



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

El silenciamiento de las proteínas de unión a RNA PGL-1 y CAR-1 afecta la estructura y la composición de los gránulos de RNA en la gónada de *Caenorhabditis elegans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
CARLA HUEZCA CARBAJAL

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

MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR
DR. JESÚS AGUIRRE LINARES
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)
DR. CÉSAR LUIS CUEVAS VELÁZQUEZ
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México Septiembre, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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-FRONTERRAS) 101731, del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN210821 y del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Carla Huezca Carbajal recibió una beca de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) con número de CVU 1008374. También recibió apoyo de una beca de proyecto del Programa de Apoyo a la Innovación e Investigación Tecnológica (PAPIIT-UNAM) IN210821.

Agradecimientos

Agradecimientos al Comité Tutorial, el Dr. Cesar Luis Cuevas Velázquez y al Dr. Jesús Aguirre Linares por su asesoría y sus valiosas recomendaciones.

Agradecimientos al jurado al Dr. Mario Enrique Zurita Ortega, al Dr. Roberto Coria Ortega, al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, al Dr. Juan Miranda Ríos y al Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes.

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

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

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

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.

A mi tutora la Dra. Rosa Estela Navarro González por recibirme y haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su paciencia, enseñanzas, consejos y tiempo para discusión del presente trabajo.

Un especial agradecimiento al Dr. Cesar Luis Cuevas Velázquez por su asesoría en el uso de las herramientas bioinformáticas de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Daniel y Alan por haberme acompañado, instruido y apoyado en el desarrollo del presente trabajo.

A mis padres Juan Carlos y Margarita quienes siempre han estado conmigo en los buenos y malos momentos y por haberme motivado a terminar mis propósitos. Así como a mi hermano Juan Carlos, quien siempre me ha apoyado y quien es un pilar en mi vida.

Índice

I.	Introducción	1
1.1.	<i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio.....	1
1.1.1.	<i>La biología del nematodo Caenorhabditis elegans</i>	1
1.1.2.	Ciclo de vida	2
1.1.3.	Varios de los genes del <i>C. elegans</i> están conservados.	4
1.1.4.	Anatomía	4
1.1.5.	La gónada.....	4
1.2.	Los gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs).....	7
1.3.	Características de los gránulos de RNPs y de las proteínas que los componen que contribuyen a la separación de fases líquida-líquida.....	8
1.4.	La composición de aminoácidos de las proteínas que promueven la separación de fases.....	9
1.5.	Tipos de gránulos de ribonucleoproteínas citoplasmáticos	10
1.5.1.	Los gránulos de transporte neuronal	10
1.5.2.	Los cuerpos de procesamiento o cuerpos P (PB)	11
1.5.3.	Los gránulos de estrés (GS).....	11
1.5.4.	Gránulos germinales.....	12
1.6.	Los gránulos RNPs en la línea germinal de <i>C.elegans</i>	13
1.7.	La gónada de <i>C. elegans</i> bajo condiciones de estrés.....	15
II.	Antecedentes.....	18
2.1.	El silenciamiento de los genes <i>pgl-1, ife-1, mex-5, car-1</i> y <i>cey-2</i> provoca la formación de gránulos de RNPs en la gónada del <i>C. elegans</i>	18
2.2.	Características y funciones de las proteínas CGH-1, IFE-1, PGL-1, CAR-1, CEY-2 y MEX-5 en la gónada de <i>C.elegans</i>	20
III.	Planteamiento del problema	22
IV.	Hipótesis.....	23
V.	Objetivo general.....	23
VI.	Objetivos particulares	23
VII.	Materiales y métodos	24
7.1.	Mantenimiento de las cepas de <i>C. elegans</i>	24
7.2.	Silenciamiento de genes por RNA de interferencia (RNAi)	25
7.3.	Sincronización de <i>C. elegans</i>	27
7.4.	Choque térmico	27

7.5.	Montaje para la observación de los gránulos de estrés	28
7.6.	Análisis de las fotografías tomadas y estadística	28
7.7.	Estudio de la arquitectura de la gónada	28
7.8.	Análisis bioinformáticos	28
7.8.1.	Secuencias de aminoácidos	28
7.8.2.	Predicción de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) y carga de hidropatía	29
7.8.3.	Predicción de secuencias similares a priones.	29
7.8.4.	Predicción de regiones de baja complejidad LCR	29
7.8.5.	Predicción de separación de fases	29
VIII.	Resultados.....	30
8.1.	Los análisis bioinformáticos de las proteínas PGL-1, TIAR-1, GLA-3, CAR-1, CEY-2 y MEX-5 predicen dominios que favorecen la formación de gránulos de RNPs.....	30
8.2.	De acuerdo a predicciones bioinformáticas las proteínas CAR-1 y PGL-1 podrían poseer una gran capacidad de autoasociación para formar gránulos... 33	33
8.3.	El silenciamiento de <i>car-1</i> y <i>pgl-1</i> promueve la formación de gránulos de GFP::GLA-3 en el centro de la gónada de <i>C.elegans</i>	34
8.4.	El silenciamiento de <i>pgl-1</i> y <i>car-1</i> afecta la distribución de los gránulos de GFP::GLA-3 en la gónada de <i>C. elegans</i> durante un choque térmico.	37
8.5.	El silenciamiento del gen <i>car-1</i> provoca cambios estructurales en la gónada de <i>C. elegans</i>	40
IX.	Discusión	42
X.	Conclusiones	49
XI.	Perspectivas	50
XII.	Suplementarias.....	51
XIII.	Referencias	63

Resumen

El *C. elegans* es una especie de nematodo principalmente hermafrodita, con una gónada que es un sincicio formado por dos brazos idénticos en forma de U (Pazdernik, 2013). El *C. elegans* tiene relevancia en el estudio de la salud y las enfermedades humanas ya que entre el 60 y 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans* (Corsi, 2015).

En la gónada de *C. elegans* existen varios tipos de gránulos como: los cuerpos P, los gránulos germinales y cuando el gusano se encuentra en condiciones adversas, se forman gránulos de estrés (Sidibé, 2019). Estos gránulos están compuestos por ribonucleoproteínas (RNPs), además carecen de membrana y a causa de su notable plasticidad molecular son ampliamente utilizados por las células para regular una variedad de funciones (Sidibé, 2019). Los gránulos de RNPs se encuentran en un estado líquido que coexiste con el citoplasma que también está en estado líquido. Debido a esto, se ha propuesto que su formación ocurre por una separación de fases líquida-líquida (Kroschwald, 2015).

Entre las proteínas que se han identificado en algún tipo de gránulo de RNPs se encuentran: IFE-1, PGL-1, CAR-1, CEY-2 y MEX-5. Previamente, en el laboratorio se evaluó el efecto del silenciamiento de los genes *ife-1*, *pgl-1*, *car-1*, *cey-2* y *mex-5* en la formación de gránulos de la helicasa de RNA CGH-1 (proteína marcadora de gránulos de RNPs en la gónada de *C. elegans*, que se encuentra en la mayoría de los gránulos de RNPs) y bajo condiciones control se observaron gránulos CGH-1, principalmente en el centro de la gónada. Estos datos nos sugieren que las proteínas IFE-1, PGL-1, CAR-1, CEY-2 y MEX-5, podrían tener un papel clave en la regulación de los gránulos de RNPs, sin embargo, aún no es claro a qué tipo de gránulo afectan y si alteran directamente su función, su tamaño o localización o si estas proteínas pueden contribuir a la estructura de la gónada de *C. elegans*.

En este trabajo se estudió el efecto del silenciamiento de los genes *ife-1*, *pgl-1*, *car-1* y *mex-5* por RNAi, en la formación de gránulos de los marcadores de gránulos TIAR-1 (marcador canónico de gránulos de estrés) y GLA-3, tanto en condiciones control como bajo estrés (choque térmico). Los resultados de la distribución y el tamaño de los gránulos de estrés con el silenciamiento de *car-1* (componente clave de los gránulos de procesamiento) y *pgl-1* (componente clave de los gránulos germinales) nos dan indicios de que la alteración de los componentes de los cuerpos de procesamiento y/o los gránulos germinales influyen en la localización, volumen total y probablemente en la composición de los cuerpos de procesamiento y de estrés. Además, encontramos que el silenciamiento de *car-1* promueve la presencia de células multinucleadas, células apiladas y una reducción significativa del diámetro del centro de la gónada, estos datos nos indican que posiblemente esta proteína participa de alguna manera en la estructura de la gónada.

I. Introducción

1.1. *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

1.1.1. La biología del nematodo *Caenorhabditis elegans*

En 1897, Emile Maupas, un zoólogo y botánico francés, describió a *C. elegans* como una especie de nematodo que vive en el humus. Los *C. elegans* son principalmente hermafroditas, tienen una vulva que se encuentra detrás del punto medio del cuerpo, pero también se pueden encontrar machos, con una frecuencia menor al 0.2%, los cuales se caracterizan por una estructura en la cola con una bursa en forma de corazón aplanada, que contiene nueve pares de papilas que les sirve para aparearse (Pazdernik, 2013). Este nematodo se distribuye en áreas templadas húmedas de todo el mundo, en suelos ricos en materiales vegetales en descomposición como frutos y tallos herbáceos gruesos los cuales contienen bacterias que le sirven de alimento (Frézal y Félix, 2015).

En 1963, Sydney Brenner escribió en una carta a su jefe de departamento (Max Perutz), que el “futuro de la biología molecular radica en la extensión de la investigación a otros campos de la biología, en particular el desarrollo y el sistema nervioso”. Para abordar estos campos él propuso el uso de un organismo metazóico que se pudiera manipular de la misma manera que se manejan las bacterias y los virus; por lo que sugirió al nematodo *C. elegans* como modelo de estudio (Pazdernik, 2013).

El *C. elegans* es un nematodo de vida libre pequeño (1mm) y transparente que no necesita ser diseccionado para poder observar sus estructuras internas, tiene un ciclo de vida corto (aproximadamente 3 días desde el embrión hasta el adulto con capacidad reproductiva), que produce una gran progenie (aproximadamente 300 hijos). Su reproducción puede ser por autofecundación, en gusanos hermafroditas, o por apareamiento con machos, lo que hace que *C. elegans* sea excepcionalmente útil para estudios genéticos. Es un organismo altamente diferenciado puesto que tiene 959 células somáticas por lo que es un sistema manejable para estudios de la función, desarrollo y diferenciación celular en metazoos (Apfeld, 2018). Asimismo,

C.elegans es un organismo fácilmente cultivable y puede sobrevivir a la congelación (-80°C en nitrógeno líquido) o a períodos largos sin alimento, lo que lo hace ideal para la experimentación (Frézal y Félix, 2015).

1.1.2. Ciclo de vida

En condiciones favorables, después de completar el desarrollo embrionario, las larvas L1 de *C. elegans* emergen del huevo y comienzan a alimentarse, para continuar su crecimiento a las siguientes etapas larvarias (L2, L3, L4). El final de cada etapa larvaria se marca con una muda, durante la cual se sintetiza una nueva cutícula específica de la etapa y se desprende la anterior. Después de las etapas larvarias, los organismos entran a la etapa adulta. Todo el ciclo tiene una duración aproximadamente de 3 días (Altun, 2009) (figura 1).

En contraste, bajo condiciones estresantes, como el aumento de la densidad poblacional, el suministro limitado de comida y el estrés por condiciones ambientales, las larvas L1 entran en un estado diapausa conocido como larva Dauer y detienen su desarrollo. En este estado los animales pueden vivir hasta 3 meses, en contraste a los 20 días que viven en condiciones favorables. La larva Dauer se forma si los organismos en L1 se encuentran en ayuno cuando eclosionan. En esa condición detienen su desarrollo de tal forma que si el estrés persiste pueden desencadenar la formación de una larva morfológicamente distinta a la etapa L2 denominada L2d o predauer. La larva L2d retiene el potencial de formar una larva dauer o una larva L3, dependiendo de la persistencia de los parámetros ambientales, si el ambiente continúa siendo desventajoso, la larva de la etapa L2d se transforma en un Dauer. El Dauer se considera como un estado sin envejecimiento porque su duración no afecta la vida del animal (Wolkow, 2015; Carranza–García, 2020). Una vez que el Dauer encuentra una fuente de alimento, reanuda el desarrollo reproductivo mediante la muda a larva L4 y, posteriormente, a adulto reproductivo (figura 1). Las larvas Dauer son muy resistentes al estrés. De manera alternativa, los animales también detienen su desarrollo en la etapa L1, en donde se vuelven más resistentes a otros tipos de estrés llegando a sobrevivir hasta 10 días hasta que se les proporcione alimento (Carranza–García, 2020).

Durante la etapa larvaria tardía L3, los hermafroditas comienzan a producir espermatozoides que serán almacenados en la espermateca. Como adultos únicamente producirán ovocitos. Los hermafroditas adultos de *C. elegans* son fértiles por 3 o 4 días y pueden producir aproximadamente 300 individuos por autofecundación. Su fertilidad está limitada por el número de espermatozoides que producen, no obstante, si se cruzan con un macho pueden llegar a tener hasta 500 hijos. Al término del periodo reproductivo, estos animales entran a una etapa post-reproductiva que dura entre 12 y 30 días antes de la muerte (Pazdernik 2013). Durante la etapa post-reproductiva disminuyen las tasas de alimentación, defecación y locomoción, los tejidos se deterioran y los animales se vuelven más sensibles a la infección microbiana, estos cambios en conjunto conducen a la muerte del organismo (Herndon, 2018).

