tiene diferentes funciones, dentro de las más estudiadas destacan su papel en la respuesta inmune y en procesos inflamatorios (Sanduja et al., 2012). También se ha identificado que esta proteína es necesaria para regular la calidad de los ovocitos en ratones (X. Liu et al., 2016). Se ha observado en ovocitos de ratón que TTP colocaliza con los cromosomas, y que el silenciamiento de TTP afecta la polimerización de actina lo cual evita que los cromosomas se alineen, generando aneuploidías y evita que los gametos maduren (X. Liu et al., 2016).

GLA-3 es uno de los homólogos de TTP en *C. elegans*

GLA-3 es una proteína de *C. elegans*, la cual es homóloga a la tristetraprolina (Kritikou et al., 2006). En este nematodo se han identificado diversos genes homólogos a TTP que codifican para proteínas con dominios de dedos de zinc. La proteína GLA-3 presenta dos isoformas que son producto de un *splicing* alternativo; ambas se expresan durante el estadio adulto, embrión temprano y larva L4 (Kritikou et al., 2006).

En nematodos que tienen silenciada la expresión de *gla-3* o que presentan una pérdida de función se observa un incremento en la apoptosis de las células germinales (Chen et al., 2010; Kritikou et al., 2006; Morthorst & Olsen, 2013; Wang et al., 2010). Sin embargo, el incremento en la apoptosis no se observa en células somáticas (Kritikou et al., 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células germinales pueden ser eliminadas por apoptosis por varios motivos, uno de ellos es servir como células nodrizas ya que al ser eliminadas ceden sus componentes a las células germinales que formarán a los ovocitos. Otra razón es que las células germinales tienen defectos en su genoma.

En la gónada del nematodo *C. elegans* se ha observado la presencia de células germinales binucleadas, las cuales casi siempre son eliminadas por apoptosis (Raiders et al., 2018). Este fenotipo se genera por la fusión de dos o más células, sin embargo, se desconoce el mecanismo que promueve su fusión.

Previamente en el laboratorio se observó que el estrés incrementa considerablemente la apoptosis de las células germinales (Salinas et al., 2006), sin embargo no se había observado una correlación entre la apoptosis y la formación de células binucleadas.

La falta de varios genes provoca un incremento de la apoptosis de las células germinales, tal es el caso de mutantes en *gla-3* (Kritikou et al., 2006). Sin embargo, no ha observado si en esta mutante el aumento de apoptosis se debe a la formación de células binucleadas.

HIPÓTESIS

La mutación del gen *gla-3* provoca un incremento en la apoptosis de las células germinales debido a que se incrementa el número de células germinales binucleadas. En condiciones de estrés térmico, privación de alimento, estrés oxidante y daño al DNA se incrementa la apoptosis de las células germinales debido a que hay un aumento en la fusión celular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la formación de células binucleadas en la gónada de *C. elegans*.

Objetivos particulares

- Estudiar si el incremento en la apoptosis en las mutantes de *gla-3* se relaciona con la formación de células binucleadas.
- Determinar si el estrés térmico, privación de alimento, estrés oxidante y daño al DNA induce la formación de células binucleadas en nematodos silvestres y mutantes de *gla-3*.
- Estudiar la estructura de la gónada en condiciones de estrés térmico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de cepas

Los nematodos fueron mantenidos en cajas Petri con medio NGM-Lite sólido (NaCl 34 mM, NaH₂PO₄ 25 mM, Na₂HPO₄ 3.5mM, agar 59 mM, colesterol 0.02 mM y bacto triptona 4%) el cual fue esterilizado y posteriormente vaciado en cajas Petri. Una vez que el medio se encontraba gelificado, se les agregó 250 µl de un cultivo de *E. coli* OP50, el cual se preparó previamente mediante la inoculación de las bacterias en medio Luria Bertani (LB) con estreptomycin (50 µl/ µg) durante 12 horas a 37°C en agitación (250 r.p.m).

Todas las cepas utilizadas se encuentran enlistadas en la Tabla 2, las cuales se mantuvieron a 20°C (a excepción de la condición de choque de calor).

Tabla 1. Cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
N2	Silvestre
WS2972	<i>gla-3(op216)</i>
WS2973	<i>gla-3(op212)</i>
WS2974	<i>gla-3(ep312)</i>
DG3929	<i>tiar-1(tn1543)</i>
OD70	ItIs44 [<i>pie-1p::mCherry::PH(PLC1delta1) + unc-119(+)</i>]
OD95	[<i>pie-1p::mCherry::his-58 + unc-119(+)</i>]; [<i>pie 1p::GFP::PH(PLC1delta1) + unc-119(+)</i>]
WH223	ojIs9 [<i>zyg-12(all)::GFP + unc-119(+)</i>]
DG4230	<i>gla-3a(tn1734[gfp::3xflag::gla-3a])</i>
	ItIs44 [<i>pie-1p::mCherry::PH(PLC1delta1) + unc-119(+)</i>]; <i>gla-3a(tn1734[gfp::3xflag::gla-3a])</i>

Sincronización de nematodos

Para todos los experimentos, se utilizaron nematodos adultos de 1 día los cuales se obtuvieron mediante sincronización. Se utilizaron cajas Petri con nematodos grávidos (aproximadamente 500 nematodos), los cuales fueron colectados con buffer M9 y transferidos a un tubo Eppendorf. Se agregó 300 µL de NaOH (5 N) y 600 µL de cloro comercial (2.4 mM), los nematodos junto con esta mezcla se agitaron durante 5 min en un agitador *vortex* con el objetivo de romper los nematodos y coleccionar los embriones. Posterior a la agitación, se realizaron 5 lavados, para lo cual se retiró el sobrenadante y se agregó amortiguador M9 y se centrifugó en una micro centrifuga; al término de los lavados, el botón con los embriones se pasó a un tubo estéril y se mantuvieron en amortiguador M9 a 20°C toda la noche .

Finalmente, se cuantificó el número de larvas presentes en la muestra y se sembraron 40 larvas en cajas con OP50 o HT115 para los experimentos de silenciamiento.

Silenciamiento mediante dsRNA

Los experimentos de silenciamiento se realizaron mediante la alimentación de los nematodos con RNA de doble cadena (dsRNA) para lo cual se utilizaron las clonas de la biblioteca *Open Biosystems*, las cuales contiene bacterias de la cepa HT115 que contienen un plásmido con la secuencia para el RNA de interferencia (RNAi) del gen de interés o no contienen alguna inserción (PD129.36). Los cultivos de las bacterias HT115 se colocaron durante 18 horas a 37°C en agitación en medio LB con tetraciclina (12.5 µg/ml) y ampicilina (50 mg/ml). Estas bacterias se sembraron en cajas Petri con medio NGM (NaCl 34 mM, NaH₂PO₄ 25 mM, Na₂HPO₄ 3.5mM, agar 89 mM, colesterol 0.02 mM, bactotripton 4%, estreptomycin 50 µl/µg, tetraciclina 12.5 µg/ml, ampicilina 50 mg/ml e IPTG 1 mM) y se dejaron inducir durante 18 horas a temperatura ambiente cubiertas de la luz.

Posterior a la inducción, se utilizaron las cajas para realizar los experimentos, en donde se sembraron las larvas L1 sincronizadas (o para el caso del silenciamiento de *mpk-1*, se colocaron desde L4) (Figura 9) o las cajas se almacenaron cubiertas de la luz.

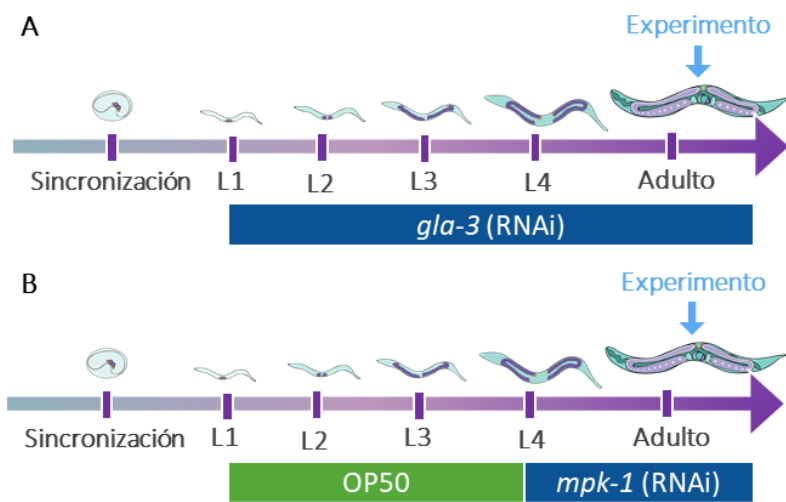


Figura 9. Protocolo seguido para el silenciamiento mediante RNAi. Los nematodos se alimentaron de bacterias que expresan dsRNA del gen de interés. (A) Para el silenciamiento de *gla-3* los animales se alimentaron de estas bacterias desde el estadio L1 hasta adultos, mientras que para el silenciamiento de *mpk-1* (B) las larvas se alimentaron de L1 a L4 de OP50 y posteriormente se alimentaron con bacterias que expresan dsRNA.

Inducción de estrés

Para generar las diferentes condiciones de estrés, se utilizaron los siguientes protocolos para inducir apoptosis (Salinas et al., 2006; Silva-García & Estela Navarro, 2013)

Choque de calor

Los nematodos hermafroditas adultos sincronizados se sembraron en dos cajas con medio NGM con alimento, una caja se utilizó como control, la cual se mantuvo durante todo el experimento a 20°C, mientras que para la condición de choque de calor, esta se selló con *Parafilm* y se colocó en

un baño de agua con temperatura controlada a 31°C durante 3 horas, posterior a este tiempo, se colectaron ya sea para observarlos al microscopio o para realizar disecciones y tinciones con DAPI.

Ayuno

Para inducir la condición de ayuno, los organismos se pasaron de manera individual a cajas con medio NGM que no contenían alimento (ya sea bacterias OP50 o HT115) y de mantuvieron a 20°C durante 6 horas en ausencia de bacteria, mientras que los nematodos control, se mantuvieron en cajas con alimento durante el transcurso del experimento.

Estrés oxidante

Se utilizó Paraquat para promover la formación de especies reactivas de oxígeno y de esta manera generar el estrés oxidante. Los nematodos se trasladaron a cajas Petri (sin medio y/o comida) que contenía amortiguador M9 (condición control) o Paraquat 2 mM (estrés oxidante), estas cajas se cubrieron con Parafilm para evitar la evaporación y se mantuvieron a 20°C durante 1 hora, finalmente se colectaron los nematodos y se disecaron las gónadas para realizar marcajes de DNA con DAPI.

Daño a DNA

El daño a DNA se realizó mediante la exposición con luz UV, para lo cual los nematodos en cajas Petri con medio y en presencia de alimento se irradiaron con luz UV a 0.1 Joules (Stratalinker, 1800), posteriormente a la exposición, los nematodos se colocaron a 20°C durante 3.5 horas y se disecaron las gónadas.

Visualización de células binucleadas

Para visualizar compartimentos celulares con más de núcleo, se utilizaron dos métodos, el primero consistió en marcajes de DNA con DAPI y el para el segundo se utilizaron cepas transgénicas para visualizar la membrana plasmática e histonas.

Tinción con DAPI

Una vez que los nematodos fueron sometidos a las diferentes condiciones de estrés y/o al silenciamiento mediante RNAi, se montaron en cubreobjetos con buffer M9 y se inmovilizaron con tetramizol 10 mM. Posteriormente, en el microscopio de disección se disecaron las gónadas, para lo cual con agujas de jeringas para insulina se realizó un corte en la región de la faringe, esto con el objetivo de remover la cabeza y permitir que los brazos de la gónada quedaran expuestos. Los cubreobjetos con las gónadas disecadas se colocaron sobre portaobjetos, los cuales fueron previamente tratados con Poli-L lisina; una vez que el cubreobjeto estaba montado sobre el portaobjetos, se sumergieron en nitrógeno líquido hasta que las muestras estuvieran congeladas.

Posterior al paso por nitrógeno líquido, se retiraron los portaobjetos del nitrógeno líquido y se separó el cubreobjetos del portaobjetos, ya que en el portaobjetos al estar tratado con poli-L lisina permite que las gónadas disecadas permanezcan sobre esta superficie. Los portaobjetos (con las gónadas) se colocaron en solución fijadora (formol 37%, K_2HPO_4 1M y metanol) durante 10 min a $-20^\circ C$. Al término de la fijación se realizó un lavado, para lo cual las muestras se colocaron en amortiguador M9 durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente, se agregó 30 μL de DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) a una dilución de 1:100 y se dejó incubar durante 5 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Se realizó un último lavado (como el anterior) y se colocó un cubreobjetos nuevo con *Vectashield*.

Las placas se observaron directamente en el microscopio de epifluorescencia, o fueron almacenadas a $4^\circ C$ cubiertas de la luz hasta su posterior análisis.

Cepas transgénicas

Se utilizaron nematodos de la cepa OD95, la cual tiene fusionada la proteína GFP a la PLC (fosfolipasa C), que es una proteína expresada en la membrana plasmática y mCherry a la histona 58. Los organismos posteriores a su tratamiento (silenciamiento mediante dsRNA o exposición a alguna condición de estrés) se montaron en colchones de agarosa al 2% y se inmovilizaron con tetramizol 10mM. Una vez que se encontraban inmóviles se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 1600) y se tomaron fotografías (AxioCam MRc, Zeiss) de las gónadas en el aumento de 40x en los canales verdes (para GFP) y rojo (para mCherry), las fotografías se tomaron en tres planos: plano superior, medio (para visualizar el raquis) y un plano inferior.

Las fotografías fueron procesadas para corregir la exposición y mezclar los canales en el software Image J (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), y a partir de estas fotografías se realizó la cuantificación del número de compartimentos celulares con más de un núcleo.

Estudio de la arquitectura de la gónada

Para visualizar la estructura de las células germinales, se utilizó la cepa OD70, la cual tiene como reportero a la proteína mCherry fusionada a la proteína de membrana plasmática PLC. Los nematodos hermafroditas adultos de 1 día, posterior al estrés y/o choque de calor se montaron en colchones de agarosa al 2% y se inmovilizaron con tetramizol 10mM y se observaron en el microscopio de epifluorescencia.

Se capturó una fotografía representativa de un brazo de la gónada de cada nematodo, esta fotografía se tomó en un plano medio para poder observar la estructura del raquis y de las células germinales. Todas las fotografías fueron procesadas en el software Fiji para la corrección de contraste y para realizar las mediciones.

El diámetro del raquis se determinó en la región de paquiteno temprano del brazo distal de la gónada, aproximadamente, así mismo, para determinar el tamaño de las células germinales, se midieron de manera independiente 20 células germinales consecutivas en esta misma región,

además, de acuerdo con la orientación del brazo de la gónada, midieron 10 células germinales superiores y 10 inferiores.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el software GraphPad Prism version 8.0 (U.S. San Diego, California) para lo cual se realizaron comparaciones mediante t de *student* o ANOVA de dos vías seguidas de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

RESULTADOS

Las mutantes de *gla-3* presentan un incremento en el número de células binucleadas

En reportes previos se reportó que las mutantes en *gla-3* presentan un retraso en la meiosis (Kritikou et al., 2006), lo cual también corroboramos en este trabajo. Para observar esto, se disecaron gónadas de nematodos mutantes de *gla-3* y se marcó el DNA con DAPI, y con base en la morfología del núcleo se identificaron las regiones de mitosis, zona de transición y paquiteno. En la cepa silvestre, los núcleos de la zona de transición presentan una morfología de media luna mientras que los núcleos de la región de paquiteno son de mayor tamaño y es posible apreciar las hebras de DNA (Hirsh et al., 1976).

En la Figura 10 se aprecian que las gónadas disecadas de la mutante de pérdida de función de *gla-3* presentan una extensión de la región del paquiteno (Figura 10B), esta extensión se observa ya que los núcleos de la región de paquiteno (aquellos de mayor tamaño en donde se aprecian las hebras de DNA) se extienden posterior a la zona del asa mientras que en la cepa silvestre esta termina previo al asa (Figura 10A), la extensión del paquiteno se observó en los tres alelos mutante de *gla-3* (datos no mostrados).

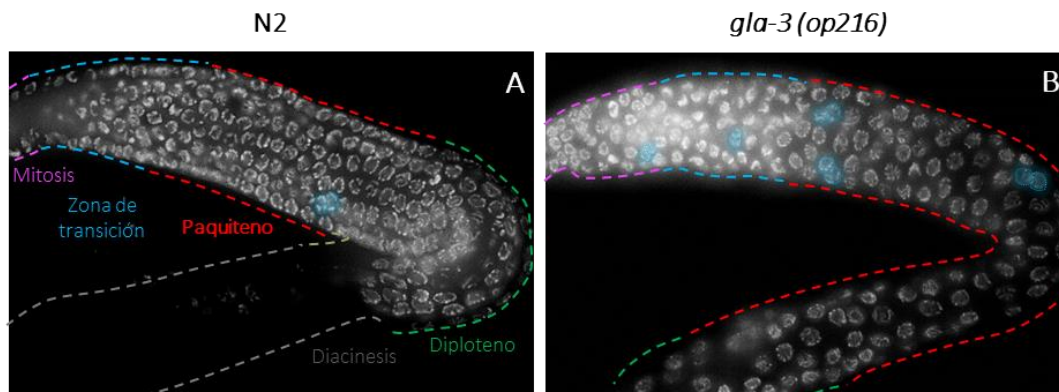


Figura 10. La mutante de *gla-3* presenta extensión de la región del paquiteno. Marcaje de núcleos con DAPI de la cepa silvestre y mutante en *gla-3*. A) Gónada de animal adulto silvestre en donde se marcaron con diferentes colores las diferentes etapas que se observan del ciclo celular. B) Gónadas del alelo *op216* mutante en *gla-3*. Se observa que la región del paquiteno presenta una mayor extensión que la cepa silvestre, la cual está marcada con la línea punteada roja. Las células binucleadas están delimitadas en azul.

La extensión de la región del paquiteno podría indicar que la proliferación de las células germinales se encuentra afectada, para explorar si hay problemas en la proliferación en la mutante en *gla-3* se utilizó un anticuerpo anti-histona-3 fosforilada. Esta histona se fosforila durante la fase G2 del ciclo celular y es una señal que permite la progresión de la mitosis (Hans & Dimitrov, 2001).

Las gónadas de animales silvestres y mutantes en *gla-3* (*op216*) fueron disecadas y teñidas con DAPI y anti-H3 fosforilada. Posteriormente se contaron las células con señal positiva bajo un microscopio de epifluorescencia. No se observaron diferencias significativas entre la cepa silvestre y la mutante indicándonos que los animales *gla-3* no tienen problemas de proliferación (Figura 11).

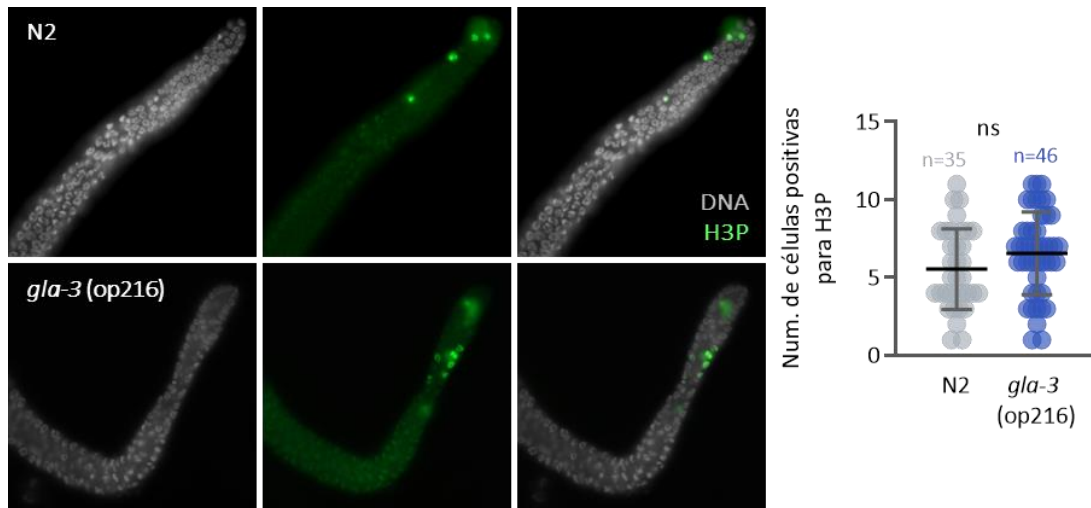


Figura 11. La proliferación celular no está afectada en la mutante de *gla-3*. Gónadas disecadas de nematodos silvestres y mutantes en *gla-3* fueron extraídas y teñidas con un anticuerpo que reconoce a la histona H3 fosforilada y DAPI. En las imágenes se observa la punta distal de gónadas representativas en donde se aprecian los núcleos positivos para la H3 fosforilada. En la gráfica se muestra la cuantificación del número de células positivas de las cepas indicadas. La grafica es resultado del promedio de tres experimentos independientes, en donde el análisis estadístico (*t* de *student*) no indicó diferencia significativa (ns).

Como se mencionó en los antecedentes las mutantes en *gla-3* presentan una apoptosis elevada (aproximadamente 4 veces más que la cepa silvestre) (Kritikou et al., 2006). Para investigar si una de las posibles causas de la elevada muerte se debe a la presencia de células con más de un núcleo, se tiñeron los núcleos de las células germinales de nematodos mutantes en *gla-3* con DAPI. Se utilizaron tres cepas mutantes en *gla-3*, cada una corresponde a diferentes alelos. La cepa *op212* presenta un cambio en una cisteína por una treonina, mientras que la cepa *op216* presenta un cambio de glicina por una alanina, ambas mutaciones generan un codón de paro temprano; la cepa *op312* presenta una delección de 265pb (Anexo 1) (Kritikou et al., 2006). En todos los alelos mutantes observamos que presentan una mayor cantidad de células binucleadas que la cepa silvestre (Figura 10 B-D).

Las células binucleadas se identificaron con base en la cercanía de los núcleos (Figura 12A). Al cuantificar el número de células binucleadas se observó que los diferentes alelos mutantes en *gla-*

3 presentan cuatro veces más células binucleadas comparados con la cepa silvestre (N2) (Figura 12E). También se identificó que las células binucleadas se localizan en el brazo distal de la gónada, posterior a la zona de transición y antes del asa (Figura 12F).

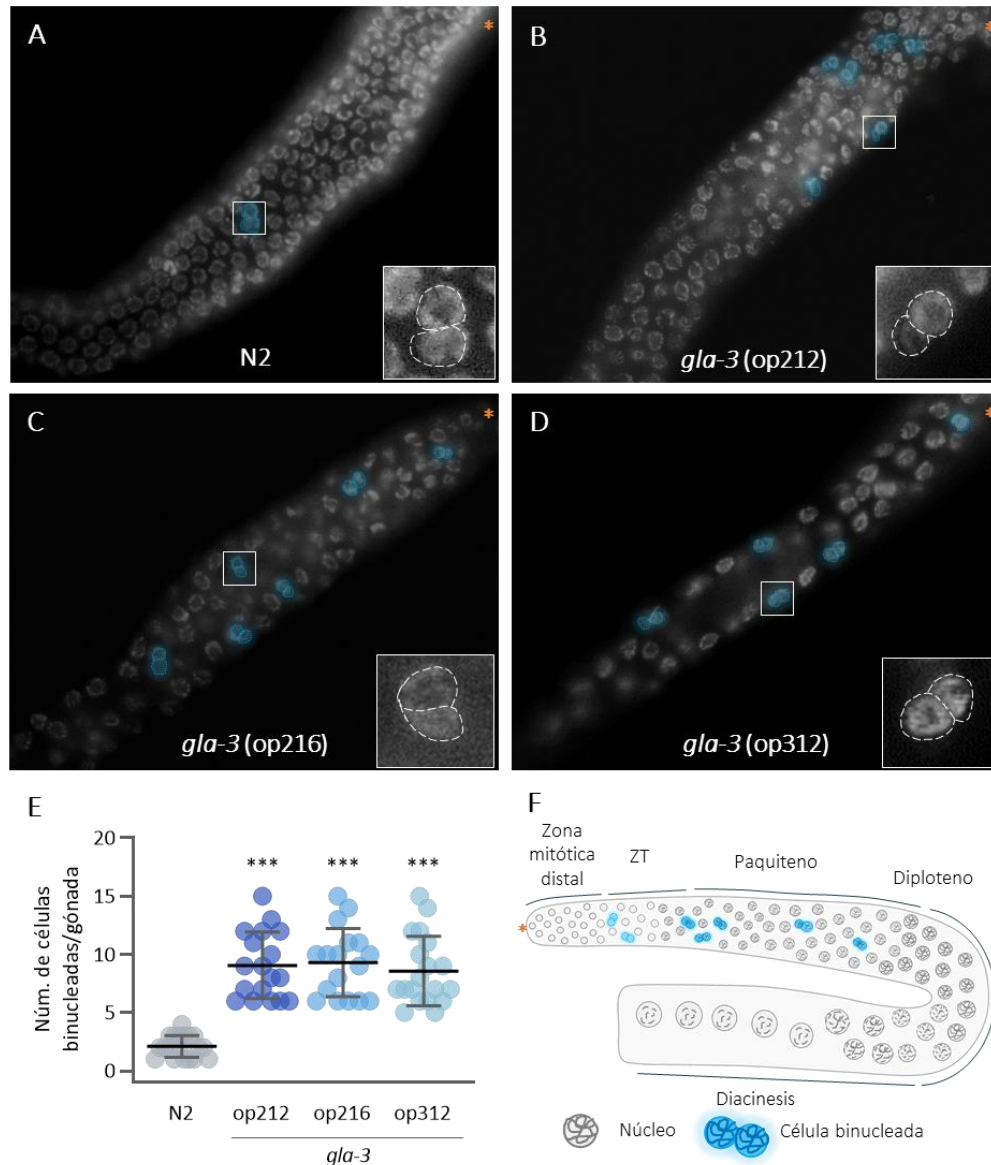


Figura 12. La mutante en *gla-3* presenta un gran número de células binucleadas. Fotografías de gónadas disecadas y teñidas con DAPI de animales silvestres o mutantes en *gla-3*. Los núcleos de células binucleadas de *gla-3* fueron marcados con azul y se muestra un detalle de ellos en cada uno. **A)** Gónada de animal adulto silvestre **(B-D)** Gónadas de diferentes alelos mutantes en *gla-3*. La zona distal de la gónada está señalada con * naranja. **E.** Gráfica que muestra los resultados del conteo de las células binucleadas en las cepas indicadas. La gráfica es el resultado de tres experimentos independientes con desviación estándar $p < 0.0001$. **F.** Esquema de la gónada que muestra el sitio en donde se encuentran las células binucleadas.

Para corroborar que las células presentan más de un núcleo, se utilizó el transgénico OD95 (*pie-1p::mCherry::his-58; pie-1p::GFP::PH(PLC1delta1)*). En este transgénico se observa a la membrana

plasmática con la proteína GFP unida a la PLC y los núcleos con una fusión de mCherry con la histona 59 (Figura 13).

Debido a que no se contaba con la cruce de las cepas mutantes de *gla-3* con la cepa OD95, se realizó silenciamiento de *gla-3* por medio de RNA de interferencia y como control se utilizó un plásmido sin inserto al cual denominamos “plásmido vacío”. La eficiencia del silenciamiento de *gla-3* se corroboró en el transgénico GFP::GLA-3, la cual fue del 70% (Anexo 2).

Tanto los nematodos PV como *gla-3* (RNAi) se colocaron en choque de calor para identificar si esta condición de estrés induce la formación de células binucleadas, la cual se indujo colocando a los nematodos a 31°C durante 3h, posterior a esto se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Para la condición control los nematodos se mantuvieron a 20°C.

En la condición de plásmido vacío control (Figura 13A) se observaron pocas células binucleadas (\bar{x} =1.4), mientras que en los animales que fueron sometidos a choque de calor el número de células binucleadas incrementó (asteriscos) (\bar{x} =7.9) (Figura 13B). Es importante hacer notar que el silenciamiento de *gla-3* aumentó la formación de células binucleadas (\bar{x} =8) como se había observado en la cepa mutante para este gen (Figura 12C). También observamos que durante el choque de calor en los nematodos con silenciamiento de *gla-3*, el número células binucleadas no incrementa (Figura 11D) (\bar{x} =8.1) con respecto a la condición *gla-3* (RNAi) control.

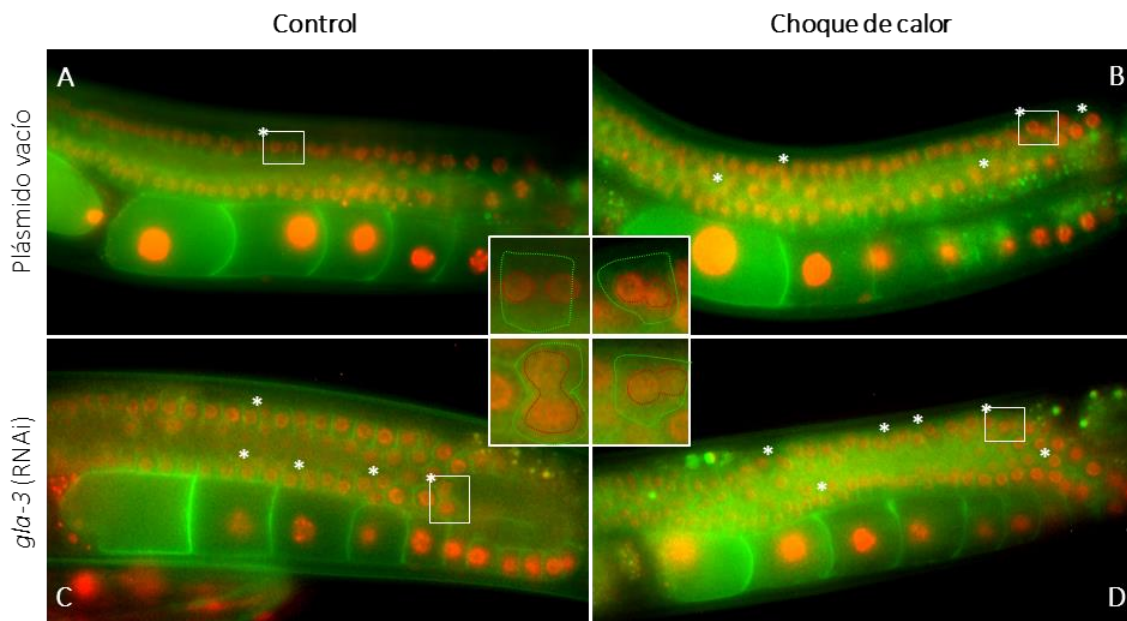


Figura 13. El silenciamiento de *gla-3* favorece la formación de células binucleadas. Se muestran gónadas de nematodos sincronizados y alimentados desde L1 con bacterias HT115 que contenían plásmido vacío (A, B) o RNA de doble cadena *gla-3* (C, D). Algunos nematodos se colocaron en choque de calor durante 3h (B, D) mientras que el resto se mantuvo a 20°C (A, C). Posterior a esto se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y se capturaron las imágenes. Como marcador de membrana plasmática se utilizó a la PLC unida a GFP (verde) y como marcador nuclear a la histona-58 unida a mCherry (rojo). Las células binucleadas están marcadas con * y se observa el acercamiento en los recuadros del centro, en donde se aprecian células germinales con más de un núcleo.