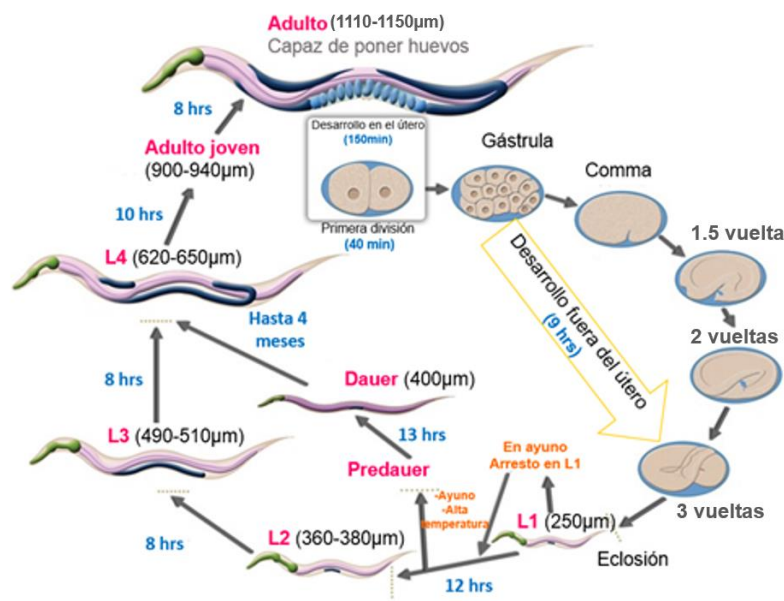


Figura 1 Ciclo de vida de *C. elegans*. Después de la fertilización, la primera división embrionaria ocurre aproximadamente en 40 minutos. La embriogénesis dura aproximadamente 14 h a 20° C. Posteriormente pasa por 4 etapas larvares que van de L1-L4 hasta llegar a la etapa adulta. Los números azules indican el tiempo de transición entre etapas. La longitud del animal en cada etapa está marcada en micrómetros (µm). Figura modificada de Altun, 2009.

1.1.3. Varios de los genes del *C. elegans* están conservados.

El material genético de *C. elegans* se encuentra empacado en cinco pares de cromosomas autosómicos y un par de cromosomas sexuales X-, si es hermafrodita (XX) y si es macho un cromosoma sexual (X0). El *C. elegans* fue el primer organismo multicelular al que se le secuenció su genoma completo (Corsi, 2015). Entre el 60 y 80% de los genes humanos tienen un ortólogo en el genoma de *C. elegans*, y se calcula que el 40% de los genes de este gusano tienen homólogos en mamíferos que están relacionados con enfermedades. Por lo que muchos descubrimientos en *C. elegans* tienen relevancia para el estudio de la salud y las enfermedades humanas (Corsi, 2015).

1.1.4. Anatomía

A pesar de su pequeño, tamaño este nematodo cuenta con un sistema digestivo, nervioso, reproductivo y musculatura (figura 2a). El sistema nervioso del adulto hermafrodita está conformado por 302 neuronas en 56 ganglios, mientras que los machos tienen 381 neuronas en 92 ganglios (Strange, 2006). Una característica importante del *C. elegans* es que en su sistema nervioso solo tres nervios son esenciales para la viabilidad del organismo, los cuales son CANL y CANR, neuronas que recorren el canal excretor y juegan un papel importante en el sistema de regulación de agua y sal; y el nervio M4, que está constituido por las neuronas motoras faríngeas que controlan el istmo peristaltismo y por lo tanto controlan la alimentación (Altun 2011; Strange, 2006).

1.1.5. La gónada

La gónada de un adulto hermafrodita consiste en dos brazos idénticos en forma de U cada uno con aproximadamente 1000 células germinales y 143 células somáticas, cada brazo cuenta con una espermateca que se conecta a un útero en común (Pazdernik 2013). Las células germinales de cada brazo de la gónada están rodeados por un epitelio conocido como vaina. La parte más distal de cada brazo (la más alejada al útero) contiene células germinales troncales que mantienen la población de células germinales y da lugar a los gametos. Cada célula germinal está

rodeada por una membrana plasmática incompleta que tiene un puente que conecta el citoplasma de todas las células con el centro del tubo de la gónada formando un sincicio (figura 2b) (Strange, 2006). La gónada masculina en lugar de tener dos brazos simétricos tiene sólo uno, el cual contiene aproximadamente 1000 células germinales y 56 células somáticas (Pazdernik 2013).

La punta distal de cada brazo de la gónada cuenta con una célula somática grande llamada célula de la punta distal (DTC). Esta célula tiene dos funciones principales, la primera es dirigir el crecimiento de la gónada durante el desarrollo del nematodo y la segunda es mantener la proliferación de las células germinales troncales (Lints, R, 2009). La DTC mantiene la mitosis e inhibe la diferenciación de las células germinales a través de la vía de señalización Notch / LIN-12 (Lints, R, 2009).

Durante la cuarta etapa larvaria, las primeras 40 células germinales que se alejan de la DTC se diferencian en aproximadamente 160 espermátides en cada brazo de la gónada. Cuando estas espermátides entran a la espermateca se activan y se convierten en espermatozoides maduros. En la etapa de adulto, las células germinales que entran en diferenciación se vuelven ovocitos, los cuales detienen su meiosis en la etapa de diacinesis de la profase I hasta ser fecundados (Lints, R, 2009). Durante la etapa tardía de la ovogénesis, el ovocito adyacente a la espermateca madura y es empujado a la espermateca donde es fertilizado. La última etapa de la meiosis ocurre después de la fertilización, antes de que los pronúcleos paterno y materno se junten, para dar paso a la la embriogénesis. Las primeras etapas de embriogénesis ocurren dentro del útero hasta que el embrión es expulsado al medio a través de la vulva (Lints, R, 2009).

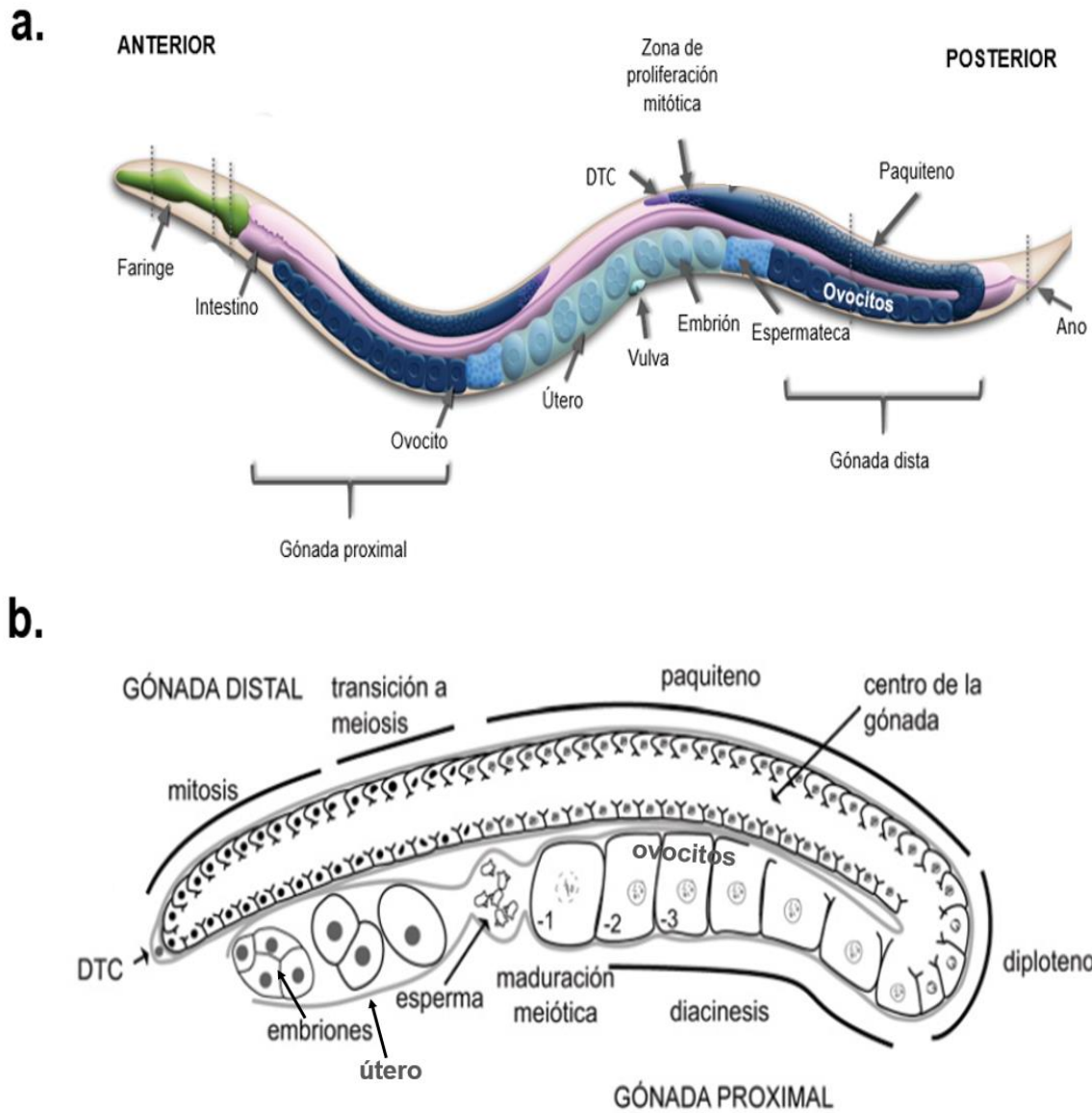


Figura 2. Anatomía del *C. elegans* hermafrodita. a) Cuerpo completo del nematodo donde se pueden apreciar la localización de algunos de sus órganos internos, como la faringe, el intestino, los brazos de la gónada, la espermateca, el útero y la vulva. **b)** Dibujo de uno de los brazos de la gónada de *C. elegans*. La gónada es un sincicio con forma de U y con ayuda de la célula de la punta distal (DTC) presenta polaridad distal-proximal, conteniendo a las células germinales troncales en el extremo más distal, seguidas de células en las diferentes etapas de la meiosis (las cuales se indican en la figura) y que llenan el resto de la gónada hasta formar ovocitos en la parte proximal. Figura modificada de Altun, 2009 y de Huelgas-Morales G. 2016.

1.2. Los gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs)

En las células hay gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs), es decir, compuestos de RNAs y proteínas. Los granulos de RNPs carecen de membrana y a causa de su notable plasticidad molecular son ampliamente utilizados por las células para regular una variedad de funciones. Estos complejos de ribonucleoproteínas, más recientemente denominados “condensados biomoleculares” pueden servir como sensores, y son importantes para una variedad de procesos intracelulares como la plasticidad neuronal, la fertilidad y el metabolismo de RNA (procesos post-transcripciones, la estabilización, represión y transporte del RNA) (Sidibé, 2019).

Los RNPs pueden estar en el núcleo o en el citoplasma. Los gránulos de RNPs nucleares incluyen: al nucléolo, los puntos de *splicing*, los cuerpos de Cajal y “paraspeckles”, que en general juegan un papel importante en la regulación de la expresión génica. Mientras que los gránulos de RNPs citoplasmáticos incluyen los gránulos de estrés (SG), cuerpos de procesamiento o cuerpos P (PB), gránulos germinales y gránulos de transporte neuronal en los axones y las dendritas de las neuronas. Cada uno de estos gránulos tiene funciones específicas ligadas a las características de su composición (figura 3) (Sidibé, 2019).

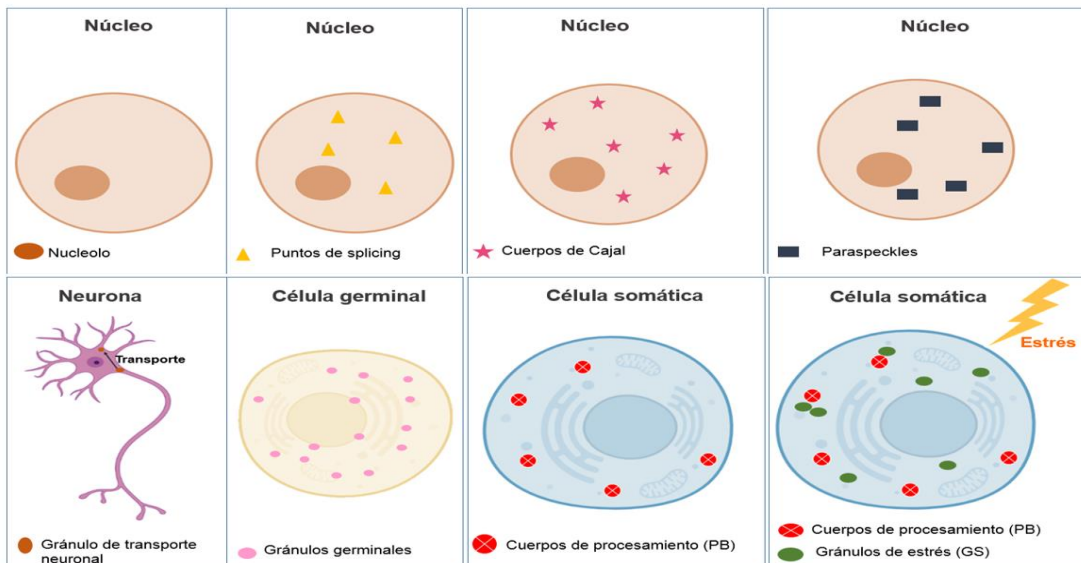


Figura 3. Tipos de gránulos de ribonucleoproteínas (RNPs). En los recuadros superiores se señalan los gránulos de RNPs que se encuentran en el núcleo de las células y en los recuadros inferiores los gránulos de RNPs que se pueden observar en el citoplasma de diferentes linajes celulares.