En los acercamientos de la Figura 12A y 13 observamos que los núcleos se encuentran muy cercanos, lo cual podría indicar que estos también están fusionados, para estudiar esta posibilidad se utilizó el transgénico WH223 (Figura 14). Esta cepa presenta la proteína GFP unida a ZYG-12; una proteína presente en la envoltura nuclear. Se realizó RNAi de *gla-3* en esta cepa, en la condición control (Plásmido vacío) se observaron núcleos redondos y separados unos de otros, lo cual nos indica que no hay células binucleadas (Figura 14A), mientras que el silenciamiento de *gla-3* se observa que los núcleos de algunas células estén más cercanos (como habíamos visto anteriormente para las células binucleadas). A pesar de que los núcleos estén muy cerca no se observa que estén fusionados (Figura 14B).

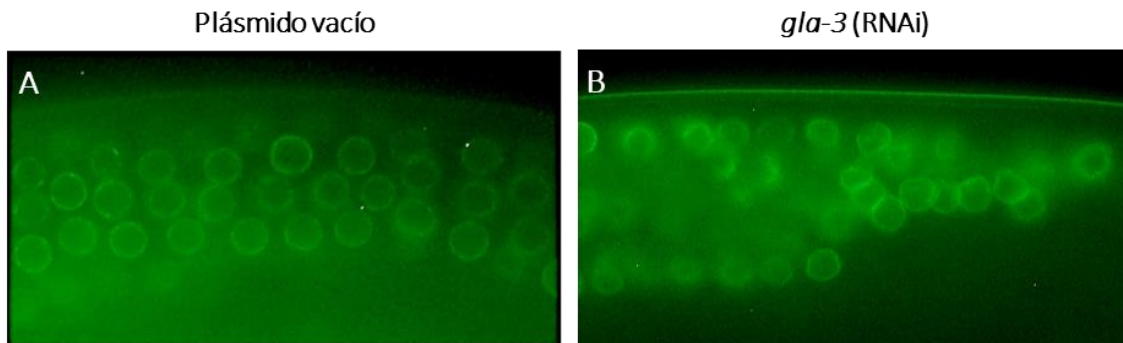


Figura 14. Las células binucleadas no presentan núcleos fusionados. Gónadas de animales transgénico WH223 (ZYG-12::GFP), en el cual la envoltura nuclear se observa en verde. Se muestra la región del paquiteno tardío previo al asa. Los animales fueron alimentados desde L1 con bacterias que contenían a un plásmido vacío como control o RNA de doble cadena de *gla-3*. **A)** En el control se observan los núcleos alejados. **B)** En gónadas en donde se silenció al gen *gla-3* se observan núcleos muy cercanos, pero no fusionados.

El estrés promueve la formación de células binucleadas

Estudios previos (Lascarez-Lagunas et al., 2014; Salinas et al., 2006) han identificado que la apoptosis celular incrementa bajo diferentes condiciones de estrés, por lo cual se probó si el número de células binucleadas aumenta durante estas condiciones.

Se probaron diferentes condiciones de estrés como son choque de calor (3h, 31°C), ayuno (6 h sin bacterias), estrés oxidante (10 μ M de Paraquat por 1 h) y daño a DNA (los animales se expusieron a 0.1 Joules de luz UV). Después del estrés, se disecaron las gónadas y se tiñeron con DAPI para posteriormente cuantificar el número de células binucleadas.

En el caso de los nematodos silvestres se observó un promedio de 2.33 (error estándar ± 0.19) células binucleadas presentes por brazo de la gónada en la condición control (Figura 15A). En todas las condiciones de estrés el promedio de células binucleadas aumento; observamos un incremento de 3.8 veces (8.61 ± 0.25) en comparación con el control en el choque de calor, un aumento de 3.7 veces (8.76 ± 0.21) en ayuno y de 2.4 veces (8.35 ± 0.21) en estrés oxidante. En la exposición a radiación UV se observa una tendencia a aumentar el número de células binucleadas.

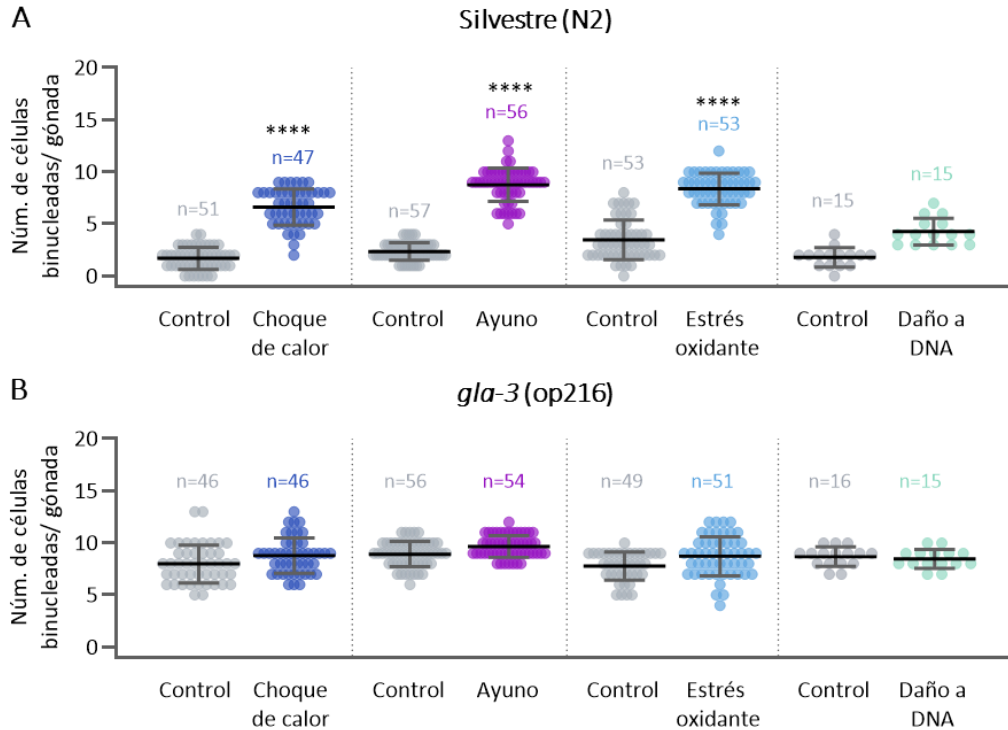


Figura 15. El estrés aumenta el número de células binucleadas en la cepa silvestre. Para inducir estrés animales adultos de un día silvestres y mutantes en *gla-3*, se expusieron a choque de calor por 3 h a 31°C, para inducir ayuno se les quitaron las bacterias por 6h, para el estrés oxidante se colocaron en una solución líquida de paraquat (10 µM) durante 1h y para causar daño al DNA se expusieron a luz UV (0.1 Joules). Los nematodos en condición control se mantuvieron a 20°C en presencia de alimento. Después de cada tratamiento, se disecaron las gónadas y se tiñeron con DAPI para identificar células binucleadas bajo el microscopio. En la gráfica se observa el promedio de células binucleadas por brazo de la gónada de nematodos silvestres (A) y un alelo mutante de *gla-3* (op216) (B). Las gráficas son el resultado de tres experimentos independientes con desviación estándar $p < 0.0001$.

A pesar de que en condiciones control la mutante de *gla-3* presenta un elevado número de células binucleadas (8.60 ± 0.25), no se observaron diferencias significativas al someter a estos animales a estrés (Figura 13B). Al igual que las células binucleadas en las mutantes en *gla-3*, se observó que las células binucleadas durante el estrés siempre están presentes en la región de paquiteno (Figura 10F).

Nos preguntamos si la razón por la que en la mutante en *gla-3* no se ve un incremento en células binucleadas durante el estrés puede ser debido a un retraso en la progresión de la meiosis en está mutante, ya que se identificó que la mitosis no se altera (Figura 11). Para responder esta pregunta se colocaron animales (silvestres y mutantes de *gla-3*) en condiciones control (20°C) y en choque de calor (31°C por 3h) y después del tratamiento los animales se dejaron recuperar a 20°C durante 1, 2 y 3 horas (Figura 16).

Como se ha descrito en el apartado anterior, el número de células binucleadas aumenta después del choque de calor en la cepa silvestre (Figura 15). Se observó que, si los animales se dejan recuperar por algunas horas a 20°C, el número de células binucleadas continúa incrementando de 9 hasta 12 células binucleadas en 3 h de recuperación (Figura 16). Los animales mutantes en *gla-3* (*op216*) que se dejaron recuperar después del choque de calor también presentaron un incremento en el número de células binucleadas de 9 a 13 en un periodo de 3h (Figura 16). Este resultado nos sugiere que la meiosis en las mutantes en *gla-3* está más lenta que en la cepa silvestre.

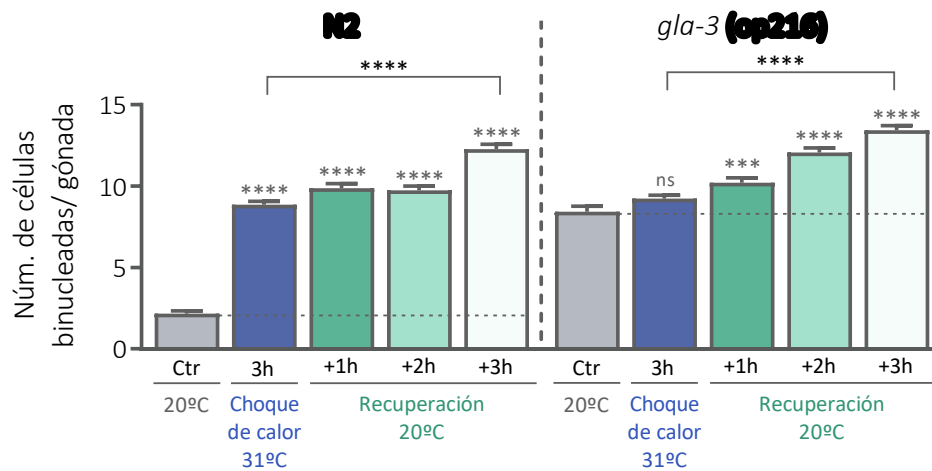


Figura 16. El número de células binucleadas continúa aumentando horas después del choque de calor. Para inducir choque de calor animales adultos de un día silvestres y mutantes en *gla-3* se expusieron por 3 h a 31°C. Posterior al estrés, los animales se incubaron de 1 a 3 h a 20°C. Los nematodos en condición control se mantuvieron a 20°C. A las horas indicadas, se disecaron las gónadas y se tiñeron con DAPI para identificar células binucleadas bajo el microscopio. En la gráfica se observa el promedio de células binucleadas por brazo de la gónada de nematodos silvestres y mutantes. Las gráficas son el resultado de tres experimentos independientes con error estándar $p < 0.0001$.

El gen *tiar-1* codifica para una proteína de unión a RNA que se requiere para inducir apoptosis de células germinales en varias condiciones de estrés (Silva-García & Estela Navarro, 2013). Debido a que la mutante de *tiar-1* es incapaz de inducir apoptosis durante el estrés, decidimos estudiar si presentaba células binucleadas en condiciones control y de choque de calor.

Se observó que el número de células binucleadas en la mutante de *tiar-1* en condiciones control es mayor en comparación con la cepa silvestre (silvestre: 1.76 ± 0.22 y *tiar-1*: 3.34 ± 0.19) (Figura 17).

Al comparar el número de células binucleadas control contra choque de calor en cepa mutante de *tiar-1(tm1543)* de pérdida de función, se observó que estas aumentan casi dos veces (6.61 ± 0.25) con respecto a su control (Figura 17), sin embargo, el número es menor que las células binucleadas observadas en la mutante en *gla-3*. Estos datos nos sugieren que a pesar de que no hay inducción de apoptosis en la mutante de *tiar-1* los eventos de fusión celular si se están llevando a cabo.

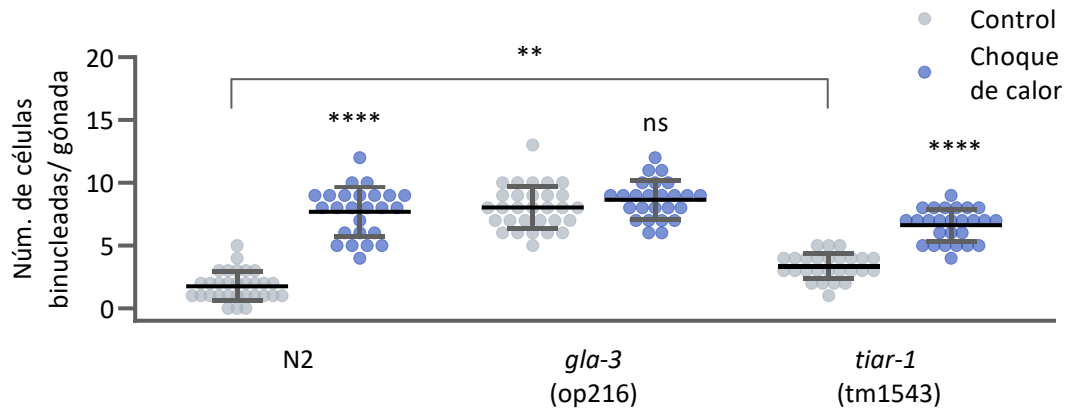


Figura 17. Las células binucleadas aumentan durante el estrés en la mutante de *tiar-1*. Promedio de células binucleadas presentes en gónadas disecadas de animales adultos de 1 día silvestres, mutantes de *gla-3* y de *tiar-1* en condiciones control (20°C en presencia de alimento) y choque de calor (31°C durante 3h). Promedio de tres experimentos independientes con desviación estándar. $p < 0.0001$

Cuando la apoptosis falla, las células binucleadas prevalecen y forman ovocitos

De acuerdo con la literatura, las células germinales binucleadas son eliminadas por apoptosis, sin embargo, se ha observado que algunas células prevalecen y pueden llegar a formar ovocitos (Raiders et al., 2018). Nosotros observamos que, en la cepa silvestre, en condiciones de choque de calor, se pueden detectar ovocitos con dos núcleos (Figura 18A). Lo cual demuestra que algunas células binucleadas al no ser eliminadas prosiguen con su ciclo hasta formar ovocitos. Igualmente se observó que mutantes de *tiar-1* en condiciones control (20°C) presentan ovocitos binucleados (Figura 18B), esto puede deberse a que la proteína TIAR-1 se requiere para inducir apoptosis.

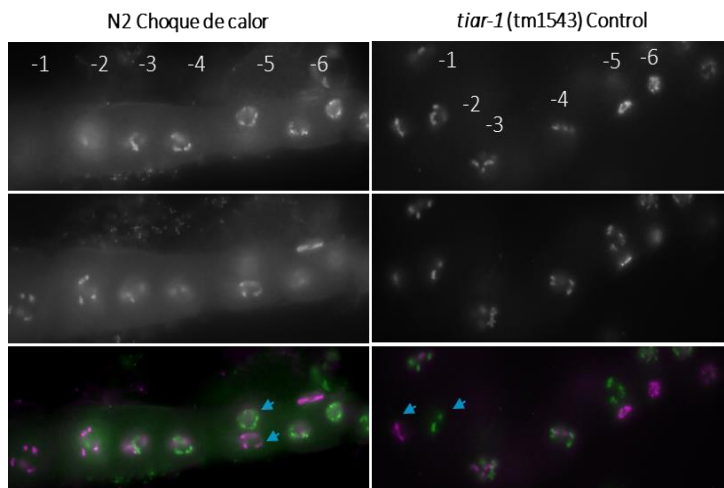


Figura 18. Algunas células binucleadas pueden formar ovocitos. Tinciones de DAPI de gónadas disecadas de nematodos silvestres en choque de calor y mutantes de *tiar-1* en condiciones control. Las imágenes en blanco y negro superiores muestran fotografías en dos planos distintos de la gónada. Las fotografías inferiores (a colores) son resultado del traslape de las fotografías superiores, en donde se aplicaron colores falsos para resaltar la presencia de dos núcleos en una misma célula, los cuales están señalados con las flechas.

El estrés genera cambios en la estructura de las células germinales

Datos previos del laboratorio indicaban que la estructura de la gónada cambia durante el estrés por lo que procedimos a estudiar si este efecto tiene alguna relación con la fusión celular. Se utilizó a una cepa transgénica que expresa la PLC (proteína de membrana plasmática) fusionada a la proteína mCherry (OD70). Los animales se sometieron a choque de calor y se montaron al microscopio para observar con detalle la estructura de la gónada.

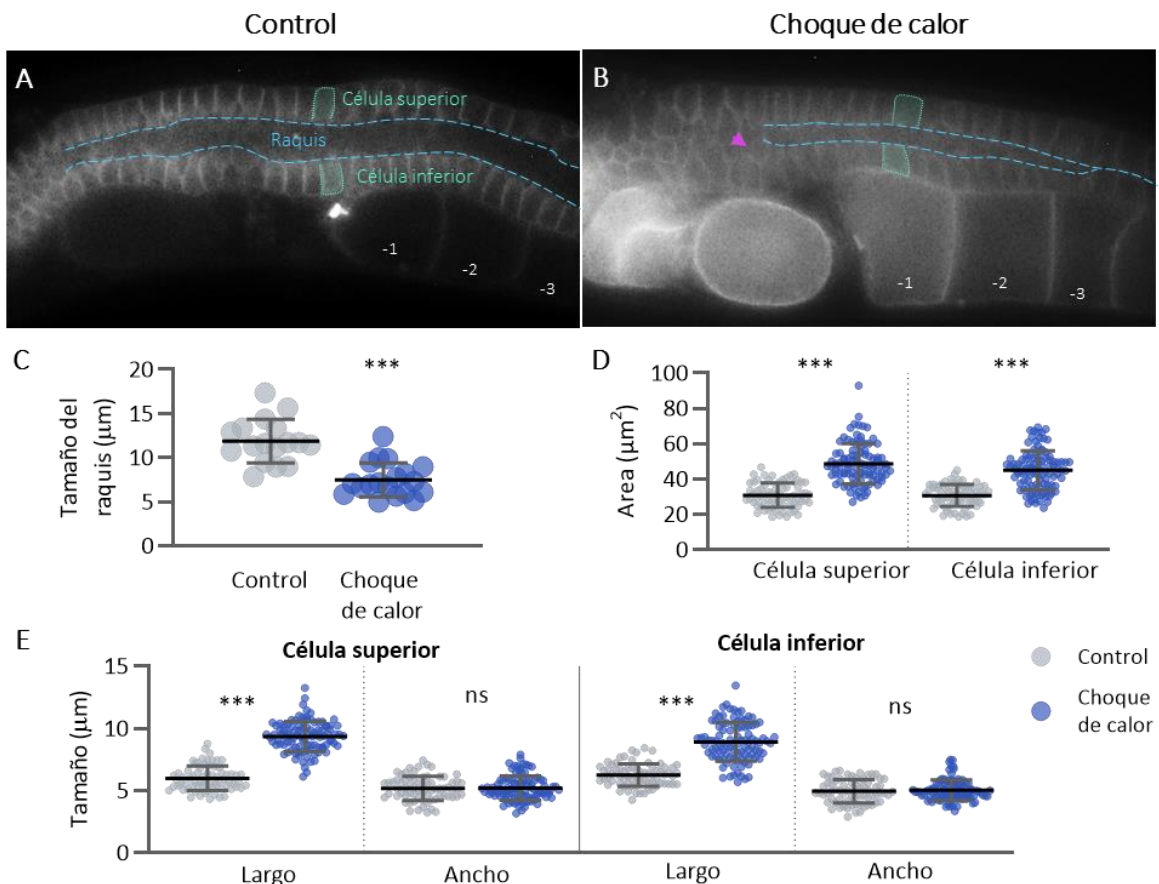


Figura 19. Las células germinales aumentan de tamaño durante el choque de calor. A-B Fotografías de epifluorescencia representativas de nematodos adultos de un día de la cepa OD70 (PLC::mCherry) sometidos a condiciones control (A) y de choque de calor (B). Se observa la membrana plasmática de las células germinales, el raquis está delimitado con líneas punteadas azules y en verde se marcan dos células germinales (superior e inferior) de acuerdo con su orientación en la imagen; también se marcan los ovocitos -1 (más cercano a la espermateca), -2 y -3. La punta de flecha morada señala células germinales que se encuentran desorganizadas una sobre otra. A partir de las fotografías, se realizaron las mediciones del diámetro del raquis (C) y tamaño de las células germinales (D), para lo cual se midieron de manera individual 10 células superiores y 10 inferiores de cada gónada, todas las mediciones se realizaron entre la zona de transición y la región de paquiteno. Con base en las mediciones se determinó el área de las células (E). Para la condición control se analizaron 17 nematodos y para choque de calor 19 nematodos. Promedio de tres experimentos independientes, en donde se realizó ANOVA de dos vías, las gráficas presentan desviación estándar. $p < 0.0001$

Después del choque de calor observamos que el raquis de la gónada se redujo en promedio un 50% (Figura 19A, B y C). También observamos que el área de las células germinales se incrementó (Figura 19A, B y D). Debido a que el ancho de la gónada no cambia (datos no mostrados) pensamos que, durante el choque de calor, las células germinales se expanden a lo largo ya que el ancho no cambia (Figura 19E). Se observaron muy pocas células que son más anchas y un ejemplo de ellas se muestra en el Anexo 4. Otro efecto del choque de calor es la presencia de células germinales que se desorganizan y se ven apiladas unas sobre otras (Figura 19B, cabeza de flecha color rosa). De acuerdo con reportes previos esta estructura puede favorecer la fusión celular (Raiders et al., 2018).

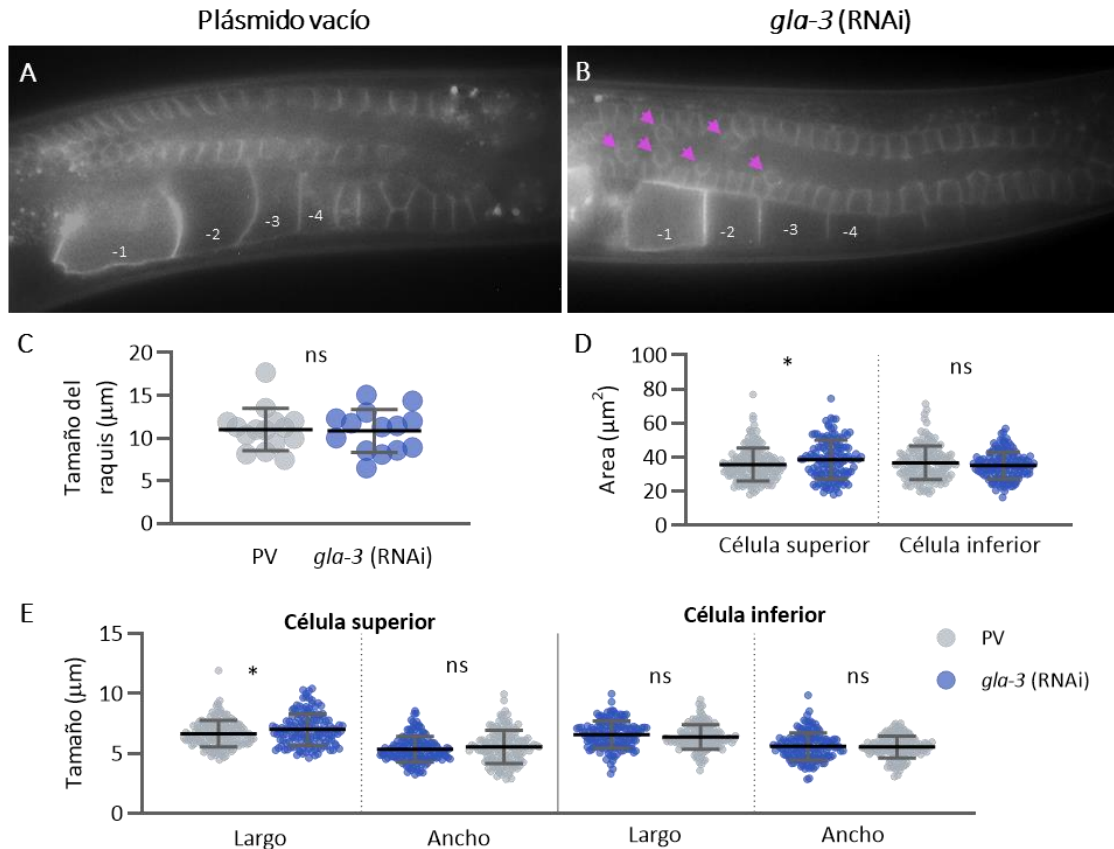


Figura 20. El silenciamiento de *gla-3* afecta la estructura de las células germinales. Fotografías representativas de la estructura de la gónada de animales control (plásmido vacío) y *gla-3* (RNAi). Se observa la membrana plasmática de los animales transgénicos (PLC::mCherry). Para hacer RNAi los animales fueron colocados desde el estadio L1 en RNA de doble cadena para *gla-3* (B) o en plásmido vacío (PV) (A) en condiciones normales de crecimiento. Las puntas de flecha señalan células germinales que se encuentran apiladas una sobre otra. La cuantificación del tamaño de las células se realizó en 15 nematodos para la condición de PV y 14 para *gla-3* (RNAi). El panel C muestra la gráfica del promedio del diámetro del raquis en ambas condiciones y los paneles D y E muestran el área y el tamaño promedio de las células germinales de cada condición. Se midieron 10 células superiores y 10 inferiores de cada condición en la región que comprende de la zona de transición a la región de paquiteno tardío (previo al asa). Promedio de tres experimentos independientes, en donde se realizó ANOVA de dos vías, las gráficas presentan desviación estándar. $p < 0.0001$

Como ya se mostró previamente, los nematodos con silenciamiento de *gla-3* presentan un incremento en el número de células germinales binucleadas por lo que decidimos estudiar la estructura de la gónada en estas condiciones. Los animales *gla-3*(RNAi) no presentaron cambios evidentes en la estructura de la gónada (Figura 20A-B), pero lo que si observamos es que estos nematodos presentan un mayor número de células apiladas unas sobre otras (Figura 20B) lo que podría favorecer la fusión celular. El análisis del tamaño del diámetro del raquis no mostró diferencias estadísticas significativas entre la condición de plásmido vacío y silenciamiento de *gla-3* (Figura 20C).

La comparación del área de las células germinales (Figura 20D) en estas dos condiciones determinó que el área de las células superiores es mayor en promedio $2.90 \mu\text{m}^2$ en animales *gla-3*(RNAi) ($P < 0.05$), lo cual coincide con que las células superiores son un poco más alargadas ($0.35 \mu\text{m}$) en esta condición (Figura 20E). No observamos otras diferencias en el largo o el ancho de las células inferiores (Figura 20E).

MPK-1/ERK puede participar en la formación de células binucleadas

Se ha propuesto que la Map cinasa MPK-1/Erk puede participar en la formación de células binucleadas, ya que éstas se forman en regiones de la gónada en donde se activa esta vía (Raiders et al., 2018). Además, en levaduras la activación de la vía de Map cinasas se requiere para promover la polarización durante la fusión celular (Aguilar et al., 2010). Aunado a esto MPK-1 se une a GLA-3/TTP (Kritikou et al., 2006). Para probar esta hipótesis se silenció el gen de *mpk-1* en nematodos silvestres y mutantes de *gla-3*.

Se ha reportado que las mutantes de *mpk-1* no desarrollan la gónada (Lackner & Kim, 1998) y al silenciar este gen desde el estadio L1 se observaron defectos en su formación (Anexo 3), por lo que se realizó el RNAi a partir del estadio L4, cuando la gónada está prácticamente formada. Las gónadas de los animales PV y *mpk-1* (RNAi) fueron disecadas y teñidas con DAPI para observar su morfología. En la Figura 21 se observan fotografías de gónadas de nematodos silvestres en diferentes planos. En un plano superior se observan los núcleos de las células germinales y en un plano medio se observa el raquis de la gónada. En la cepa control o plásmido vacío se observan núcleos y el canal del raquis normal (Figura 19A, A') sin embargo, las gónadas de los animales *mpk-1* (RNAi) presentan zonas en donde no hay núcleos (flechas) aunque aparentemente el raquis no se ve afectado (Figura 21B y B').

Debido a que la estructura de la gónada cambió nos fue difícil distinguir a las células binucleadas. Sin embargo, ya que el silenciamiento de *mpk-1* afectó la estructura de las células germinales todavía cabe la posibilidad de que se requiera de la activación de MPK-1 para formar células binucleadas.