1.3. Características de los gránulos de RNPs y de las proteínas que los componen que contribuyen a la separación de fases líquida-líquida.

Hace una década se encontró que los gránulos de RNPs son compartimentos dinámicos que comparten propiedades físicas con los líquidos, tales como: la fusión, la forma esférica y la reorganización de su contenido en segundos (Kroschwald, 2015). Debido a que los gránulos de RNPs se encuentran en un estado líquido que coexiste con el citoplasma que también se encuentra en un estado líquido se ha propuesto que su formación ocurre por una separación de fase líquida-líquida o LLPS por sus siglas en inglés (liquid-liquid phase separation) (Kroschwald, 2015).

Una fase líquida-líquida permite una dinámica rápida en el reordenamiento molecular, hecho que implica que todos los componentes se difundan y están bien mezclados. La difusión y la mezcla son importantes para las reacciones químicas que requieren que los reactivos sean transportados hacia y desde los sitios de reacción (Hyman, 2014), por otro lado, la entrada de proteínas u otros reguladores puedan dirigir un rápido desmontaje o que las reacciones comiencen sin ningún otro evento regulatorio (Hyman, 2014).

Los gránulos de RNPs están enriquecidos con moléculas multivalentes, es decir, moléculas que albergan múltiples elementos que les permiten tener interacciones intra o intermoleculares. Estas interacciones se dan a través de una intrincada red de interacciones no covalentes proteína-proteína, proteína-RNA y RNA-RNA (Banani, 2017; An, 2019). Las proteínas que promueven la separación de fases tienden a mantener interacciones multivalentes mediante sus regiones intrínsecamente desordenadas (IDR por sus siglas en inglés) (Mittag, 2018). Las IDR son regiones de las cadenas de polipéptidos que no adoptan una estructura plegada única sino que se interconvierten entre muchas conformaciones no globulares (Mittag, 2018). Las IDRs pueden conformar diferentes dominios y motivos que contribuyen a la separación de fase líquido-líquido y a la formación del gránulo (Mittag, 2018).

Otro dominio de las proteínas que promueven la separación de fases líquida-líquida es el de baja complejidad (LCD por sus siglas en inglés; low complexity domain), el

cual se caracteriza por un fuerte sesgo en la composición de aminoácidos principalmente por una reducción de residuos hidrofóbicos (Cao, 2020). Asimismo, las proteínas que componen los gránulos de RNPs también pueden llegar a contener dominios parecidos a priones (PrLD) (Cao, 2020).

Varias proteínas que constituyen los gránulos también contienen motivos RGG / RG, que son segmentos que se observan en regiones desordenadas de baja complejidad y tienen una alta afinidad por el RNA que le permiten su interacción. La interacción RNA-RNA en los gránulos se da mediante interacciones Watson-Crick entre bases o por apilamiento de bases (Cao, 2020).

1.4. La composición de aminoácidos de las proteínas que promueven la separación de fases.

Wang y colaboradores (2018) realizaron una predicción de los PrLDs de las proteínas FUS (familia de proteínas de estudio para la separación de fases por excelencia) con PLAAC y confirmaron experimentalmente que estas regiones son fundamentales para la separación de fases. Además notaron que un sello distintivo de los PrLDs de las FUS, es que son regiones ricas en arginina (R) y tirosina (Y). Por lo que realizaron análisis de todo el proteoma para evaluar las frecuencias de proteínas con IDRs que también tienen un alto contenido de tirosina y arginina, y en su mayoría destacaron por su alto contenido de dichos aminoácidos. Además, encontraron que las interacciones entre los residuos de tirosina y arginina podrían funcionar como “stickers” ya que impulsan la autoasociación y que las interacciones electrostáticas desempeñan un papel modulador. Por otro lado, intentaron encontrar los “spacers” de las proteínas FUS (regiones que determinan la dinámica de las proteínas). Para ello analizaron los sesgos de composición dentro los PrLDs y encontraron que la glicina (G), la glutamina (Q) y la serina (S) son los aminoácidos con una gran frecuencia. Al sustituir las G de la PrLD por alaninas (A) en una proteína tipo FUS, se observó que la fusión de las gotas fue más lenta que el control. Al contrario, al sustituir los residuos de S o de Q por A la fusión de la gota fue más rápida. Por lo tanto, los “spacers” ricos en glicina producen gotas altamente dinámicas al ofrecer flexibilidad a la proteína, mientras que la presencia de residuos

de serina y glutamina en los “spacers” parece reducir los arreglos internos y la relajación, lo que lleva a la reducción de la fluidez de las gotas (figura 4b) (Wang, 2018).

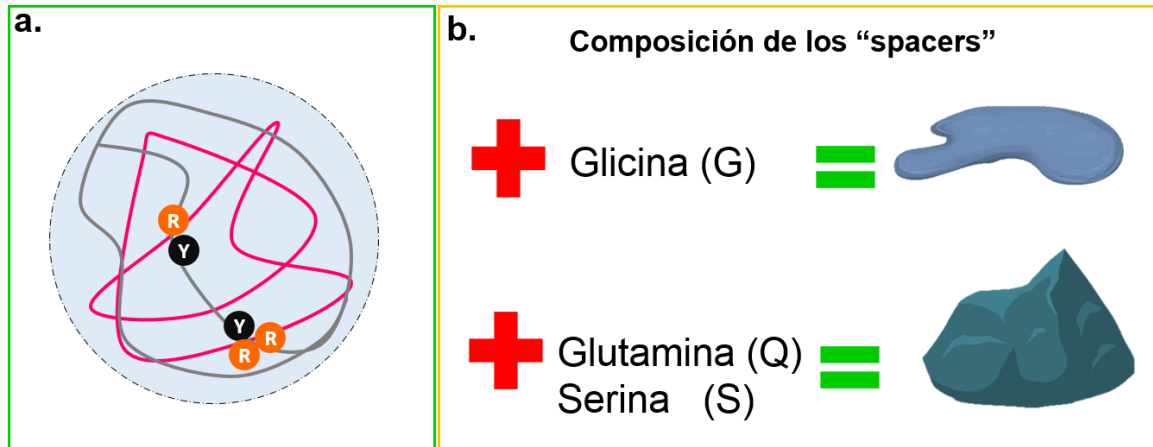


Figura 4. Interacciones entre aminoácidos que impulsan la separación de fases. a) La asociación de las proteínas que darán paso a la formación de los gránulos está regida por la autoasociación de los residuos R e Y. **b.** Si los “spacers” de las proteínas que se están asociando para formar los gránulos contienen una mayor proporción de glicina (G) entonces el gránulo será más fluido, en contraste, si los “spacers” contienen una mayor proporción de glutamina (Q) o serina (S) entonces el gránulo será más rígidos.

1.5. Tipos de gránulos de ribonucleoproteínas citoplasmáticos

1.5.1. Los gránulos de transporte neuronal

Los gránulos de transporte neuronal facilitan la traducción local de proteínas, que es fundamental para la actividad neuronal, lo que permite a las neuronas responder rápidamente a su entorno en constante cambio. Los gránulos de transporte neuronal contienen mRNAs detenidos traduccionalmente, asociados con proteínas reguladoras implicadas en la protección del mRNA, y actúan como intermediarios entre los mRNAs y el citoesqueleto para facilitar su transporte activo. La composición exacta de estos gránulos es desconocida, sin embargo, la evidencia sugiere que su composición depende del contexto. Muchas de las proteínas que se han identificado en estos gránulos son relacionadas con el transporte, la regulación del RNA o la síntesis de proteínas (Sidibé, 2019).

1.5.2. Lo cuerpos de procesamiento o cuerpos P (PB)

Los cuerpos P son sitios de almacenamiento de mRNAs que no se están traduciendo y enzimas que llevan al decaimiento del mRNA, (Sidibé, 2019). Entre los componentes de los cuerpos de procesamiento se encuentra el complejo de desadenilación Ccr4-Not, Lsm1-7, el coactivador de desencadenamiento y la enzima Dcp1 / Dcp2, varios activadores de desencadenamiento tales como Edc3, Pat1, DDX6, así como proteínas de unión a RNA que facilitan la represión de la traducción como 4E-T y CPEB1 (Luo Y, 2018). Los cuerpos P se detectan en condiciones normales en las células, pero aumentan de tamaño y en número en condiciones de estrés (Sidibé, 2019).

1.5.3. Los gránulos de estrés (GS)

Como su nombre lo indica, los GS se forman en respuesta al estrés ambiental. Durante condiciones adversas, las células priorizan la síntesis de proteínas protectoras contra el estrés, como las proteínas de choque térmico y las chaperonas, por lo que la traducción global de la célula se detiene (Cao, 2020). Es importante mencionar que la manera en que se apaga la traducción es mediante la fosforilación del factor de iniciación eIF2 alfa (Buchan, 2009). Los mRNAs que no pueden iniciar la traducción son almacenados en los gránulos de estrés. Después los GS clasifican los mRNAs de modo que pueden ser liberados para su traducción o ser enviados a degradación a los PB. Los gránulos de estrés típicamente contienen: mRNAs, subunidades ribosómicas 40S, eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF4B, proteína de unión a Poli (A) eIF3 y eIF2 (Buchan, 2009).

Las proteínas que forman los gránulos de estrés son conocidas como nucleadoras, algunas de éstas son represores de la traducción, como la caprina-1 y TIA-1; proteínas de unión al RNA, como G3BP y enzimas con actividad de ATPasa (Cao, 2020). Todas estas proteínas tienen dominios de baja complejidad o intrínsecamente desordenados. Estas proteínas pueden interactuar con los RNAs y reclutar otras proteínas para formar una red de interacción promiscua (Cao, 2020). Una vez que el estado de estrés termina, los gránulos pueden disociarse y los RNA mensajeros son liberados para su traducción (Buchan, 2009).

1.5.4. Gránulos germinales

Los gránulos germinales se encuentran en el citoplasma de las células que van a dar origen a los gametos, es decir la línea germinal (Seydoux, 2018). Los gránulos germinales comparten componentes con los gránulos de estrés y los cuerpos de procesamiento, pero también contienen proteínas y RNA únicos requeridos para el desarrollo de las células germinales. Los gránulos germinales pueden llevar a cabo una regulación postranscripcional y protección de transposones específica de las células germinales por medio del RNA de interferencia (Voronina, 2011). Entre las funciones de los gránulos germinales se encuentran el mantenimiento de la línea germinal, la fertilidad, la proliferación y la protección de la línea germinal (Voronina, 2013; Updike y Strome 2010).

Dependiendo del organismo en donde se observen, los gránulos germinales han sido nombrados de diversas formas (Voronina, 2011). En *C. elegans* reciben el nombre de gránulos P mientras que en *Drosophila* y *Xenopus* se llaman gránulos polares o gránulos germinales, respectivamente (Schisa, 2014). Los gránulos germinales están presentes continuamente durante todo el desarrollo con la excepción de algunos espermatozoides (ver ejemplo de *C. elegans* en figura 5). Los gránulos germinales de *Xenopus*, *Drosophila* y *C. elegans* se transmiten de ovocitos a embriones como parte del plasma germinal, que es un citoplasma especializado que se segrega con el linaje germinal y es suficiente para especificar el destino de las células germinales (figura 5). En el caso de los mamíferos, los gránulos germinales no se detectan en los ovocitos o embriones tempranos, sino que se forman de novo en las células germinales (Voronina, 2011).

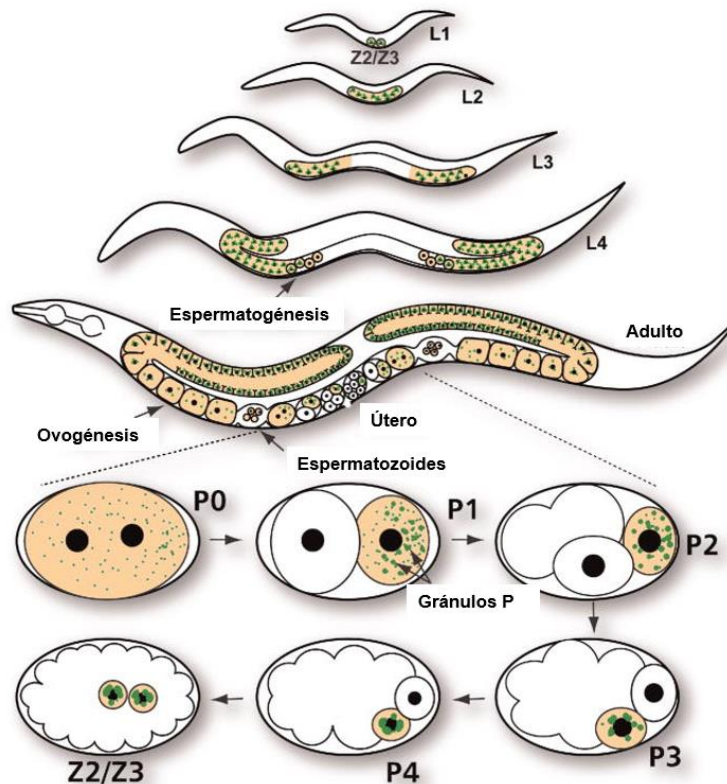


Figura 5. Distribución de los gránulos germinales o gránulos P a lo largo del desarrollo de *C. elegans*. Se observan diferentes etapas del ciclo de vida del animal. Los gránulos P se segregan asimétricamente con el linaje P que da lugar a las células germinales primordiales Z2 y Z3. Las células germinales primordiales proliferan durante las etapas larvarias (L1-L4). En la etapa L4 se generan los espermatozoides, y en el organismo adulto los ovocitos. La distribución de los gránulos P en *C. elegans* durante la mayor parte del desarrollo de la línea germinal es perinuclear, sin embargo, en los ovocitos antes de la fertilización la distribución se vuelve citoplasmática mediante un mecanismo poco conocido que implica la remodelación de la membrana nuclear y el retículo endoplásmico, pero después de la fertilización en los embriones de 100 células la distribución vuelve a ser perinuclear. Figura modificada de Updike y Strome 2010.