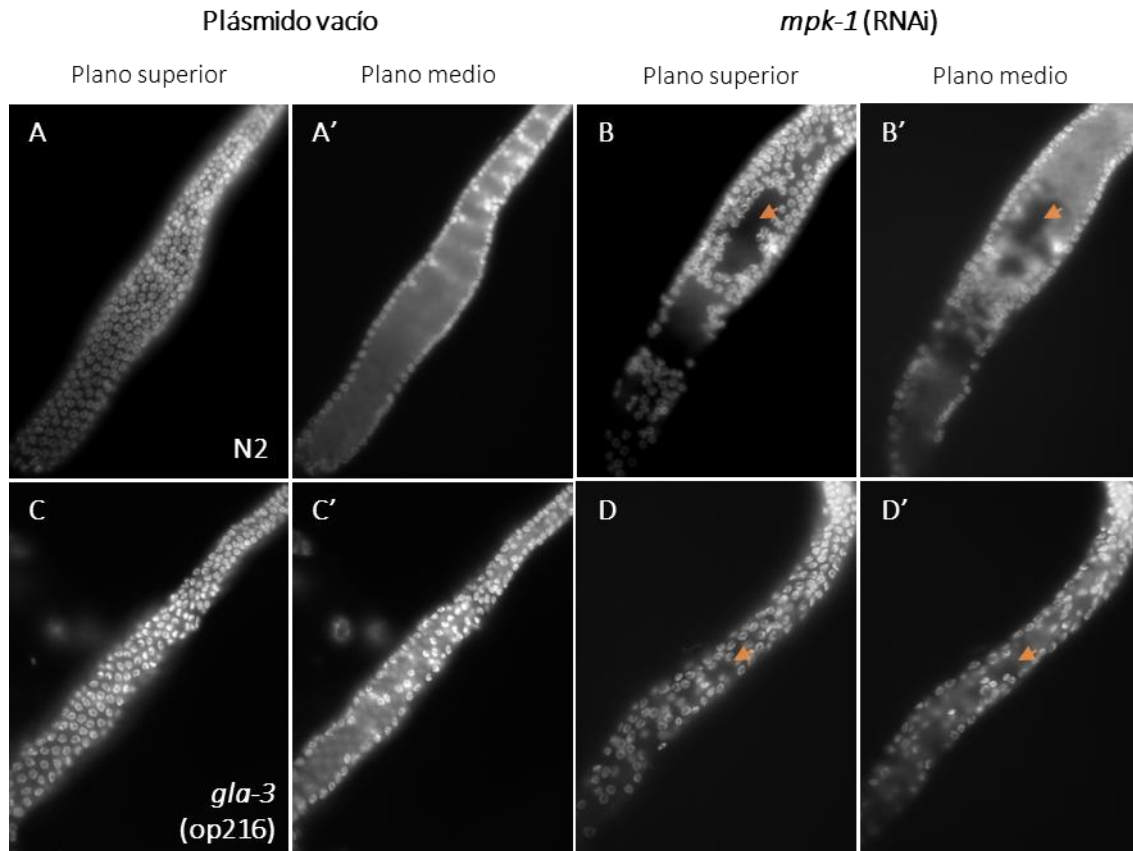


Figura 21. El silenciamiento de *mpk-1* afecta la estructura de la gónada. Se disecaron gónadas de animales adultos de un día control (plásmido vacío) (A-B) y *mpk-1*(RNAi) 3 (B, D) y se tiñeron con DAPI para observar la morfología nuclear. Las imágenes están orientadas de tal manera que la punta distal se encuentra en la esquina superior izquierda y las gónadas se observa de la zona de transición a la región del paquiteno (previo al asa). Las flechas señalan sitios carentes de núcleos.

DISCUSIÓN

En este trabajo observamos que, durante la ovogénesis algunas células germinales se fusionan como se había reportado por Raiders *et al.* (2018). En ese trabajo, demostraron que la mayoría de las células germinales que se fusionan son eliminadas por apoptosis. Nosotros encontramos que diferentes condiciones de estrés ejercidas durante la ovogénesis tales como choque de calor, ayuno y estrés oxidante promueven la formación de células binucleadas. De hecho, observamos que la fusión celular continúa tiempo después de haber acabado el estrés. Previamente en el laboratorio se había reportado que estas mismas condiciones inducen apoptosis de células germinales (Salinas *et al.*, 2006).

Por otro lado, identificamos que las cepas mutantes en *gla-3* presentan un mayor número de células germinales binucleadas y esto correlaciona con estudios previos en donde se ha observado que estas mutantes presentan una apoptosis incrementada (Kritikou *et al.*, 2006), por lo que parece haber una fuerte correlación entre la formación de células binucleadas y la apoptosis.

La vía de las MAP cinasas tipo ERK participa en eventos de fusión celular y apoptosis

Hasta ahora no queda muy claro cuál es la relación entre la fusión celular y la apoptosis, aunque es probable que este mecanismo permite eliminar dos células potencialmente dañadas. Esta correlación no solo ha sido observada en células germinales de *C. elegans*, también en modelos *in vitro* de células de mamífero. Un ejemplo es lo que ocurre en las células cancerígenas A549 que expresan un fragmento de la proteína FAST, las cuales presentan pérdida de la actividad metabólica y de la integridad de membrana lo cual promueve que se presenten niveles elevados de fusión celular y apoptosis (Wong et al., 2016). Otros casos en donde se ha identificado una relación entre la fusión celular y la apoptosis en fibroblastos (Lu et al., 2016; Yuan et al., 2008), mioblastos (Jeong & Conboy, 2011), estroma (Noubissi et al., 2015), líneas celulares de cáncer de próstata (Fukuta et al., 2008), coriocarcinoma (M. Liu et al., 2016) y citotrofoblasto (Langbein et al., 2008), sin embargo en ninguno de los reportes se ha identificado cómo es que la fusión activa la apoptosis.

En la mutante de *gla-3* se encontró que el incremento en la apoptosis puede deberse al incremento en la vía de MPK-1 ya que GLA-3 parece ser un regulador negativo de esta cinasa (Perrin et al., 2013). MPK-1 regula múltiples procesos en las células germinales como la proliferación celular, progresión de las células germinales en la región de paquiteno, crecimiento y maduración de los ovocitos, así como la celularización de las células germinales y gametos (Arur et al., 2009; Robinson-Thiewes et al., 2020). Además, MPK-1 se requiere para mantener la integridad de la membrana plasmática (Arur et al., 2011) ya que el silenciamiento o la mutación del gen genera que las células germinales sean de menor tamaño y que los ovocitos sean multinucleados (Arur et al., 2011; Green et al., 2011). En particular, en el nematodo se requiere que las células germinales salgan del paquiteno para poder ser susceptibles a apoptosis y MPK-1 promueve este paso de la meiosis (Gumienny et al., 1999). En otro trabajo se observó que la forma fosforilada (activa) de MPK-1 promueve la apoptosis durante el daño a DNA (Rutkowski et al., 2011).

En otros modelos experimentales, también se ha identificado que se requiere de la vía de MAPK ERK para mantener la integridad celular, por ejemplo, en levaduras se requiere de Mpk1 para la biogénesis de la pared celular (Levin, 2011). En mamíferos se ha identificado la participación de ERK para mantener la integridad celular (Kim & Breton, 2016) y la inducción de la apoptosis (Cagnol & Chambard, 2010), así mismo, se ha identificado que durante infecciones virales se requiere de la activación de ERK para que la membrana del virus se fusione con su célula huésped (Sharma et al., 2010). También esta vía promueve la fusión celular de mioblastos (Sunadome et al., 2011). Todos estos datos sugieren que la vía de ERK podría participar en la fusión de células germinales en *C. elegans*.

Trabajos previos identificaron que las mutantes en *gla-3* presentan una extensión en la meiosis (Kritikou et al., 2006) lo cual también fue observado en este trabajo, actualmente no se conoce que proceso de la meiosis se encuentra afectado, pero reportes recientes han identificado que MPK-1 puede fosforilar componentes necesarios para ensamblar el complejo sinaptonémico y de esta manera regular la extensión de la meiosis (Das et al., 2020), por lo cual es posible que este proceso se encuentre afectado en las mutantes en *gla-3*.

GLA-3/TTP y su posible papel en la fusión celular

GLA-3/TTP tiene dominios tipo de dedos de zinc que le podrían permitir interactuar y regular diferentes mRNAs (Kritikou et al., 2006), por lo que es probable que la expresión de diversos genes se encuentre alterada en las cepas mutantes en esta proteína. Algunos de los mRNAs que se han comprobado que son regulados por TTP en mamíferos cuya función se relaciona con el mantenimiento de la estructura y/o forma celular son *kel-1/Klhl2* (proteína de unión a actina), *elp-1/Eml4* (formación de microtúbulos), *wip-1/Wipf2* (organizador del citoesqueleto de actina), *lin-7/Lin7c* (polaridad celular) y *tat-2/Atat1* (crecimiento de microtúbulos) (Stoecklin et al., 2008). Por lo cual sería interesante estudiar si alguno de los homólogos de estos genes en *C. elegans* se encuentre afectado en la mutante de *gla-3* y que por lo tanto favorezca la formación de células binucleadas.

Otro gen que es regulado por TTP en mamíferos es *plk-1/PLK1* (*Polo like cinasa*) y se ha visto en *C. elegans* que las mutantes en este gen presentan ovocitos y blastómeros con más de un núcleo (Chase et al., 2000). *obr-3/Osbpl8* también es regulado por TTP en mamíferos y codifica para una proteína que funciona en el transporte de lípidos, principalmente de fosfatidilserina, del retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática (Chung et al., 2015). Como se mencionó en la introducción, se ha observado que la fosfatidilserina favorece los sitios de contacto durante la fusión celular (Hochreiter-Hufford et al., 2015; Jeong & Conboy, 2011; Verma et al., 2018), por lo que sería interesante conocer si esta vía se encuentra afectada en las mutantes de *gla-3* y esto sea la causa del incremento en la fusión celular.

Además, en el laboratorio hemos identificado que, durante el estrés por choque de calor, ayuno, estrés oxidante y arresto meiótico prolongado, GLA-3 se asocia a gránulos de estrés (datos no mostrados) y de esta manera participar como regulador post transcripcional mediante la represión de ciertos mRNAs.

Ovocitos con más de un núcleo

Las células germinales binucleadas que no son eliminadas por apoptosis llegan a formar ovocitos con más de un núcleo (Figura 18). Otros trabajos también han observado la presencia de ovocitos binucleados en nematodos mutantes de *ced-3*, al seguir el desarrollo de estos ovocitos se identificó que pueden ser fertilizados y llegan a formar embriones triploides (Raiders et al., 2018). Estos embriones triploides pueden desarrollarse de manera normal y formar nematodos adultos hermafroditas fértiles, los cuales presentan tres cromosomas X y tres conjuntos de autosomas (3X;3A), a diferencia de los nematodos silvestres hermafroditas, lo cuales solo presentan dos cromosomas X y 2 conjuntos de autosomas (2X;2A) (Raiders et al., 2018). Al cruzar nematodos hermafroditas triploides (3X;3A) con machos silvestres (1X;2A) se observó que el 99.7% de la progenie es diploide (2X;2A) y el resto (0.3%) es triploide (3X;3A) (Raiders et al., 2018). La presencia de nematodos triploides también se ha generado al cruzar nematodos 4X;4A con 1X;2A (Madl & Herman, 1979)

Los fusógenos AFF-1 y EEF-1 parecen no participar en la fusión de las células germinales

Se ha propuesto que en la gónada del nematodo la formación de células con dos o más núcleos es llevada a cabo por fusión celular. El mecanismo de fallo en la citocinesis ha sido descartado, primero porque las células multinucleadas se observan en una zona de la gónada donde ya ocurrió la división celular (después de la zona de transición) y debido a que el silenciamiento de componentes que participan en la separación de las células durante la mitosis no tiene un efecto en la formación de células binucleadas (Raiders et al., 2018).

Con base en observaciones realizadas en animales mutantes en *ced-1*, *egl-1* y *pch-2* se han propuesto diferentes modelos que explican cómo es que las células germinales se fusionan. Uno de ellos propone que la membrana plasmática que separa a las células germinales sufre un doblez, lo cual permite que esta membrana pueda ingresar (Figura 22 2a) y que de esta manera se pierda la división que separa a las células germinales (Raiders et al., 2018). Esta ingresión de la membrana puede estar acompañada por la pérdida de proteínas cuya función es la de mantener estables los puentes del raquis. Este modelo está apoyado por evidencia que indica que la mutación de componentes del raquis como proteínas de matriz extracelular y/o reguladores de actinmiosina genera células germinales binucleadas (Amini et al., 2014; Lan et al., 2019). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se demostró que las células se forman por fusión celular.

Actualmente, solo se han descrito dos proteínas que participan en la fusión de células epiteliales en *C. elegans* AFF-1 y EEF-1 (Podbilewicz & White, 1994). Sin embargo, se demostró que mutantes en AFF-1 o EEF-1 o el silenciamiento de sus genes no afectan la fusión de células germinales en condiciones silvestres o en mutantes de *ced-1/p53*, *egl-1/BH3* y *pch-2/TRIP13* (Raiders et al., 2018). Hasta ahora no se ha comprobado si *aff-1* o *eff-1* se expresan en la línea germinal. De manera indirecta se observó que un represor de AFF-1 y EEF-1, BAF-1 se expresa en la línea germinal y su mutación genera defectos en la gónada tales como la reducción del número de células germinales provocando defectos en la fertilidad (Margalit et al., 2007) lo que podría sugerir la presencia de estos fusógenos en la línea germinal.

Análisis de transcriptómica en *C. elegans* no han identificado la expresión de *aff-1* y *eff-1* en la gónada (Ebbing et al., 2018) y por esta razón no tienen un efecto directo en la fusión de las células germinales, pero sería interesante determinar si condiciones de estrés como las que usamos en este trabajo son capaces de inducir la expresión de estos fusógenos y por lo tanto su participación en la formación de células binucleadas. También es posible que la falta de *gl α -3/TTP* provoque la expresión atípica de estos fusógenos en la gónada promueva la aparición de células binucleadas en este contexto.

Cambios en la estructura del raquis se relacionan con la formación de células binucleadas.

Otro modelo explica la formación de las células germinales binucleadas por medio de cambios asociados a la estructura del raquis de la gónada (Figura 22 2b). En condiciones de crecimiento normal, la gónada presenta una estructura tubular, en donde las células germinales están dispuestas

alrededor del canal central del raquis (Figura 2). Sin embargo, como habíamos mencionado antes algunas células germinales pueden formarse una encima de la otra (Figura 22 2b), y se ha visto que esto de alguna manera permitiría que las células se fusionen (Raiders et al., 2018). Este tipo de estructura la observamos cuando se silenció a *gla-3* (Figura 20B) y también se observó que se forma en condiciones de estrés (Figura 19B).

En este trabajo se observó que el estrés induce una reducción en la estructura del raquis, y un alargamiento de las células germinales. Estos cambios podrían estar relacionados en cierta manera con la fusión celular, sin embargo, aún no quedan claro los mecanismos que regulan estos cambios. Una posibilidad, es que el choque de calor provoque un reacomodo de las células y esto genera que las células se apilen y que se fusionen. En el caso de mioblastos se ha identificado que las proteínas de choque térmico pueden regular la forma y polaridad de la célula (Shimizu et al., 2016).

Una proteína que regula la estabilidad del raquis y de los puentes del raquis es CYK-4. Esta proteína se expresa alrededor de los puentes del raquis (Lee et al., 2018) y su silenciamiento o mutación produce defectos, principalmente por la presencia de células germinales multinucleadas y de ovocitos carentes de membranas plasmáticas. A temperaturas restrictivas las mutantes en *cyk-4* pierden la membrana plasmática, lo cual origina que se formen ovocitos multinucleados (Lee et al., 2018). Aún se desconoce el mecanismo que provoca la pérdida de las membranas en esta mutante. Se ha observado que los puentes del raquis aumentan de tamaño tanto en los ovocitos como en las células germinales en la región del brazo distal en las mutantes en *cyk-4* (Lee et al., 2018). Estos datos nos sugieren que en las mutantes de *gla-3* o en condiciones de estrés, los puentes del raquis aumenten de tamaño y esto promueva la formación de células germinales binucleadas.