1.6. Los gránulos RNPs en la línea germinal de *C. elegans*

En *C. elegans* los gránulos germinales o gránulos P tienen diferente localización a lo largo del desarrollo (figura 5.a). En estos gránulos se almacena mRNA materno con proteínas de unión a RNA específicas, las cuales usualmente participan en la represión traduccional y degradación del mRNA. Las proteínas que se encuentran

en estos gránulos son PGL-1, GLH-1, GLH-3, GLH-4, MEX-3, DEPS-1, IFE-1, CGH-1, VBH-1, GLD-1, CAR-1, entre otras (Rajyaguru, 2008; Seydoux, 2018) (figura 6a). Además, se ha descrito que en los gránulos germinales se encuentran componentes de la vía endo-siRNA y exo-siRNA, como DRH-3, EGO-1 y los argonautas ALG-3, CSR-1 y WAGO-1 (Phillips, 2012).

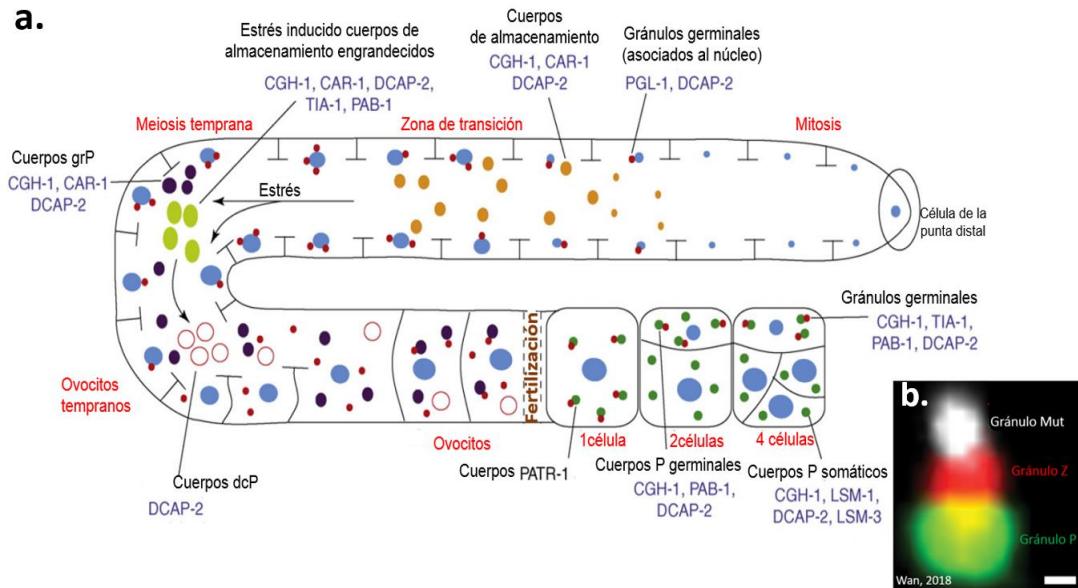


Figura 6. Tipos y localización de los gránulos de RNPs a lo largo de la línea germinal en *C. elegans*. a) Se observan la distribución y componentes de los gránulos de RNP durante la ovogénesis y la embriogénesis temprana de *C. elegans*. b) Micrografía fluorescente de los gránulos P, Z y *Mut* en la célula germinal en paquiteno. La proteína marcada del gránulo P es PGL-1::mcardinal, del granulo Z es ZNFX-1::TagRFP y del gránulo *Mut* es MUT-16::GFP. Figuras modificadas de Rajyaguru, 2018 y Wan, 2018.

En adultos se ha observado que algunos componentes de los gránulos germinales se separan para definir dos condensados independientes líquidos adyacentes a los gránulos germinales, estos son los gránulos Z y los gránulos mutantes (*Mut*) (figura 6.b). Los gránulos Z son el puente entre los gránulos germinales y los gránulos *Mut* y contienen proteínas como ZNFX-1 y WAGO-4, las cuales tienen la función de interactuar con RNAs silenciadores en la línea germinal de *C. elegans* para dirigir la herencia epigenética transgeneracional (Wan, 2018). Los gránulos *Mut* tienen

proteínas como Mut-16 y RRF-1, necesarias para la amplificación de ARNpi encargados de silenciar transposones (Phillips, 2012).

En la gónada de *C. elegans* también se encuentran los cuerpos de procesamiento (cuerpos P) que contienen proteínas como PATR-1, DCAP-1, DCAP-2, CGH-1, CAR-1 entre otras (Schisa, 2014), cabe señalar que CGH-1 y PATR-1 son componentes centrales de los cuerpos P ya que en su ausencia la entrada de ARNm en la vía de desencadenamiento es ineficaz y los cuerpos P son extremadamente pequeños (Boag, 2008; Gallo, 2008).

En el centro de la gónada se forman gránulos de RNA más pequeños, llamados gránulos de almacenamiento, que contienen a la helicasa de RNA CGH-1 y la proteína CAR-1, la función principal de estos cuerpos es la regulación de un conjunto de mRNAs maternos específicos para prevenir su degradación en la gónada (Boag, 2008)(Figura 6.a). Bajo condiciones estresantes algunos de estos gránulos acumulan enzimas de degradación y son llamados cuerpos Dcp mientras que otros acumulan mRNA reprimidos, CGH-1 y CAR-1 llamados cuerpos grP (Figura 6.a) (Rajyaguru, 2018).

1.7. La gónada de *C. elegans* bajo condiciones de estrés

En respuesta a tensiones ambientales, la detención de la ovulación, el ayuno o el envejecimiento, el RNAm y las proteínas de unión al RNA adoptan una distribución diferente localizándose fuertemente en los gránulos germinales perinucleares, en el citoplasma del raquis (en el centro del sincicio de la gónada) y en el citoplasma de los ovocitos (Schisa,2014).

Los componentes de los gránulos de estrés se comparten parcialmente con los cuerpos P, como las proteínas DCAP-2, CAR-1 y CGH-1, sin embargo, los gránulos de estrés se distinguen porque incluyen componentes de la maquinaria del inicio de la transcripción y proteínas como PAB-1 y TIAR-1 (un homólogo de la proteína TIA-1 en humanos, proteína fundamental para la formación estructural y funcional de los gránulos de estrés) (Schisa, 2014; Sun 2011). Por otro lado, el proceso de ensamblaje de los gránulos de estrés no utiliza los gránulos germinales como

cimiento para su construcción, ya que no se ha detectado en los gránulos de estrés a PGL-1 o GLH-1, dos de los componentes constitutivos centrales de los gránulos germinales (Schisa, 2014).

Una proteína que también parece ser fundamental para la formación de los gránulos de estrés en la gónada de *C. elegans* es GLA-3 (proteína ortóloga de la proteína TTP en mamíferos con dedos de zinc y que es una proteína de unión al RNA) debido a que en su ausencia no se logra inducir los gránulos de RNA en el centro de la gónada que generalmente se forman en condiciones de estrés (Dámazo-Hernandez, 2017).

Los gránulos de estrés parecen desempeñar un papel protector puesto que se observó que TIAR-1 puede proteger las células germinales y a los embriones en condiciones de estrés mediante diferentes mecanismos (Huelgas-Morales, 2016), asimismo, ante un estrés como el choque térmico, GLA-3 también tiene un papel protector de las células germinales femeninas (Dámazo-Hernandez, 2017) y en caso de faltar puede afectar, la apoptosis fisiológica, así como extender la meiosis (Kritikou, 2006; Morales-Oliva,2020).

Además de apreciar la formación de gránulos de estrés en la gónada, cuando los gusanos *C. elegans* son sometidos a un estrés como ayuno, choque térmico, estrés oxidativo u osmótico, se puede observar un incremento de apoptosis de las células germinales (Salinas, 2006).

Asimismo, la gónada del gusano sufre algunos cambios estructurales cuando es sometido a estrés (choque térmico, ayuno, daño de DNA y estrés oxidativo) como la formación de células binucleadas (figura7a y b). Cuando los gusanos son sometidos a choque térmico se observa que el raquis de la gónada se reduce en promedio un 50% (figura 7 c, d, e), al mismo tiempo se aprecia que el área de las células germinales se incrementa, este crecimiento se puede deber a que las células se expanden (figura 7 f), del mismo modo, otro de los efectos que se observan en la gónada de *C.elegans* es la desorganización de las células germinales, ya que se ven apiladas unas sobre otras (Morales-Oliva,2020).

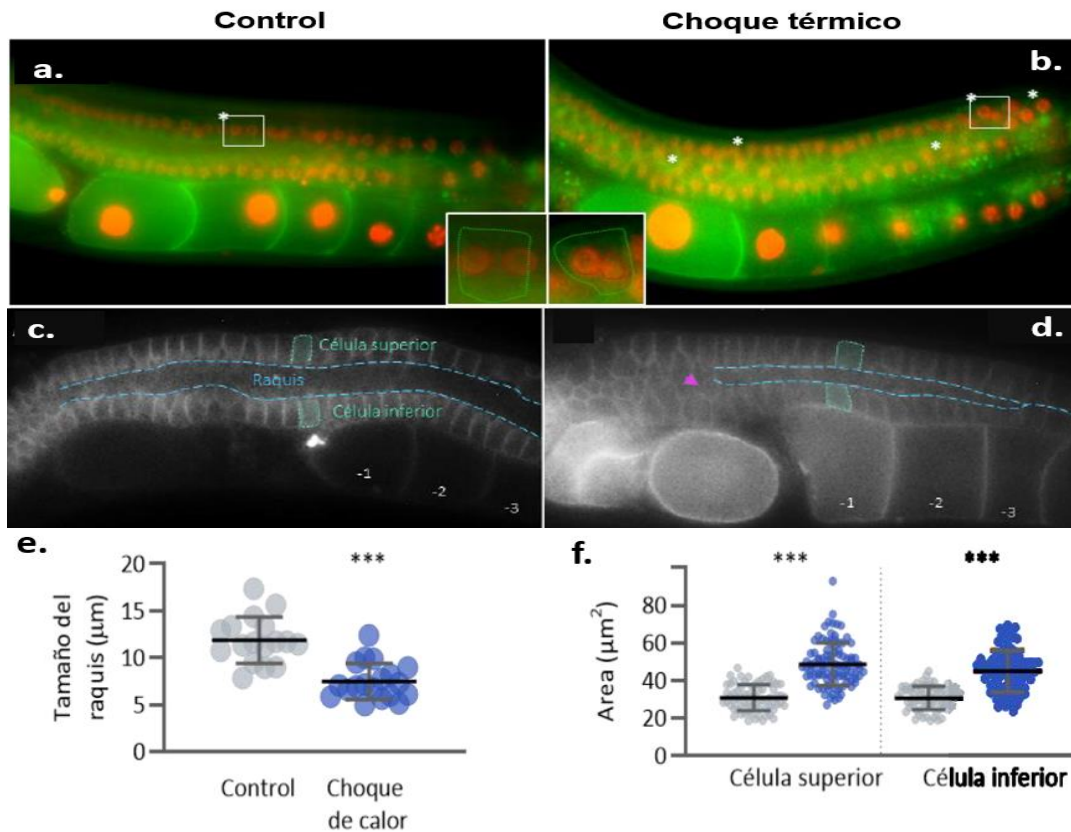


Figura 7. Cambios estructurales de la gónada de *C. elegans* durante el choque térmico a 31°C durante tres horas. **a)** Gónada de gusano OD95, con PLC::GFP (verde) como marcador de membrana y la histona-58::mCherry (rojo) como marcador nuclear, en condiciones control. **b)** Gónada de gusano OD95 con choque térmico en donde se pueden apreciar células binucleadas. **c)** Enfoque del raquis de la gónada de un gusano de la cepa OD70 (PLC::mCherry) bajo condiciones control. **d)** Enfoque del raquis de la gónada de un gusano OD70 con choque térmico donde se observa que el raquis de la gónada disminuye su superficie considerablemente comparado con el control. **e)** Comparación estadística del diámetro del raquis entre gusanos en condiciones control y aquellos sometidos a choque térmico en la cual se indica que hay una reducción significativa del diámetro del raquis cuando los ejemplares son sometidos a choque térmico. **f)** Comparación estadística del largo de las células superiores e inferiores entre gusanos control y con choque térmico donde se evidencia que ambas células aumentan su largo durante el choque térmico. Figuras modificadas de Morales-Oliva, 2020.