Se ha observado que aproximadamente 557 genes son requeridos para mantener la integridad y estructura del raquis (Green et al., 2011) ya que su silenciamiento genera diferentes defectos, entre los que destacan defectos en la proliferación celular, estructura nuclear anormal, defectos en el raquis, células multinucleadas entre otros. El silenciamiento de 62 de los genes de este grupo provoca la formación de células bi o multinucleadas. Algunos de estos genes codifican para proteínas que mantiene la integridad de la gónada, por ejemplo: α/γ tubulina, actina, dineína, laminina, GTP asas, cinasas (AIR-1, KIN-19 y GCK-1), factores transcripcionales, proteínas que participan en tráfico vesicular, reguladores de apoptosis (DAD-1) y algunas proteínas que no han sido caracterizadas (18 proteínas) (Green et al., 2011). Sería interesante determinar si la expresión y/o localización de estas proteínas se altera en condiciones de estrés. Diversos trabajos han reportado que durante el choque de calor se puede reprimir la traducción de ciertos genes (Crombie et al., 2016; Howard et al., 2016; Melnick et al., 2019) por lo que se podría probar el estado de traducción de algunos de estos genes durante el choque de calor u otros tipos de estrés.

Desarrollamos un modelo para explicar la formación de las células binucleadas, el cual está basado en modelos propuestos anteriormente (Raiders et al., 2018), y al cual se le incorporaron observaciones realizadas por otros grupos de investigación (Amini et al., 2014; Lan et al., 2019; Lee et al., 2018; Priti et al., 2018) como nuestros resultados. En una condición control las células germinales están parcialmente rodeadas por la membrana plasmática y se encuentran conectadas

por medio de los puentes del raquis, los cuales son estabilizados por diferentes proteínas (como HIM-4, ANI-1, etc.) (Figura 22 1). En el citoplasma de estas células se encuentran diferentes componentes citoplasmáticos, entre ellos los gránulos P, mitocondrias, etc. Bajo una condición de estrés como un choque de calor, las células germinales se alargan y los puentes del raquis incrementan su tamaño por lo que es posible que durante este proceso se pierdan algunos componentes citoplasmáticos (Figura 22 2a). La apertura de los puentes del raquis podría promover que la membrana plasmática que separa a dos células se pierda (Figura 22 3a). En mutantes en *gla-3* y en menor proporción en choque de calor, se ha observado la formación de células apiladas (Figura 22 2b), las cuales pueden fusionarse con las células inferiores, formando células binucleadas (Figura 22 3b) quienes son eliminadas por apoptosis.

Desconocemos los mecanismos que puedan favorecer la formación de células binucleadas, aunque es posible que diferentes señales puedan promover la fusión de células germinales como la activación de fusógenos, la traslocación de fosfatidilserina y/o la activación de la vía de MAPK, sin embargo, se requieren de estudios posteriores para corroborar esto.

CONCLUSIONES

- ✓ Los animales mutantes en *gla-3* presentan un mayor número de células binucleadas con respecto a la silvestre y esto correlaciona con una mayor apoptosis que había sido previamente observada. La mutante en este gen presenta una meiosis más lenta que la silvestre por lo que después de un estrés se tarda en formar células binucleadas.
- ✓ El estrés por choque de calor, ayuno y estrés oxidante promueven la fusión celular en la cepa silvestre. El estrés provoca un cambio en la estructura de la membrana el cual consiste en que el raquis de la gónada disminuye mientras que las células germinales aumentan de tamaño. Durante el estrés se observó que algunas células germinales se apilan unas sobre otras y se piensa que esto favorece la fusión celular.
- ✓ La mayoría de las células binucleadas son eliminadas por apoptosis, pero algunas pueden permanecer en la cepa silvestre y formar ovocitos. En algunas mutantes que no pueden inducir apoptosis en respuesta al estrés, como *tiar-1*, es más frecuente encontrar ovocitos multinucleados.
- ✓ El silenciamiento de *mpk-1* genera defectos en la estructura de la gónada por lo que este gen podría estar regulando algunos aspectos de este proceso.

PERSPECTIVAS

- Corroborar que las células binucleadas se forman por fusión celular.
- Identificar qué fusógenos participan en la fusión de las células germinales en condiciones normales y durante el estrés.
- Estudiar la participación de la fosfatidilserina en la fusión celular.
- Identificar genes que afectan la formación de células binucleadas para entender mejor cómo se da este proceso.
- Identificar qué genes están afectados en mutantes en *gla-3* para conocer los mecanismos que promueven la formación de células binucleadas en esta mutante.
- Identificar genes afectados en mutantes en *gla-3* para conocer los mecanismos que regulan la formación de células binucleadas en esta mutante.

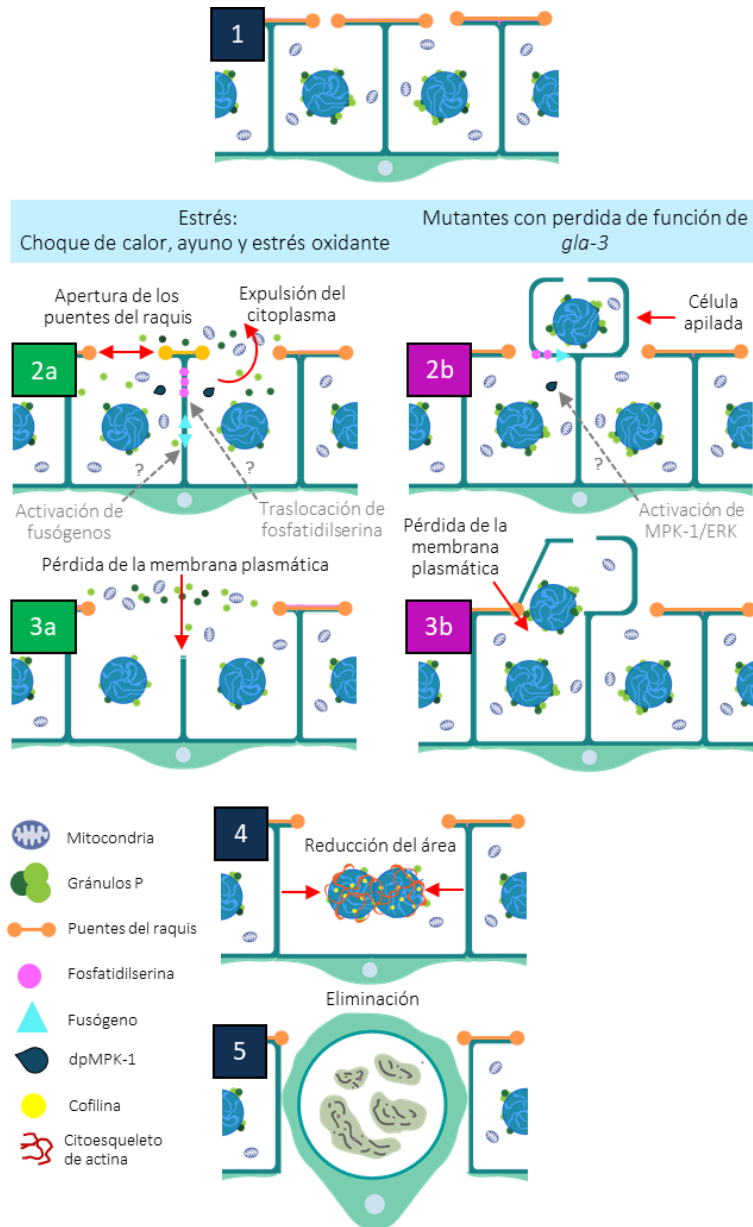
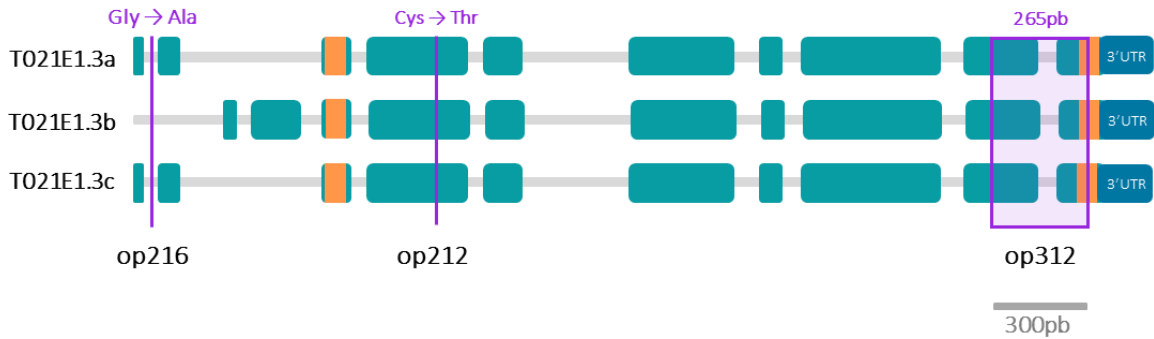
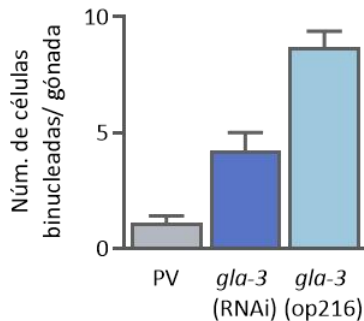
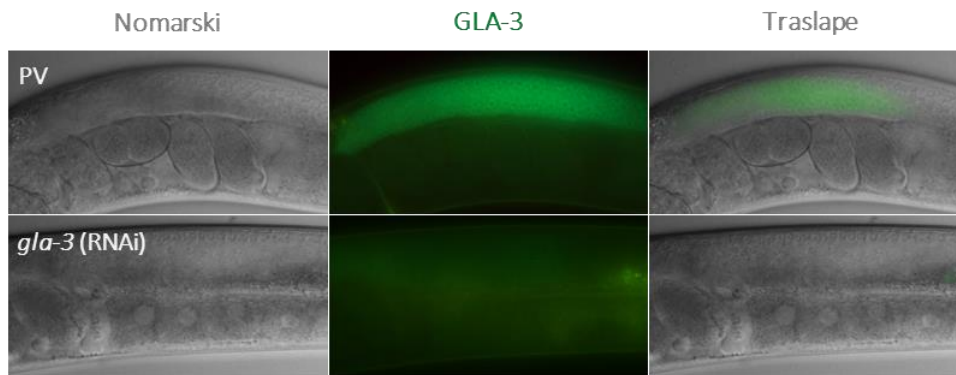


Figura 22. Modelo propuesto para la formación de las células germinales binucleadas. Esquema que representa los modelos por los cuales se forman las células binucleadas, dichos modelos fueron adaptados de reportes previos (Amini et al., 2014; Lan et al., 2019; Lee et al., 2018; Priti et al., 2018; Raiders et al., 2018) y de los resultados obtenidos en este trabajo¹. En condiciones fisiológicas normales, las células germinales están organizadas una al lado de la otra y el citoplasma está conectado mediante canales conocidos como puentes del raquis. **2a**. Bajo una condición de estrés o en ciertas condiciones genéticas (como en la mutante *gla-3*), los puentes del raquis aumentan su tamaño, lo cual permite que los componentes citoplasmáticos (como gránulos P y mitocondrias) puedan ser expulsados. **3a**. La apertura de los puentes del raquis permite que se pierda la membrana plasmática que separa dos células germinales y que se formen células binucleadas. **4**. Las células binucleadas reducen su tamaño y finalmente son eliminadas por apoptosis (**5**). Otro cambio que ocurre durante el estrés o en mutantes, es que se forman células apiladas (**2b**), las cuales pueden fusionarse para formar células binucleadas (**3b**) y son eliminadas por apoptosis (**5**).

ANEXO



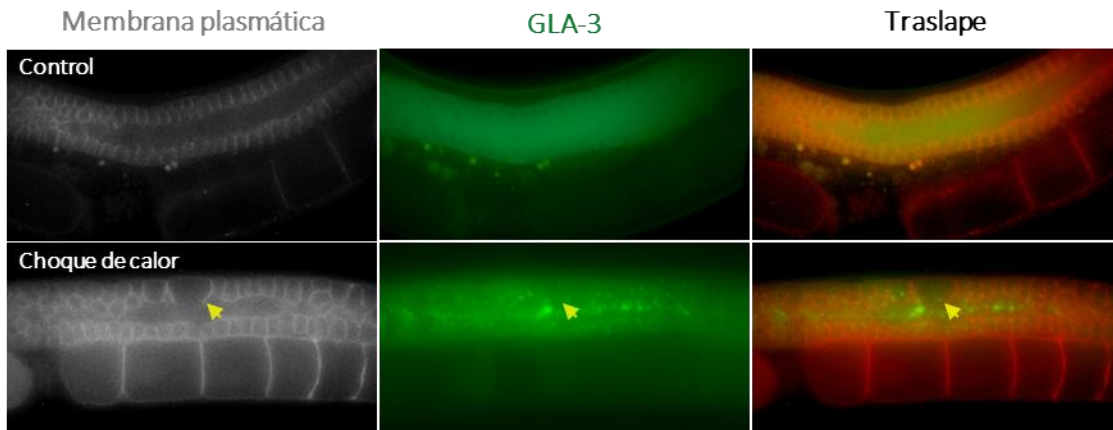
Anexo 1. Esquema de los alelos mutantes en *gla-3*. El gen de *gla-3* está conformado por diez exones (verde), los cuales se encuentran separados por intrones (gris). Por *splicing* alternativo, este gen puede generar tres isoformas (T021E1.3a, T021E1.3b y T021E1.3c). En naranja se encuentran los dominios de unión a RNA (dedos de zinc). Las mutaciones de los tres alelos se encuentran en morado, las cuales generan codones de paro prematuro o el desplazamiento del marco de lectura.



Anexo 2. Corroboración del silenciamiento de *gla-3*. Fotografías de campo claro y de fluorescencia de la gónada de nematodos GFP::*GLA-3*, los cuales fueron alimentados con sdDNA con plásmido vacío y de *gla-3*. En el plásmido vacío se observa la expresión de GFP desde la región de la punta distal hasta antes del asa en todos los organismos analizados, mientras que el silenciamiento abate la expresión de GFP::*GLA-3* en el 70% de los animales. La grafica representa la cuantificación de las células binucleadas de gónadas disecadas y teñidas con DAPI en donde se observa que en el silenciamiento de *gla-3* aumentan las células binucleadas, pero no tanto como en la mutante (*op216*).



Anexo 3. El silenciamiento de *mpk-1* afecta la morfología de la gónada. Imágenes de contraste de interferencia diferencial de nematodos silvestres colocados en presencia de dsRNA de *mpk-1* desde el estadio L1. El 40% de las gónadas se desarrolla de manera normal y pueden formar embriones, mientras que el 34% presenta una morfología aparentemente normal, pero es incapaz de desarrollar ovocitos y embriones. El resto de los nematodos (21.15%) desarrolla gónadas aberrantes (más pequeñas, incompletas o no adoptan la morfología de U) y son incapaces de formar ovocitos.



Anexo 4. El choque de calor afecta el tamaño de las células germinales. Fotografías de fluorescencia de la cruz *PLC::mCherry; GFP::GLA-3*. En la primera fila se observa la membrana plasmática en condición control y de choque de calor; en la condición de choque de calor se observa una célula germinal que presenta mayor tamaño (marcado con la punta de flecha), lo cual podría indicar que es una célula binucleada. La segunda fila son imágenes con filtro verde de fluorescencia en el que se observa la expresión de GLA-3, en condición control su expresión se observa desde la punta distal hasta la región del paquiteno y dicha expresión se observa tanto en las células germinales como en el raquis. En choque de calor GLA-3 forma gránulos de estrés principalmente en la región del raquis. La última fila es el traslape de las fotografías, en donde se aprecia que la célula germinal de mayor tamaño presenta poca expresión de GLA-3.

REFERENCIAS

- Aballay, A., & Ausubel, F. M. (2001). Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2735-2739. <https://doi.org/10.1073/pnas.041613098>
- Aguilar, P. S., Baylies, M. K., Fleissner, A., Helming, L., Inoue, N., Podbilewicz, B., Wang, H., & Wong, M. (2013). Genetic basis of cell-cell fusion mechanisms. *Trends in genetics : TIG*, 29(7), 427-437. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.01.011>
- Aguilar, P. S., Heiman, M. G., Walther, T. C., Engel, A., Schwudke, D., Gushwa, N., Kurzchalia, T., & Walter, P. (2010). Structure of sterol aliphatic chains affects yeast cell shape and cell fusion during mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4170-4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914094107>
- Altun, Z. F., & Hall, D. H. (2009). Introduction to *C. elegans* anatomy. In *Introduction to C. elegans anatomy*. <https://doi.org/doi:10.3908/wormatlas.1.1>
- Amini, R., Goupil, E., Labella, S., Zetka, M., Maddox, A. S., Labbe, J. C., & Chartier, N. T. (2014). *C. elegans* Anillin proteins regulate intercellular bridge stability and germline syncytial organization. *J Cell Biol*, 206(1), 129-143. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310117>
- Andux, S., & Ellis, R. E. (2008). Apoptosis maintains oocyte quality in aging *Caenorhabditis elegans* females. *PLoS Genet*, 4(12), e1000295. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000295>
- Angelo, G., & Van Gilst, M. R. (2009). Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science*, 326(5955), 954-958. <https://doi.org/10.1126/science.1178343>
- Arur, S., Ohmachi, M., Berkseth, M., Nayak, S., Hansen, D., Zarkower, D., & Schedl, T. (2011). MPK-1 ERK controls membrane organization in *C. elegans* oogenesis via a sex-determination module. *Developmental cell*, 20(5), 677-688. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.009>
- Arur, S., Ohmachi, M., Nayak, S., Hayes, M., Miranda, A., Hay, A., Golden, A., & Schedl, T. (2009). Multiple ERK substrates execute single biological processes in *Caenorhabditis elegans* germ-line development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4776. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812285106>
- Bai, X., Melesse, M., Sorensen Turpin, C. G., Sloan, D. E., Chen, C.-Y., Wang, W.-C., Lee, P.-Y., Simmons, J. R., Nebenfuhr, B., Mitchell, D., Klebanow, L. R., Mattson, N., Betzig, E., Chen, B.-C., Cheerambathur, D., & Bembenek, J. N. (2020). Aurora B functions at the apical surface after specialized cytokinesis during morphogenesis in *C. elegans*. *Development*, 147(1), dev181099. <https://doi.org/10.1242/dev.181099>
- Baou, M., Jewell, A., & Murphy, J. J. (2009). TIS11 family proteins and their roles in posttranscriptional gene regulation. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 634520. <https://doi.org/10.1155/2009/634520>
- Bohr, T., Ashley, G., Eggleston, E., Firestone, K., & Bhalla, N. (2016). Synaptonemal Complex Components Are Required for Meiotic Checkpoint Function in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 204(3), 987-997. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.191494>
- Bottone, M. G., Santin, G., Aredia, F., Bernocchi, G., Pellicciari, C., & Scovassi, A. I. (2013). Morphological Features of Organelles during Apoptosis: An Overview. *Cells*, 2(2), 294-305. <https://doi.org/10.3390/cells2020294>
- Bottone, M. G., Santin, G., Soldani, C., Veneroni, P., Scovassi, A. I., & Alpini, C. (2012). Intracellular distribution of Tankyrases as detected by multicolor immunofluorescence techniques. In *Eur J Histochem* (Vol. 56, pp. e4). <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.e4>
- Breimann, L., Preusser, F., & Preibisch, S. (2019). Light-microscopy methods in *C. elegans* research. *Current Opinion in Systems Biology*, 13, 82-92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.11.004>
- Brooks, S. A., & Blackshear, P. J. (2013). Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochimica et biophysica acta*, 1829(6-7), 666-679. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.02.003>
- Brukman, N. G., Uygur, B., Podbilewicz, B., & Chernomordik, L. V. (2019). How cells fuse. *J Cell Biol*, 218(5), 1436-1451. <https://doi.org/10.1083/jcb.201901017>
- Burgess, D. R., & Chang, F. (2005). Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol*, 15(3), 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.006>
- Cagnol, S., & Chambard, J.-C. (2010). ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS Journal*, 277(1), 2-21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>
- Cao, H., & Lin, R. (2008). Phosphorylation of recombinant tristetraprolin in vitro. *The protein journal*, 27(3), 163-169. <https://doi.org/10.1007/s10930-007-9119-7>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>

- Chase, D., Serafinas, C., Ashcroft, N., Kosinski, M., Longo, D., Ferris, D. K., & Golden, A. (2000). The polo-like kinase PLK-1 is required for nuclear envelope breakdown and the completion of meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genesis*, 26(1), 26-41. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1526-968x\(200001\)26:1<26::aid-gene6>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1526-968x(200001)26:1<26::aid-gene6>3.0.co;2-o)
- Chaurio, R. A., Janko, C., Muñoz, L. E., Frey, B., Herrmann, M., & Gaipal, U. S. (2009). Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(12), 4892-4914. <https://doi.org/10.3390/molecules14124892>
- Chen, D., Xiao, H., Zhang, K., Wang, B., Gao, Z., Jian, Y., Qi, X., Sun, J., Miao, L., & Yang, C. (2010). Retromer is required for apoptotic cell clearance by phagocytic receptor recycling. *Science*, 327(5970), 1261-1264. <https://doi.org/10.1126/science.1184840>
- Chernomordik, L. V., & Kozlov, M. M. (2003). Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 175-207. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161504>
- Chrestensen, C. A., Schroeder, M. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Pelo, J. W., Worthington, M. T., & Sturgill, T. W. (2004). MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Biol Chem*, 279(11), 10176-10184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310486200>
- Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czapla, H., Tanner, L., Narayanaswamy, P., Wenk, M., Nakatsu, F., & De Camilli, P. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER - Plasma membrane contacts. *Science (New York, N.Y.)*, 349, 428-432. <https://doi.org/10.1126/science.aab1370>
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Crombie, T. A., Tang, L., Choe, K. P., & Julian, D. (2016). Inhibition of the oxidative stress response by heat stress in *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Biol*, 219(Pt 14), 2201-2211. <https://doi.org/10.1242/jeb.135327>
- Darland-Ransom, M., Wu, Y.-C., & Xue, D. (2009). Programmed Cell Death in *C. elegans*. In Z. Dong & X.-M. Yin (Eds.), *Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research* (pp. 355-373). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-381-7_15
- Das, D., Chen, S.-Y., & Arur, S. (2020). ERK phosphorylates chromosomal axis component HORMA domain protein HTP-1 to regulate oocyte numbers. *Science Advances*, 6(44), eabc5580. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5580>
- Davoli, T., & de Lange, T. (2012). Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer Cell*, 21(6), 765-776. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.044>
- De, J., Lai, W. S., Thorn, J. M., Goldsworthy, S. M., Liu, X., Blackwell, T. K., & Blakeshear, P. J. (1999). Identification of four CCCH zinc finger proteins in *Xenopus*, including a novel vertebrate protein with four zinc fingers and severely restricted expression. *Gene*, 228(1-2), 133-145.
- Desouza, M., Gunning, P. W., & Stehn, J. R. (2012). The actin cytoskeleton as a sensor and mediator of apoptosis. *Bioarchitecture*, 2(3), 75-87. <https://doi.org/10.4161/bioa.20975>
- Ebbing, A., Vértessy, Á., Betist, M. C., Spanjaard, B., Junker, J. P., Berezikov, E., van Oudenaarden, A., & Korswagen, H. C. (2018). *Developmental Cell*, 47(6), 801-813.e806. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.10.016>
- Eitzen, G. (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1641(2), 175-181. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(03\)00087-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-4889(03)00087-9)
- Frézal, L., & Félix, M.-A. (2015). *C. elegans* outside the Petri dish. *eLife*, 4, e05849. <https://doi.org/10.7554/eLife.05849>
- Fukuta, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T., & Nakagama, H. (2008). Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Science*, 99(5), 1055-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00781.x>
- Gartner, A., Boag, P. R., & Blackwell, T. K. (2005). Germline Survival and Apoptosis [Text]. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK116071/>
- Giansanti, V., Rodriguez, G. E., Savoldelli, M., Gioia, R., Forlino, A., Mazzini, G., Pennati, M., Zaffaroni, N., Scovassi, A. I., & Torriglia, A. (2013). Characterization of stress response in human retinal epithelial cells. *J Cell Mol Med*, 17(1), 103-115. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01652.x>
- Green, R. A., Kao, H. L., Audhya, A., Arur, S., Mayers, J. R., Fridolfsson, H. N., Schulman, M., Schloissnig, S., Niessen, S., Laband, K., Wang, S., Starr, D. A., Hyman, A. A., Schedl, T., Desai, A., Piano, F., Gunsalus, K. C., & Oegema, K. (2011). A high-resolution *C. elegans* essential gene network based on phenotypic profiling of a complex tissue. *Cell*, 145(3), 470-482. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.037>
- Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwig, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*, 126(5), 1011.
- Gurkar, A. U., Chu, K., Raj, L., Bouley, R., Lee, S.-H., Kim, Y.-B., Dunn, S. E., Mandinova, A., & Lee, S. W. (2013). Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature communications*, 4, 2189-2189. <https://doi.org/10.1038/ncomms3189>
- Hans, F., & Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20(24), 3021-3027. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204326>
- Harrison, S. C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology*, 479-480, 498-507. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.043>

- He, B., Lu, N., & Zhou, Z. (2009). Cellular and nuclear degradation during apoptosis. *Current opinion in cell biology*, 21(6), 900-912. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.008>
- Hirsh, D., Oppenheim, D., & Klass, M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 49(1), 200-219. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90267-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90267-0)
- Hochreiter-Hufford, A. E., Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Using phosphatidylserine exposure on apoptotic cells to stimulate myoblast fusion. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1313, 141-148. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2703-6_10
- Howard, A. C., Rollins, J., Snow, S., Castor, S., & Rogers, A. N. (2016). Reducing translation through eIF4G/IFG-1 improves survival under ER stress that depends on heat shock factor HSF-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell*, 15(6), 1027-1038. <https://doi.org/10.1111/ace.12516>
- Jeong, J., & Conboy, I. M. (2011). Phosphatidylserine directly and positively regulates fusion of myoblasts into myotubes. *Biochemical and biophysical research communications*, 414(1), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.128>
- Kim, B., & Breton, S. (2016). The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis1. *Biology of Reproduction*, 94(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134965>
- Kimble, J., & Hirsh, D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 70(2), 396-417.
- Kimble, J. E., & White, J. G. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 81(2), 208-219. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90284-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90284-0)
- Kritikou, E. A., Milstein, S., Vidalain, P. O., Lettre, G., Bogan, E., Doukometzidis, K., Gray, P., Chappell, T. G., Vidal, M., & Hengartner, M. O. (2006). *C. elegans* GLA-3 is a novel component of the MAP kinase MPK-1 signaling pathway required for germ cell survival. *Genes Dev*, 20(16), 2279-2292. <https://doi.org/10.1101/gad.384506>
- Lackner, M. R., & Kim, S. K. (1998). Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase gene *mpk-1*. *Genetics*, 150(1), 103-117.
- Lai, W. S., Stumpo, D. J., Kennington, E. A., Burkholder, A. B., Ward, J. M., Fargo, D. L., & Blackshear, P. J. (2013). Life without TTP: apparent absence of an important anti-inflammatory protein in birds. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 305(7), R689-700. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00310.2013>
- Lan, H., Wang, X., Jiang, L., Wu, J., Wan, X., Zeng, L., Zhang, D., Lin, Y., Hou, C., Wu, S., & Tse, Y. C. (2019). An extracellular matrix protein promotes anillin-dependent processes in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Life Science Alliance*, 2(2), e201800152. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800152>
- Langbein, M., Strick, R., Strissel, P. L., Vogt, N., Parsch, H., Beckmann, M. W., & Schild, R. L. (2008). Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction. *Mol Reprod Dev*, 75(1), 175-183. <https://doi.org/10.1002/mrd.20729>
- Lascarez-Lagunas, L. I., Silva-Garcia, C. G., Dinkova, T. D., & Navarro, R. E. (2014). LIN-35/Rb causes starvation-induced germ cell apoptosis via CED-9/Bcl2 downregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol*, 34(13), 2499-2516. <https://doi.org/10.1128/mcb.01532-13>
- Lee, H. O., Davidson, J. M., & Duronio, R. J. (2009). Endoreplication: polyploidy with purpose. *Genes & development*, 23(21), 2461-2477. <https://doi.org/10.1101/gad.1829209>
- Lee, K. Y., Green, R. A., Gutierrez, E., Gomez-Cavazos, J. S., Kolotuev, I., Wang, S., Desai, A., Groisman, A., & Oegema, K. (2018). CYK-4 functions independently of its centraspindlin partner ZEN-4 to cellularize oocytes in germline syncytia. *Elife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.36919>
- Lettre, G., & Hengartner, M. O. (2006). Developmental apoptosis in *C. elegans*: a complex CEDnario. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 97-108. <https://doi.org/10.1038/nrm1836>
- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, 189(4), 1145-1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Liu, M., Hassana, S., & Stiles, J. K. (2016). Heme-mediated apoptosis and fusion damage in BeWo trophoblast cells. *Sci Rep*, 6, 36193. <https://doi.org/10.1038/srep36193>
- Liu, X., Li, X., Ma, R., Xiong, B., Sun, S. C., Liu, H., & Gu, L. (2016). Tristetraprolin functions in cytoskeletal organization during mouse oocyte maturation. *Oncotarget*, 7(33), 53330-53338. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10755>
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175-184. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80197-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80197-x)
- Lu, Y.-C., Lee, Y.-R., Liao, J.-D., Lin, C.-Y., Chen, Y.-Y., Chen, P.-T., & Tseng, Y.-S. (2016). Reversine Induced Multinucleated Cells, Cell Apoptosis and Autophagy in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS one*, 11(7), e0158587-e0158587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158587>
- Madl, J. E., & Herman, R. K. (1979). Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 93(2), 393-402.