II. Antecedentes

2.1. El silenciamiento de los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5*, *car-1* y *cey-2* provoca la formación de gránulos de RNPs en la gónada del *C. elegans*

Previamente en el laboratorio se realizó un análisis de microarreglos en el cual se comparó la expresión de genes de animales silvestres hermafroditas adultos bien alimentados (control) contra animales sometidos a un ayuno de 6 horas (Silva-García, 2013). En este experimento se encontraron 321 genes cuya expresión se altera cuando los animales son sometidos al ayuno, de los cuales 154 aumentan su expresión y 167 la disminuyen. Los genes que se identificaron en ambos grupos en su mayoría participan en el metabolismo del DNA o del RNA, en la estructura y organización celular (Silva-García, 2013). En un trabajo posterior se seleccionaron genes que disminuyen sus niveles de expresión durante el ayuno y que además codifican para proteínas asociadas a gránulos de RNPs. Entre los genes seleccionados se encontraban *ife-1*, *pgl-1*, *car-1*, *cey-2* y *mex-5* (ver Tabla 1). Se evaluó el efecto del silenciamiento de estos genes en condiciones control y en ayuno de 6 horas, en la formación de gránulos la helicasa de RNA CGH-1 (ver Tabla 1) mediante inmunotinción (Láscarez-Lagunas, 2014).

De acuerdo con Láscarez-Lagunas, se observaron gránulos de RNPs en condiciones normales, principalmente en el centro de la gónada, en los animales tratados con RNA de doble cadena de *ife-1*, *pgl-1*, *car-1*, *cey-2* y *mex-5* (figura 8). Los gránulos aumentaron de tamaño cuando los animales fueron sometidos al ayuno (figura 8). Aunque no es claro el motivo por el cual con el silenciamiento de estos genes se observan gránulos RNPs en el centro de la gónada, Láscarez-Lagunas discute que esto se puede deber a que estos genes participan en la regulación directa de la expresión y/o localización de CGH-1, o que estos genes son indispensable para la formación o función de RNPs. Sin embargo, no descarta que el fenómeno observado se deba a procesos independientes para cada gen, debido a que la formación de gránulos varía de tamaño y localización de la gónada (centro y/o ovocitos) dependiendo del gen que este siendo silenciado.

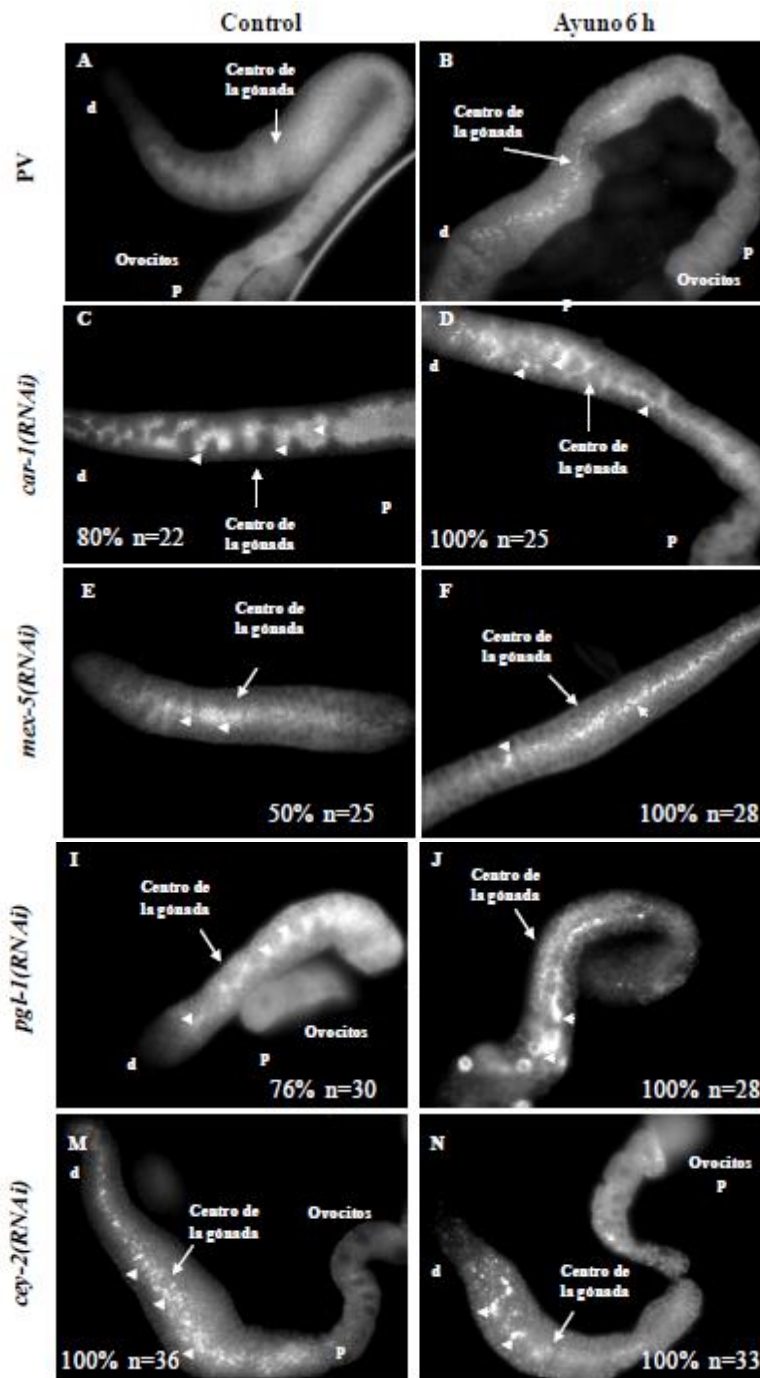


Figura 8. Al silenciar los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5*, *car-1* y *cey-2* en la gónada se observa la formación de gránulos de CGH-1. Fotos de gónadas teñidas con anticuerpo para detectar CGH-1 en animales N2 adultos control (PV) o con RNAi de los genes diana que fueron sometidos a condiciones control (A, C, E, I, K, M) o de ayuno por 6 horas (B, D, F, J, L). En cada gónada se indica la región dista (D) o proximal (P). El porcentaje de animales que presentan el fenotipo y el número de animales (n).

La formación de los gránulos CGH-1 en condiciones normales se observa principalmente en el centro de la gónada y tras el ayuno su formación se incrementa. Imagen de Lázcarez-Lagunas, 2014.

2.2. Características y funciones de las proteínas CGH-1, IFE-1, PGL-1, CAR-1, CEY-2 y MEX-5 en la gónada de *C.elegans*

Tabla 1. Resumen de las funciones de las proteínas CGH-1, IFE-1, PGL-1, CAR-1, CEY-2 y MEX-5 en la gónada de *C.elegans*

Proteína	Tipo de proteína	Papel en <i>C.elegans</i>	Bibliografía
CGH-1	Es una RNA helicasa DEAD-box que se asocia con reguladores de traducción y con un conjunto específico de mRNA maternos.	<ul style="list-style-type: none"> - En <i>C. elegans</i> es exclusiva de la línea germinal. - Previene la degradación de mRNAs maternos y tiene un rol clave en la represión traduccional de estos mRNAs. -Es necesaria para la función de los ovocitos y los espermatozoides. -Protege a la línea germinal de la apoptosis. - Está presente en gránulos germinales, gránulos de almacenamiento, cuerpos P y gránulos de estrés. 	Boag, 2008 Navarro,2001 Rajyaguru,2018
IFE-1	Es una isoforma de EIF4E y su función es reconocer y unirse al <i>cap</i> de los s en el inicio de la síntesis de proteínas y facilitar la unión del ribosoma al inducir el desenrollado de las estructuras secundarias de mRNA.	<ul style="list-style-type: none"> - En <i>C. elegans</i> IFE-1 se localiza parcialmente en el citoplasma y en gránulos P. -Es necesaria para la producción de esperma funcional, específicamente para la progresión eficiente a través de las divisiones meióticas en la espermatogénesis. 	Amiri, 2001 Henderson,2009
PGL-1	Es una proteína de unión a RNA que forma parte de un núcleo condensador que	-Es esencial para el desarrollo de la línea germinal postembrionaria masculina y femenina.	Kawasaki, 1998; Al-Amin 2016.

	recluta otros complejos de RNA-proteína en los gránulos germinales.	-Protege las células germinales de la apoptosis excesiva de la línea germinal durante la ovogénesis normal y el desarrollo de los brazos gonadales.	
CEY-2	Es una proteína de unión a DNA y RNA que está involucrada en varios procesos del metabolismo del RNA, como su estabilización, la regulación de la transcripción, el empalme entre otros.	En <i>C. elegans</i> CEY-2 se localiza en el citoplasma y en gránulos de RNPs de la línea germinal. -Protege a las células de la apoptosis y es necesaria para la sobrevivencia y proliferación de la línea germinal.	Suresh, 2018 Arnold, 2014
CAR-1	Es una proteína de unión a RNA	-En <i>C. elegans</i> CAR-1 se localiza en los gránulos germinales, los cuerpos P y en los gránulos de almacenamiento. -Junto a CGH-1 juega un papel en la apoptosis de la línea germinal. -Participa en el procesamiento del RNA. -Juega un papel crucial en la ejecución de la fase final de la citocinesis. -Participa en la organización del retículo endoplásmico en el embrión temprano de <i>C. elegans</i> .	Boag, 2005 Noble, 2008 Audhya, 2005 Squirrell, 2006
MEX-5	Es una proteína de unión al RNA con dedos de zinc que desestabiliza la transcripción de mRNA que contienen elementos ricos	En <i>C. elegans</i> se localiza en línea germinal (gránulos germinales) y establece la asimetría soma/línea germinal en embriones tempranos.	Schubert, 2000

	<p>en AU citoplasmáticos al promover su eliminación o desadenilación de la cola de poli (A) mediante asociación con CNOT1 y, por lo tanto, proporciona un mecanismo para atenuar la síntesis de proteínas.</p>		
--	--	--	--

III. Planteamiento del problema

El silenciamiento de la expresión de las proteínas de unión a RNA PGL-1, IFE-1, MEX-5, CAR-1 y CEY-2 provoca la formación de gránulos de RNPs en el centro de la gónada en condiciones control cuando se utiliza a CGH-1 como marcador. Estos datos nos sugieren que estas proteínas podrían tener un papel clave en la regulación de los gránulos de CGH-1 (proteína presente en la mayoría de los gránulos), sin embargo, aún no está claro a qué tipo de granulos afecta, si afectan directamente la formación de los gránulos, su función, su tamaño o localización, o si estas proteínas pueden contribuir a la estructura de la gónada de *C. elegans*. Por lo que nos interesa estudiar más a fondo qué papel juegan estas proteínas en la formación de gránulos.

IV. Hipótesis

TIAR-1 y GLA-3 son componentes de gránulos de de ribonucleoproteínas, sin embargo, su localización en estos condensados dependerá de la proteína que sea silenciada.

V. Objetivo general

Estudiar la participación de las proteínas PGL-1, IFE-1, MEX-5 y CAR-1 en la formación, tamaño, y/o localización de gránulos de RNPs, así como en la estructura de la gónada de *C.elegans*

VI. Objetivos particulares

- Mediante métodos bioinformáticos predecir los dominios las proteínas PGL-1, IFE-1, MEX-5, CAR-1, CEY-2, CGH-1, TIAR y GLA-3.
- Determinar el efecto del silenciamiento de los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5* y *car-1* en la formación de gránulos de RNPs definidos por las proteínas TIAR-1 y GLA-3.
- Estudiar si el silenciamiento de los genes *pgl-1* y *car-1* afecta la localización y el tamaño de gránulos de estrés inducidos por calor.
- Estudiar la estructura de la gónada cuando el gen *car-1* es silenciado.

VII. Materiales y métodos

7.1. Mantenimiento de las cepas de *C. elegans*

Para este trabajo se utilizaron organismos adultos jóvenes de un día de edad portadores de los transgenes GFP::GLA-3 *gla-3a(tn1734[gfp::3xflag::gla-3a])* de Tsukamoto, 2017, TIAR-1::GFP (*tn1545 [tiar-1 ::s:: tev :: GFP]*) de Huelgas-Morales G, 2016 y OD95 [*pie-1p::mCherry::his-58+unc-119(+)*]; [*pie-1p::GFP::PH(PLC1delta1) + unc-119(+)*] de McNally, 2006. Los animales se crecieron en cajas Petri medianas que contenían normal growth medium (NGM) (tabla 2) inoculado con *Escherichia coli* OP50-1 como alimento. Para el mantenimiento de las cepas se seleccionaron cinco gusanos que se encontraban en etapa adulta y dos veces a la semana se colocaron en cajas Petri medianas con medio y alimento fresco, las cajas en las que crecieron los gusanos fueron mantenidas a 20°C.

Tabla 2. Reactivos y cantidades necesarias para la elaboración de un litro de NGM, tanto para las cajas de mantenimiento como para las cajas que se utilizaron para los experimentos de RNAi.