- Margalit, A., Neufeld, E., Feinstein, N., Wilson, K. L., Podbilewicz, B., & Gruenbaum, Y. (2007). Barrier to autointegration factor blocks premature cell fusion and maintains adult muscle integrity in *C. elegans*. *The Journal of cell biology*, 178(4), 661-673. <https://doi.org/10.1083/jcb.200704049>
- Martens, S., & McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 543-556. <https://doi.org/10.1038/nrm2417>
- Mashima, T., Naito, M., & Tsuruo, T. (1999). Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis. *Oncogene*, 18(15), 2423-2430. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202558>
- Melnick, M., Gonzales, P., Cabral, J., Allen, M. A., Dowell, R. D., & Link, C. D. (2019). Heat shock in *C. elegans* induces downstream of gene transcription and accumulation of double-stranded RNA. *PLoS one*, 14(4), e0206715-e0206715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206715>
- Mohler, W. A., Shemer, G., del Campo, J. J., Valansi, C., Opoku-Serebuoh, E., Scranton, V., Assaf, N., White, J. G., & Podbilewicz, B. (2002). The Type I Membrane Protein EFF-1 Is Essential for Developmental Cell Fusion. *Developmental Cell*, 2(3), 355-362. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00129-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00129-6)
- Morthorst, T. H., & Olsen, A. (2013). Cell-nonautonomous inhibition of radiation-induced apoptosis by dynein light chain 1 in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Dis*, 4, e799. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.319>
- Ndozangue-Touriguine, O., Hamelin, J., & Breard, J. (2008). Cytoskeleton and apoptosis. *Biochem Pharmacol*, 76(1), 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.03.016>
- Nishimura, K., Watanabe, S., Hayashida, R., Sugishima, S., Iwasaka, T., & Kaku, T. (2016). Binucleated HeLa cells are formed by cytokinesis failure in starvation and keep the potential of proliferation. *Cytotechnology*, 68(4), 1123-1130. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9869-6>
- Noubissi, F. K., Harkness, T., Alexander, C. M., & Ogle, B. M. (2015). Apoptosis-induced cancer cell fusion: a mechanism of breast cancer metastasis. *The FASEB Journal*, 29(9), 4036-4045. <https://doi.org/10.1096/fj.15-271098>
- Oren-Suissa, M., & Podbilewicz, B. (2010). Evolution of programmed cell fusion: common mechanisms and distinct functions. *Dev Dyn*, 239(5), 1515-1528. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22284>
- Oropesa-Avila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Porcuna, J., Villanueva-Paz, M., Fernandez-Vega, A., de la Mata, M., de Laveria, I., Rivero, J. M., Luzon-Hidalgo, R., Alvarez-Cordoba, M., Cotán, D., Zaderenko, A. P., Cordero, M. D., & Sanchez-Alcázar, J. A. (2017). Two coffins and a funeral: early or late caspase activation determines two types of apoptosis induced by DNA damaging agents. *Apoptosis*, 22(3), 421-436. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1337-z>
- Pandit, S. K., Westendorp, B., & de Bruin, A. (2013). Physiological significance of polyploidization in mammalian cells. *Trends Cell Biol*, 23(11), 556-566. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.002>
- Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X., & Xue, D. (2001). Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature*, 412(6842), 90-94. <https://doi.org/10.1038/35083608>
- Patil, S., & Blackshear, P. J. (2016). Tristetraprolin as a Therapeutic Target in Inflammatory Disease. *Trends in pharmacological sciences*, 37(10), 811-821. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.07.002>
- Pazdernik, N., & Schedl, T. (2013). Introduction to germ cell development in *Caenorhabditis elegans*. *Advances in experimental medicine and biology*, 757, 1-16. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4_1
- Perrin, A. J., Gunda, M., Yu, B., Yen, K., Ito, S., Forster, S., Tissenbaum, H. A., & Derry, W. B. (2013). Noncanonical control of *C. elegans* germline apoptosis by the insulin/IGF-1 and Ras/MAPK signaling pathways. *Cell Death & Differentiation*, 20(1), 97-107. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.101>
- Podbilewicz, B. (2000). Membrane fusion as a morphogenetic force in nematode development. *Nematology*, 2, 99-111. <https://doi.org/10.1163/156854100508818>
- Podbilewicz, B., Leikina, E., Sapir, A., Valansi, C., Suissa, M., Shemer, G., & Chernomordik, L. V. (2006). The *C. elegans* Developmental Fusogen EFF-1 Mediates Homotypic Fusion in Heterologous Cells and In Vivo. *Developmental Cell*, 11(4), 471-481. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.004>
- Podbilewicz, B., Leikina, E., Sapir, A., Valansi, C., Suissa, M., Shemer, G., & Chernomordik, L. V. (2006). The *C. elegans* developmental fusogen EFF-1 mediates homotypic fusion in heterologous cells and in vivo. *Dev Cell*, 11(4), 471-481. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.004>
- Podbilewicz, B., & White, J. G. (1994). Cell fusions in the developing epithelial of *C. elegans*. *Developmental biology*, 161(2), 408-424. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1041>
- Povea-Cabello, S., Oropesa-Ávila, M., de la Cruz-Ojeda, P., Villanueva-Paz, M., de la Mata, M., Suárez-Rivero, J. M., Álvarez-Córdoba, M., Villalón-García, I., Cotán, D., Ybot-González, P., & Sánchez-Alcázar, J. A. (2017). Dynamic Reorganization of the Cytoskeleton during Apoptosis: The Two Coffins Hypothesis. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2393. <https://doi.org/10.3390/ijms18112393>
- Priti, A., Ong, H. T., Toyama, Y., Padmanabhan, A., Dasgupta, S., Krajnc, M., & Zaidel-Bar, R. (2018). Syncytial germline architecture is actively maintained by contraction of an internal actomyosin corset. *Nature Communications*, 9(1), 4694. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07149-2>
- Rahman, M. M., Munzig, M., Kaneshiro, K., Lee, B., Strome, S., Muller-Reichert, T., & Cohen-Fix, O. (2015). *Caenorhabditis elegans* polo-like kinase PLK-1 is required for merging parental genomes into a single nucleus. *Mol Biol Cell*, 26(25), 4718-4735. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-04-0244>

- Raiders, S. A., Eastwood, M. D., Bacher, M., & Priess, J. R. (2018). Binucleate germ cells in *Caenorhabditis elegans* are removed by physiological apoptosis. *PLoS Genet*, 14(7), e1007417. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007417>
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J., & Priess, J. R. (1997). Summary of Anatomy and Development of the Germ Line [Text]. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20021/>
- Rios, A. C., Fu, N. Y., Jamieson, P. R., Pal, B., Whitehead, L., Nicholas, K. R., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2016). Essential role for a novel population of binucleated mammary epithelial cells in lactation. *Nature Communications*, 7(1), 11400. <https://doi.org/10.1038/ncomms11400>
- Robinson-Thiewes, S., Dufour, B., Martel, P.-O., Lechasseur, X., Brou, A. A. D., Roy, V., Chen, Y., Kimble, J., & Narbonne, P. (2020). Non-autonomous regulation of germline stem cell proliferation by somatic MPK-1/MAPK activity in *C. elegans*. *bioRxiv*, 2020.2008.2024.265249. <https://doi.org/10.1101/2020.08.24.265249>
- Rolland, S., & Conradt, B. (2006). The role of mitochondria in apoptosis induction in *Caenorhabditis elegans*: more than just innocent bystanders? *Cell Death & Differentiation*, 13(8), 1281-1286. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401980>
- Rutkowski, R., Dickinson, R., Stewart, G., Craig, A., Schimpl, M., Keyse, S. M., & Gartner, A. (2011). Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis by Ras/MAPK signaling. *PLoS genetics*, 7(8), e1002238-e1002238. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002238>
- Salinas, L. S., Maldonado, E., & Navarro, R. E. (2006). Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death & Differentiation*, 13(12), 2129-2139. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401976>
- Samejima, K., & Earnshaw, W. C. (2005). Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(9), 677-688. <https://doi.org/10.1038/nrm1715>
- Sandler, H., & Stoecklin, G. (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 3), 491-496. <https://doi.org/10.1042/bst0360491>
- Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V., & Dixon, D. A. (2012). The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17, 174-188. <https://doi.org/10.2741/3920>
- Sapir, A., Choi, J., Leikina, E., Avinoam, O., Valansi, C., Chernomordik, L. V., Newman, A. P., & Podbilewicz, B. (2007). AFF-1, a FOS-1-regulated fusogen, mediates fusion of the anchor cell in *C. elegans*. *Developmental cell*, 12(5), 683-698. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.003>
- Schertel, C., & Conradt, B. (2007). *C. elegans* orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions. *Development*, 134(20), 3691. <https://doi.org/10.1242/dev.004606>
- Schumacher, B., Hanazawa, M., Lee, M.-H., Nayak, S., Volkmann, K., Hofmann, R., Hengartner, M., Schedl, T., & Gartner, A. (2005). Translational Repression of *C. elegans* p53 by GLD-1 Regulates DNA Damage-Induced Apoptosis. *Cell*, 120(3), 357-368. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.009>
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J., & Breard, J. (2001). Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol*, 3(4), 346-352. <https://doi.org/10.1038/35070019>
- Segev, N., Avinoam, O., & Podbilewicz, B. (2018). Fusogens. *Current Biology*, 28(8), R378-R380. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.024>
- Sharma, N. R., Mani, P., Nandwani, N., Mishra, R., Rana, A., & Sarkar, D. P. (2010). Reciprocal regulation of AKT and MAP kinase dictates virus-host cell fusion. *Journal of virology*, 84(9), 4366-4382. <https://doi.org/10.1128/JVI.01940-09>
- Shimizu, M., Tanaka, M., & Atomi, Y. (2016). Small Heat Shock Protein α B-Crystallin Controls Shape and Adhesion of Glioma and Myoblast Cells in the Absence of Stress. *PLOS ONE*, 11(12), e0168136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168136>
- Silva-García, C. G., & Estela Navarro, R. (2013). The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis*, 51(10), 690-707. <https://doi.org/10.1002/dvg.22418>
- Stoecklin, G., Stubbs, T., Kedersha, N., Wax, S., Rigby, W. F., Blackwell, T. K., & Anderson, P. (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *Embo j*, 23(6), 1313-1324. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600163>
- Stoecklin, G., Tenenbaum, S. A., Mayo, T., Chittur, S. V., George, A. D., Baroni, T. E., Blackshear, P. J., & Anderson, P. (2008). Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry*, 283(17), 11689-11699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709657200>
- Stoll, L. M., Duffield, A. S., Johnson, M. W., & Ali, S. Z. (2011). Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes with erythroid differentiation involving pleural fluid: a case report and brief cytopathologic review. *Diagn Cytopathol*, 39(6), 451-454. <https://doi.org/10.1002/dc.21470>
- Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 56(1), 110-156.

- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, *100*(1), 64-119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Sunadome, K., Yamamoto, T., Ebisuya, M., Kondoh, K., Sehara-Fujisawa, A., & Nishida, E. (2011). ERK5 Regulates Muscle Cell Fusion through Klf Transcription Factors. *Developmental Cell*, *20*(2), 192-205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.005>
- Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., Patel, D. D., Schenkman, D. I., Gilkeson, G. S., Broxmeyer, H. E., Haynes, B. F., & Blackshear, P. J. (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*, *4*(5), 445-454.
- Tsuchiya, M., Hara, Y., Okuda, M., Itoh, K., Nishioka, R., Shiomi, A., Nagao, K., Mori, M., Mori, Y., Ikenouchi, J., Suzuki, R., Tanaka, M., Ohwada, T., Aoki, J., Kanagawa, M., Toda, T., Nagata, Y., Matsuda, R., Takayama, Y., Tominaga, M., & Umeda, M. (2018). Cell surface flip-flop of phosphatidylserine is critical for PIEZO1-mediated myotube formation. *Nature Communications*, *9*(1), 2049. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04436-w>
- van den Eijnde, S. M., Boshart, L., Baehrecke, E. H., De Zeeuw, C. I., Reutelingsperger, C. P., & Vermeij-Keers, C. (1998). Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. *Apoptosis*, *3*(1), 9-16. <https://doi.org/10.1023/a:1009650917818>
- Verma, S. K., Leikina, E., Melikov, K., Gebert, C., Kram, V., Young, M. F., Uygur, B., & Chernomordik, L. V. (2018). Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion. *J Biol Chem*, *293*(1), 254-270. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.809681>
- Wang, X., Li, W., Zhao, D., Liu, B., Shi, Y., Chen, B., Yang, H., Guo, P., Geng, X., Shang, Z., Peden, E., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., & Xue, D. (2010). *Caenorhabditis elegans* transthyretin-like protein TTR-52 mediates recognition of apoptotic cells by the CED-1 phagocyte receptor. *Nat Cell Biol*, *12*(7), 655-664. <https://doi.org/10.1038/ncb2068>
- Weng, J., Kremontsov, D. N., Khurana, S., Roy, N. H., & Thali, M. (2009). Formation of syncytia is repressed by tetraspanins in human immunodeficiency virus type 1-producing cells. *J Virol*, *83*(15), 7467-7474. <https://doi.org/10.1128/jvi.00163-09>
- Willkomm, L., & Bloch, W. (2015). State of the art in cell-cell fusion. *Methods Mol Biol*, *1313*, 1-19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2703-6_1
- Wolke, U., Jezuit, E. A., & Priess, J. R. (2007). Actin-dependent cytoplasmic streaming in *C. elegans* oogenesis. *Development*, *134*(12), 2227-2236. <https://doi.org/10.1242/dev.004952>
- Wong, C. M., Poulin, K. L., Tong, G., Christou, C., Kennedy, M. A., Falls, T., Bell, J. C., & Parks, R. J. (2016). Adenovirus-Mediated Expression of the p14 Fusion-Associated Small Transmembrane Protein Promotes Cancer Cell Fusion and Apoptosis In Vitro but Does Not Provide Therapeutic Efficacy in a Xenograft Mouse Model of Cancer. *PLoS One*, *11*(3), e0151516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151516>
- Wu, Y. C., & Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell*, *93*(6), 951-960. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81201-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81201-5)
- Wu, Y. C., Stanfield, G. M., & Horvitz, H. R. (2000). NUC-1, a *caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev*, *14*(5), 536-548.
- Ydenberg, C. A., & Rose, M. D. (2008). Yeast mating: a model system for studying cell and nuclear fusion. *Methods Mol Biol*, *475*, 3-20. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-250-2_1
- Yuan, H., Zhang, P., Qin, L., Chen, L., Shi, S., Lu, Y., Yan, F., Bai, C., Nan, X., Liu, D., Li, Y., Yue, W., & Pei, X. (2008). Overexpression of SPINDLIN1 induces cellular senescence, multinucleation and apoptosis. *Gene*, *410*(1), 67-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.11.019>
- Zaitseva, E., Zaitsev, E., Melikov, K., Arakelyan, A., Marin, M., Villasmil, R., Margolis, L. B., Melikyan, G. B., & Chernomordik, L. V. (2017). Fusion Stage of HIV-1 Entry Depends on Virus-Induced Cell Surface Exposure of Phosphatidylserine. *Cell Host & Microbe*, *22*(1), 99-110.e117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.012>
- Zarkower, D. (2006). Somatic sex determination [Text]. *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19759/>
- Zhang, Y., Chen, X., Gueydan, C., & Han, J. (2018). Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell research*, *28*(1), 9-21. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.133>
- Züllig, S., Neukomm, L. J., Jovanovic, M., Charette, S. J., Lyssenko, Nicholas N., Halleck, M. S., Reutelingsperger, Chris P. M., Schlegel, R. A., & Hengartner, M. O. (2007). Aminophospholipid Translocase TAT-1 Promotes Phosphatidylserine Exposure during *C. elegans* Apoptosis. *Current Biology*, *17*(11), 994-999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.024>