Reactivo	NGM para mantenimiento	NGM para iRNA
Cloruro de sodio (NaCl)	2 g	2 g
Bactotripton	4 g	4 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	3 g	3 g
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄)	5 g	5 g
Colesterol (C ₂₇ H ₄₆ O)	0.0008 g	0.0008 g
Agar	20 g	30 g

Para el cultivo de *E. coli* OP50-1 se utilizó el medio líquido Luria Bertani (LB) (tabla 3) complementado con el antibiótico de selección estreptomycin (50µg/ ml). El medio fue inoculado con la cepa *E. coli* OP50-1 y se mantuvo en agitación a 37°C

durante 16 horas. Las cajas Petri con NGM fueron inoculadas con unas cuantas gotas del medio con el crecimiento bacteriano se dejaron secar y fueron almacenadas a 4°C.

Tabla 3. Reactivos y cantidades necesarias para la elaboración de un litro de medio Luria Bertani (LB).

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar (solo para medio sólido)	35 g

7.2. Silenciamiento de genes por RNA de interferencia (RNAi)

El RNA de interferencia es un mecanismo altamente específico para la inhibición de la expresión de un gen a nivel post-transcripcional, esto mediante la degradación del RNA transcrito (figura 9). Este mecanismo de silenciamiento génico fue descrito por primera vez en *C. elegans* (Vilgelm, 2006). La inducción de RNAi en *C. elegans* puede hacerse a través de la inyección de moléculas de dsRNA en la gónada o por alimentación. Para este trabajo se utilizó el método por alimentación para la inducción de RNAi (Fire, 1998).

Las bacterias con los plásmidos que contenían los dsRNA para los genes *pgl-1*, *mex-5*, *ife-1* y *car-1*, se obtuvieron de la biblioteca de dsRNA de *C. elegans* (open Biosystems). Mientras que el plásmido con el dsRNA para el gen *ife-1* fue clonado por Lázcarez-Lagunas, 2014. Estas bacterias fueron cultivadas en medio LB sólido (tabla 3) complementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (12.5 µg/mL) e incubadas a 37°C. Después se seleccionó una colonia aislada de cada crecimiento bacteriano y fueron sembradas en medio LB líquido complementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (12.5 µg/mL) e incubadas a 37°C en agitación. Cada uno de los crecimientos bacterianos fue concentrado y congelados para su posterior uso.

Las bacterias anteriormente cultivadas fueron inoculadas en cajas con medio NGM para RNAi (tabla 2) complementado con ampicilina (50µg/mL), tetraciclina (12.5 µg/ml) y con IPTG (1 mM). Las cajas se dejaron a temperatura ambiente por 18 horas, tiempo suficiente para la inducción de dsRNA en las bacterias; como control de RNAi se usó el plásmido vacío PD129.36 (PV). Después se colocaron los gusanos sincronizados para que consumieran las bacterias con los dsRNA de los genes diana.

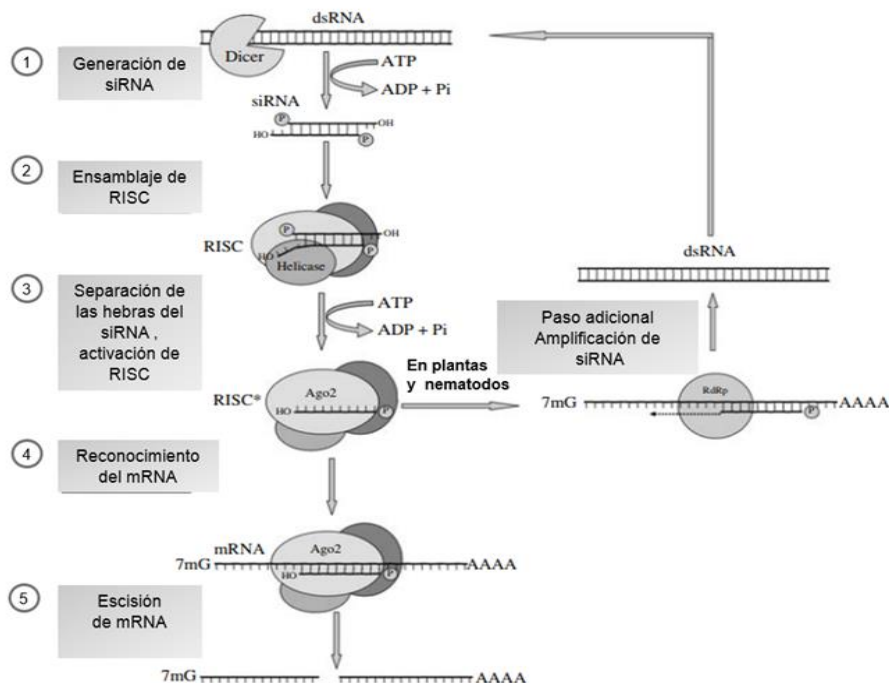


Figura 9. Mecanismo del RNA de interferencia. 1. El RNA de doble cadena, dsRNA, es escindido por la ribonucleasa III (Dicer) para producir RNA de interferencia (siRNA). 2. El siRNA se une al complejo de nucleoproteína RISC. 3. En RISC hay una hélice que desenrolla el dúplex de siRNA de modo que solo queda unido a la cadena antisentido de siRNA, en este momento el complejo RISC pasa a un estado activo. 4. El RISC activo reconoce y se une al mRNA objetivo mediante el emparejamiento complementario con la cadena de siRNA antisentido. 5. Otro componente de RISC son los argonautas (Ago2 por ejemplo) que escinden el mRNA. **Paso adicional** las plantas y los nematodos tienen un mecanismo que amplifica los siRNA. En este caso, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) sintetiza dsRNA en una plantilla de RNAm, utilizando la cadena antisentido de siRNA como cebador. El dsRNA recién sintetizado es escindido por Dicer para producir un nuevo conjunto de siRNA. Figura modificada de Vilgelm, 2006.

7.3. Sincronización de *C. elegans*

Para tener el control de la edad de los gusanos de *C. elegans*, se realizó el procedimiento de sincronización. Para la sincronización se utilizó una caja con una abundante cantidad de gusanos adultos de la cepa de interés, a la caja se le agregó 1 mL de M9 (tabla 4), después los gusanos en el M9 fueron recolectados en un tubo eppendorf de 1.5 mL, enseguida se le agregaron 200µL de cloro concentrado comercial y 300µL de sosa (5N), los gusanos fueron vortexeados durante 5 minutos con el fin de romperlos y liberar los embriones que había en su interior, después se retiró el sobrenadante y se lavó el botón con M9 para quitar los restos de cloro y sosa. Los huevecillos fueron resuspendidos en 10 mL de medio M9 y se mantuvieron a 20°C en movimiento toda la noche. Como se mencionó en la sección del ciclo de vida de *C. elegans*, cuando se someten al ayuno después de completar el desarrollo embrionario, las larvas arrestan su desarrollo en el estadio L1 hasta que encuentran una fuente de alimento, por lo que todos los organismo suspendidos en el M9 se encontrarán en la fase L1. Después, los gusanos en estadio L1 fueron sembrados en cajas Petri con NGM y con bacterias con los plásmidos que contenían los dsRNA de los genes de interés como alimento para continuar con su crecimiento.

Tabla 4. Reactivos y cantidades necesarias para la elaboración de un litro de medio M9.

Reactivo	Cantidad
Fosfato de sodio (NaHPO ₄)	6 g
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	3 g
Cloruro de sodio (NaCl ₉)	5 g
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.25 g

7.4. Choque térmico

Se observaron y compararon las gónadas de los gusanos que fueron alimentados con dsRNA para *pgl-1*, *car-1* o el plásmido vacío (PV) en condiciones control (mantenidos a 20°C) y sometidos a choque térmico.

Los adultos de un día de *C. elegans* que previamente fueron alimentados con dsRNA para *pgl-1*, *car-1* o plásmido vacío (PV), fueron sometidos a un choque térmico. Para ello, las cajas Petri en las que crecían fueron colocadas durante tres horas en baño María a una temperatura de 31°C.

7.5. Montaje para la observación de los gránulos de estrés

Para visualizar las gónadas de los gusanos *C. elegans*, se utilizó microscopia tipo Nomarski y/o de fluorescencia. Con un microscopio Nikon Eclipse E600. Las fotografías fueron tomadas con una cámara AxioCam MRc de ZEISS.

7.6. Análisis de las fotografías tomadas y estadística

Las fotografías fueron modificadas por igual en el contraste y el color en el programa ImageJ (U.S National Institute of Health Bethesda, Maryland, USA), también se utilizó ImageJ para determinar la longitud de las células superior e inferior de las gónadas y el diámetro del raquis de las gónadas. Los datos obtenidos de tres experimentos independientes de las mediciones fueron analizados por t-student no pareada con el programa GraphPad Prism.

7.7. Estudio de la arquitectura de la gónada

Para observar la estructura de las gónadas se utilizó la cepa OD95. Los animales adultos de 1 día de la cepa OD95 alimentados con PV o con dsRNA para *car-1* en condiciones control (mantenidos a 20°C), se colocaron en portaobjetos cubiertos con una capa de agarosa al 2%, se inmovilizaron con tetramizol 10mM y se observó en el microscopio la epifluorescencia.

Se capturó la imagen de un brazo de la gónada de cada nematodo en el plano medio y las fotografías fueron procesadas con el software Fiji, para la corrección de contraste, para realizar las mediciones del diámetro del raquis y la longitud de una célula posterior y una inferior.

7.8. Análisis bioinformáticos

7.8.1. Secuencias de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas de interés fueron obtenidas de la base de datos UniProt <https://www.uniprot.org/>: **CGH-1**

(CGH1_CAEEL), **TIAR-1** (Q95QV8_CAEEL), **GLA-3** (O02289_CAEEL), **PGL-1** (PGL1_CAEEL), **CAR-1** (CELE_Y18D10A.17), **MEX-5** (MEX5_CAEEL), **CEY-2** (P91306_CAEEL) e **IFE-1** (IF4E1_CAEEL).

7.8.2. Predicción de las regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) y carga de hidropatía

Para el cálculo de las posibles IDRs de las proteínas de interés se utilizó PONDR. PONDR es una red de retroalimentación que utiliza los atributos de las secuencias con una ventana de entre 9 a 21 aminoácidos dependiendo del algoritmo. Estos atributos (como la composición fraccionaria de aminoácidos particulares, la hidropatía o la complejidad de la secuencia) se promedian en estas ventanas y los valores se utilizan para entrenar la red durante la construcción del predictor. Para este trabajo se utilizó el logaritmo VLXT, asimismo, se determinó la carga de hidropatía (<http://www.pondr.com/>). Adicionalmente, se seleccionaron todas las IDRs de cada proteína de interés, para identificar, cuantificar y graficar su composición de aminoácidos.

7.8.3. Predicción de secuencias similares a priones.

Para determinar si la composición de aminoácidos de las proteínas es similar a priones se utilizó PLAAC, que mediante el algoritmo de modelo de Markov oculto (HMM) identifica subsecuencias priónicas candidatas (<http://plaac.wi.mit.edu/>).

7.8.4. Predicción de regiones de baja complejidad LCR

La predicción de las regiones de baja complejidad de las proteínas de estudio se realizó con dos diferentes algoritmos (SEG y CAST) con PLATOLOCO. La región designada como de baja complejidad en este trabajo fue aquella donde ambos algoritmos coincidieron (<http://platoloco.aei.polsl.pl/#!/query>).

7.8.5. Predicción de separación de fases

Se utilizó PSPredictor <http://www.pkumdl.cn:8000/PSPredictor/> para determinar si las proteínas son propensas a formar una separación de fases.

VIII. Resultados

8.1. Los análisis bioinformáticos de las proteínas PGL-1, TIAR-1, GLA-3, CAR-1, CEY-2 y MEX-5 predicen dominios que favorecen la formación de gránulos de RNPs.

Mediante herramientas bioinformáticas se buscaron dominios en las proteínas CAR-1, CEY-2, IFE-1, MEX-5 y PGL-1 que podrían estar involucrados en la formación de gránulos. Se incluyó en el estudio a las proteínas que utilizamos como marcadoras de gránulos: CGH-1, TIAR-1 y GLA-3. Los dominios que se buscaron fueron las regiones intrínsecamente desordenados (IDR) con el programa PONDR, dominios de baja complejidad (LCD) con el programa PLATOLOCO, y dominios tipo prion (PrLD) con el programa PLAAC. También se estudió la hidropatía de las proteínas, la cual nos sugiere si las proteínas podrían ser ordenadas o desordenadas, así como el índice de separación de fases, que nos predice qué tan propensas son las proteínas a formar una separación de fases (PSPredictor). En la figura 10 se resumen las regiones anteriormente mencionadas para cada una de las proteínas de estudio y adicionalmente en las secciones suplementarias A-E se muestra el detalle de los análisis para cada proteína.

Como se observa en la figura 10.a para CGH-1 no se predice la presencia regiones IDR, LCD o PrLD, además, el índice de hidropatía predice que es una proteína ordenada, por último en PSPredictor no se predice que pueda ser una proteína que se separe en fases.

La proteína IFE-1 no presenta regiones IDR, LCD o PrLD, además, el índice de hidropatía predice que es una proteína ordenada (figura 10.b). Acorde con lo encontrado en los programas anteriores, en PSPredictor no se predice que pueda ser una proteína que participe en la separación de fases.

La proteína PGL-1 tiene cuatro IDRs, una se encuentra cerca del dominio de dimerización, otra antes de la caja RGG y dos coinciden con la caja RGG, (figura 9.c). Además, la caja RGG está compuesta sólo por los aminoácidos R y G por lo cual es clasificada como una LCD, asimismo, esta región también se predice como

una PrLD. Y PSPredictor nos indica que es proteína que es propensa a formar separación de fases (10.c).

El análisis bioinformático predice que TIAR-1 cuenta con una región tipo prion cerca del N-terminal. Además, después de los dominios de RRM se encuentra una IDR y el C-terminal es clasificado como un dominio LCD y PrLD. La hidropatía indica que es una proteína desordenada y de acuerdo con el PSPredicto pueden separarse en fases (figura 10.d).

La proteína GLA-3 tiene dos IDRs casi en el centro de la proteína. Una IDR coincide con una PrLD mientras que la otra IDR coincide con una LCD. Inesperadamente, en medio de estas regiones hay una región que tiene una baja complejidad de aminoácidos y que además es tipo prion pero no es IDR (figura 10.e). De acuerdo al índice de hidropatía es clasificada como desordenadas y pueden formar separación de fases de acuerdo con PSPredictor.

La proteína CAR-1 es una proteína con un dominio similar a SM (LSM) de unión a RNA (Albrecht, 2004). De acuerdo con el análisis bioinformático el dominio LSM se encuentra delimitado por IDRs en ambos extremos. Los dos IDRs también son clasificados como PrLD y LCD. Esta proteína es catalogada como una proteína desordenada capaz de formar una separación de fases por el índice de hidropática y por PSPredicto respectivamente (figura 10.f).

Como se observa en la figura 10.g CEY-2 es una proteína con varias IDRs. Asimismo, buena parte del C-terminal se clasificada como LCD, en contraste, esta proteína no parece tener regiones tipo prion (PrLD). Finalmente, el índice de hidropatía nos predice que es una proteína desordenada. En PSPredictor se predice que puede ser una proteína que se separa en fases.

Para MEX-5 se predice que tiene un gran IDR cerca del N-terminal, que su vez es una PrLD y LCD. Por otro lado, cerca del C-terminal se encuentra otra IDR pequeña (Figura 10.h). Esta proteína es clasificada como desordenada según el índice de hidropatía y pueden formar separación de fases de acuerdo con PSPredictor.

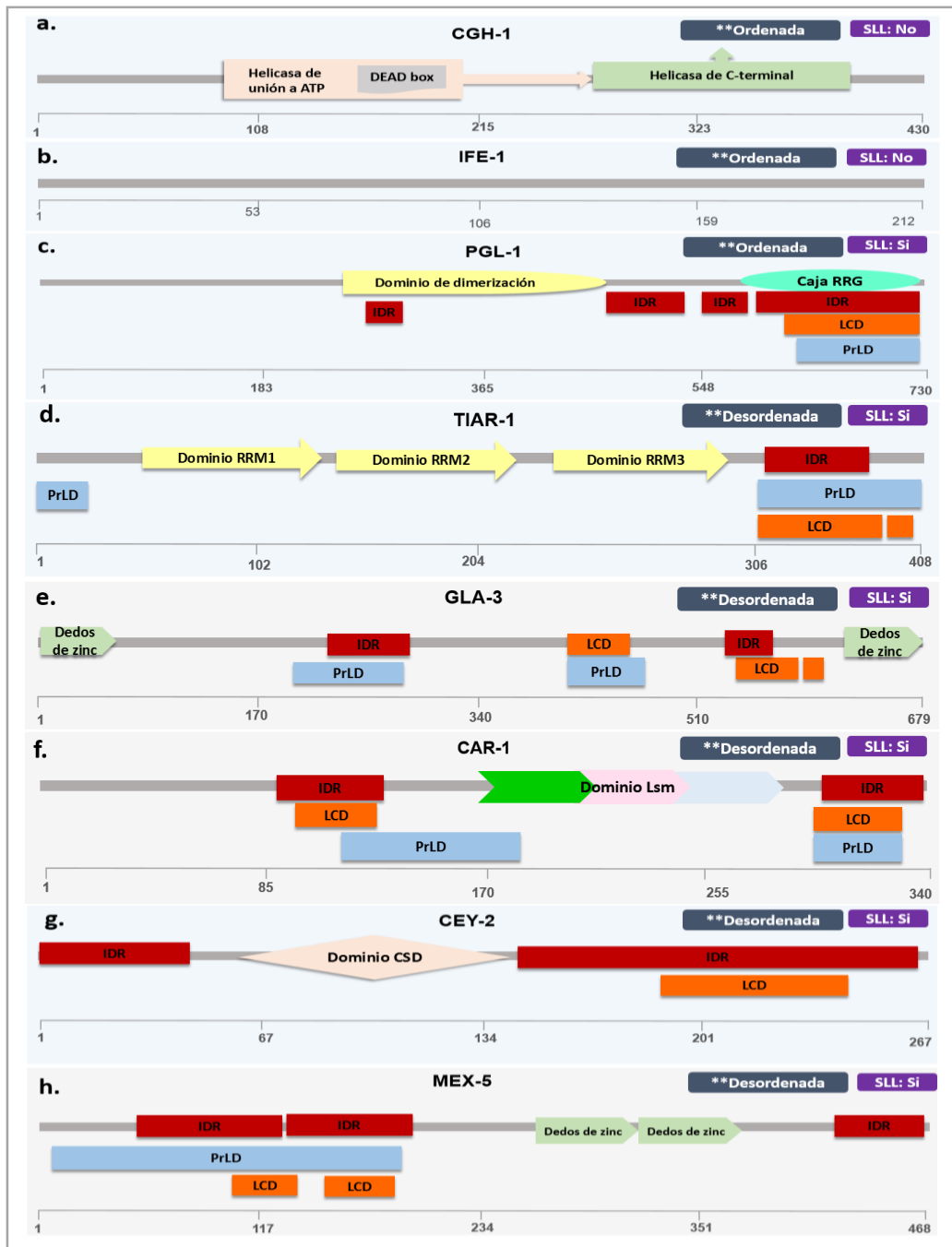


Figura 10. Esquemas de las probables regiones importantes para la separación de fases en las proteínas de estudio. Se muestran las regiones predichas como intrínsecamente desordenadas (IDR), dominios de baja complejidad (LCD) y dominios tipo prion (PrLD) de cada proteína y la predicción de si son proteínas potenciales para la separación de fases (SLL). ** hace referencia al tipo de proteína que se predijo en el índice de hidropatía. **a)** CGH-1 **b)** IFE-1 **c)** PGL-1-1 **d)** TIAR-1 **e)** GLA-3-1 **f)** CAR-1 **g)** CEY-2 y **h)** MEX-5.

8.2. De acuerdo a predicciones bioinformáticas las proteínas CAR-1 y PGL-1 podrían poseer una gran capacidad de autoasociación para formar gránulos

Se seleccionaron las regiones identificadas como IDR, LCD, PrLD de las proteínas TIAR-1, GLA-3, PGL-1, MEX-5, CEY-2 y CAR-1 para calcular la frecuencia de los aminoácidos que las componen. Se puso un interés especial en la proporción de arginina (R) y tirosina (Y), ya que las interacciones electrostáticas de ambos aminoácidos impulsan la autoasociación en las proteínas, característica importante para la formación de gránulos. También se prestó interés en la proporción de glicina (G), glutamina (Q) y serina (S) que componen estas regiones, ya que dependiendo de la proporción de estos aminoácidos se puede predecir la dinámica de las proteínas en los gránulos. Dado que, la presencia de residuos de S y Q en estas regiones parece reducir la fluidez de los gránulos, mientras que una gran proporción de G aumenta la fluidez de los mismos (Wang, 2018). Las proteínas GLA-3 y CEY-2 son proteínas que carecen de Y en sus IDRS, TIAR-1 no contiene R, mientras que PGL-1, CAR-1 y MEX-5 poseen ambos aminoácidos. Dada esta composición de aminoácidos se puede predecir que MEX-5, PGL-1 y CAR-1 son las proteínas que tienen una mayor capacidad de autoasociación de nuestras proteínas de estudio (Figura 11).

Como se observa en la figura 11, las regiones involucradas en la formación de los gránulos de las proteínas TIAR-1, PGL-1 y CAR-1 tiene una gran proporción de G, mientras que MEX-5 tienen una mayor frecuencia de Q, por otro lado, CEY-2 y GLA-3 tienen una mayor porción de S. Con estos datos se podría predecir que los gránulos de las proteínas TIAR-1, PGL-1 y CAR-1 serían más fluidos que los gránulos compuestos por MEX-5, GLA-3 y CEY-2.

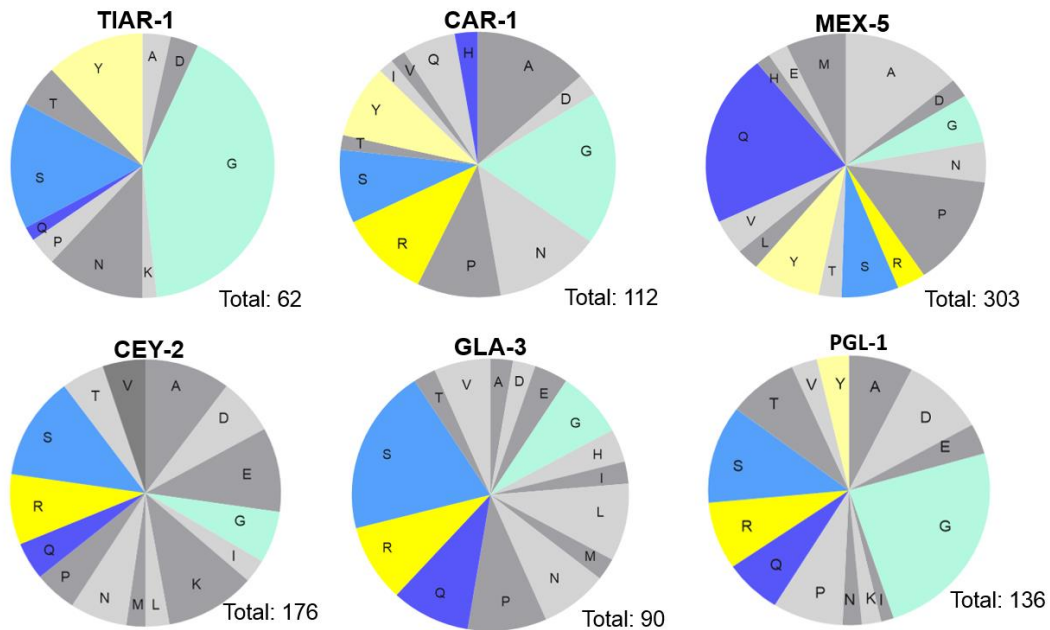


Figura 11. Predicción de la capacidad de autoasociación y fluidez de los gránulos formados por TIAR-1, CAR-1, MEX-5, CEY-2, GLA-3 o PGL-1. De las proteínas TIAR-1, CAR-1, MEX-5, CEY-2, GLA-3 y PGL-1 se seleccionaron las IDRs, LCDs, PrLDs regiones involucradas en la formación de los gránulos. Se cuantificó y graficó la frecuencia de cada aminoácido. Los aminoácidos tirosina (Y) y Arginina (R) le proporcionan una mayor capacidad de autoasociación a la proteína. Las proteínas que contengan una mayor proporción de glicina (G) serán más fluidez que aquellas que contengan una mayor proporción de glutamina (Q) y serina (S).

8.3. El silenciamiento de *car-1* y *pgl-1* promueve la formación de gránulos de GFP::GLA-3 en el centro de la gónada de *C.elegans*

Previamente observamos que el silenciamiento de los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5*, *car-1* y *cey-2* provoca la formación de gránulos en el centro de la gónada cuando se utilizó como marcador a la helicasa de RNA CGH-1 (Lázcarez-Lagunas, 2014). Con el propósito de estudiar con más detalle este fenómeno se silenciaron los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5*, *car-1* y *cey-2* utilizando dos marcadores de gránulos diferentes. El transgen TIAR-1::GFP (Huelgas-Morales, 2016) y el transgen GFP::GLA-3 (Tsukamoto et al. 2017).

Los genes utilizados para hacer RNA de interferencia fueron obtenidos de la biblioteca Open Biosystems (Hutsvillle, EU). Antes de iniciar nuestro trabajo estas clonas fueron enviadas a secuenciar para corroborar su identidad. Desafortunadamente, la clona del gen *cey-2* no correspondió a la secuencia de este gen, por lo que fue descartada de nuestro estudio (sección suplementaria F). Para verificar la eficiencia de los RNAi se observaron los fenotipos que se producen al silenciar los genes y se compararon con lo reportado en la literatura (Sección suplementaria G) y en el caso *pgl-1* se verificó el silenciamiento con la cepa PGL-1::GFP (Gallo, 2010) (Sección suplementaria G).

Los animales de las cepas TIAR-1::GFP y GFP::GLA-3 sincronizados en fase L1 se colocaron en cajas para que se alimentaran con bacterias que contenían dsRNA para *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5*, *car-1* o un plásmido vacío (*PV*) y se dejaron a 20°C hasta que fueron adultos de un día de edad para ser observados en el microscopio. En contraste con los datos obtenidos previamente por Láscarez-Lagunas, 2014, el silenciamiento de los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5* y *car-1* no indujo la formación de gránulos cuando se utilizó al marcador TIAR-1::GFP (figura 12 c, e, g, i).

Tampoco se observó la formación de gránulos cuando se silenciaron los genes *mex-5* e *ife-1* en el transgen GFP::GLA-3, (Figura 12 h, j). No obstante, tras el silenciamiento del gen *pgl-1*, el 40% de los gusanos observados si formaron gránulos de GFP::GLA-3. Estos gránulos se observaron principalmente en el centro de la gónada aunque difusos y de tamaño pequeño (Figura 12 d). Con el silenciamiento de *car-1* se observó que el 90% de los gusanos se formaron gránulos GFP::GLA-3 en el centro de la gónada (Figura 12 f). Finalmete, nos llamó la atención que la morfología de las gónadas de los animales del transgen GFP::GLA-3 se encontraba desordenadas ya que los núcleos laterales parecían formar “crestas” dentro de la gónada (Figura 12 f).

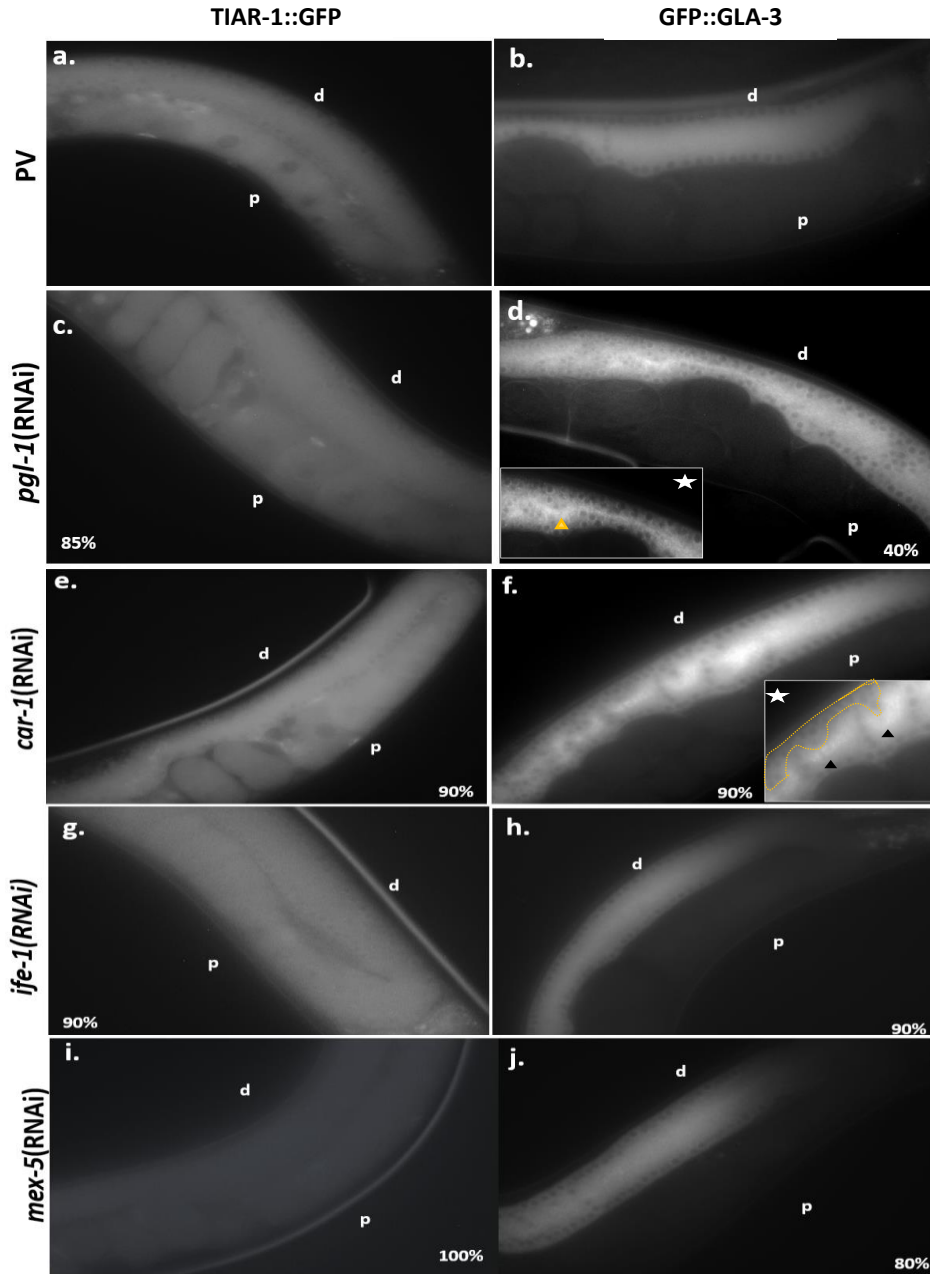


Figura 12. El silenciamiento de los genes *car-1* y *pgl-1* provoca la formación de gránulos compuestos por GFP::GLA-3 pero no por TIAR-1::GFP. Se observan las gónadas de animales adultos de un día del transgen TIAR-1::GFP alimentados con bacterias con dsRNA para el gen **a)** pv (control) **c)** *pgl-1* **e)** *car-1* **g)** *ife-1* **i)** *mex-5* y gónodas de animales del transgen GFP::GLA-3 alimentados con bacterias que expresaban dsRNA para los genes **b)** pv **d)** *pgl-1* **f)** *car-1* **h)** *ife-1* **j)** *mex-5*. En cada gónada se indica la región dista (**d**) o proximal (**p**). Para el caso de *car-1*(RNAi) y *pgl-1*(RNA-1) hay imágenes con estrellas que son acercamientos de las gónadas, en ellas se observan ▲ que señalan lo gránulos. Las líneas punteadas remarcam la formación de “crestas” de los núcleos laterales. Cada imagen muestra el porcentaje de animales que presentan el fenotipo. Este ensayo se realizó tres veces con al menos 20 individuos cada uno.

8.4. El silenciamiento de *pgl-1* y *car-1* afecta la distribución de los gránulos de GFP::GLA-3 en la gónada de *C. elegans* durante un choque térmico.

En el ensayo anterior se demostró que no hay formación de gránulos con el marcador canónico de gránulos de estrés TIAR-1 cuando se silencian a los genes *pgl-1*, *ife-1*, *mex-5* y *car-1*. En contraste, el silenciamiento de los genes *pgl-1* y *car-1* en el transgen que contiene a GFP::GLA-3 produjo la formación de gránulos en el centro de la gónada.

Con el fin de saber si el silenciamiento de los genes *car-1* y *pgl-1* afecta la formación de gránulos de estrés durante el choque de calor, se expusieron a los animales de las cepas TIAR-1::GFP y GFP::GLA-3 con *pgl-1*(RNAi), *car-1*(RNAi) o control (PV) a 31°C por 3 horas. En los gusanos control (PV) sometidos a choque de calor, se observó en ambas cepas la formación de gránulos en el centro de la gónada y en los ovocitos. Además se observó que los gránulos perinucleares aumentan de tamaño en estas condiciones (Figura 13.c y d).

Como se había mencionado anteriormente, en el silenciamiento de los genes *pgl-1* y *car-1* en la cepa TIAR-1::GFP no se observaron gránulos en condiciones control (Figura 13. e y i), sin embargo, cuando los animales fueron sometidos a choque de calor se observó la formación de gránulos en el centro de la gónada (Figura 13 g y k). En el caso TIAR-1::GFP con *pgl-1*(RNAi) una menor cantidad de animales formó gránulos (solo el 85%). Los gránulos formados en el centro de la gónada eran menos y más redondeados, asimismo, no se observó el aumento de tamaño de los gránulos perinucleares en contraste con el control (Figura 13.g).

Los animales TIAR-1::GFP con *car-1*(RNAi) expuestos a choque térmico formaron gránulos en el centro de la gónada más grandes que en el control, también formaron una línea discontinúa y no tan recta de gránulos en el centro de la gónada (Figura 13 k). Los gránulos en los ovocitos de estos animales mostraron un aumento muy notable de tamaño (Figura 13.k).

En la cepa de GFP::GLA-3 con *pgl-1*(RNAi) expuesta a choque térmico no se observó el aumento de tamaño de los gránulos perinucleares, sin embargo, los

gránulos en el centro de la gónada fueron extremadamente grandes (Fig 13 h). Finalmente, comparados con aquellos que crecieron en condiciones control, los gusanos GFP::*GLA-3* con *car-1*(RNAi) expuestos a choque térmico mostraron un mayor desorden de los núcleos y una reducción muy evidente del centro de la gónada, de modo que los gránulos parecieron formar un condensado continuo en el centro (Fig 13 i).

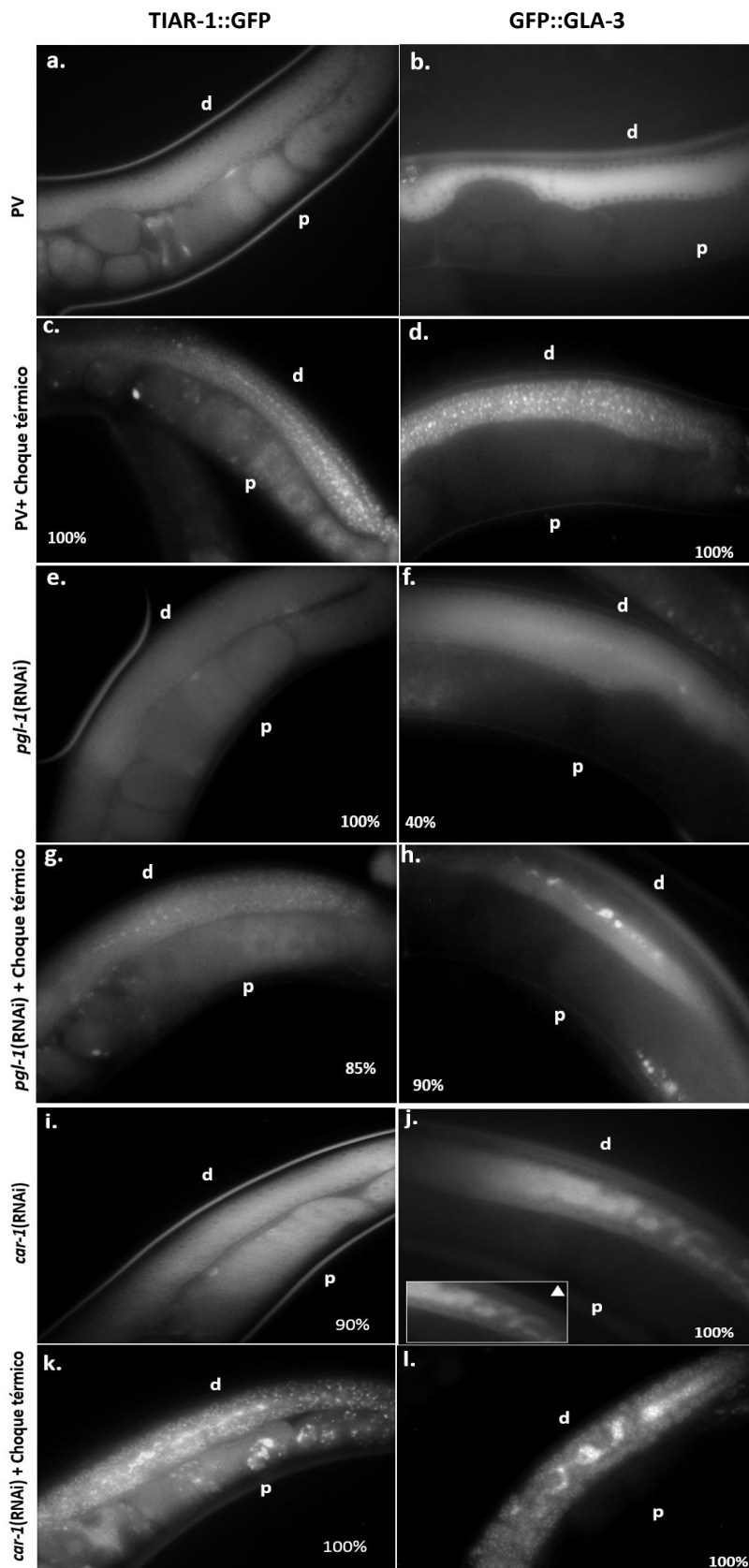


Figura 13. El silenciamiento de los genes *car-1* y *pgl-1* altera el aspecto de los gránulos de estrés por choque térmico. Se muestran animales adultos en condiciones control (crecidos a 20°C) de la cepa **TIAR-1::GFP** con el plásmido vacío (pv) (a); o con RNAi de los genes diana *pgl-1*(e) y *car-1*(i) y de la cepa **GFP::GLA-3** con el plásmido vacío (pv) (b) o con RNAi de los genes diana *pgl-1*(f) y *car-1*(j).

También se muestran animales con **choque térmico** (a 31°C por 3 horas) de la cepa **TIAR-1::GFP** control (pv) (c); o con RNAi de los genes diana *pgl-1*(g) y *car-1*(k) y de la cepa **GFP::GLA-3** control (pv) (d) o con RNAi de los genes diana *pgl-1*(h) y *car-1*(l).

En cada gónada se indica la región dista (d) o proximal (p). El porcentaje de animales que presentan el fenotipo se muestra en cada figura. Este ensayo se realizó tres veces con al menos 20 individuos cada uno.

8.5. El silenciamiento del gen *car-1* provoca cambios estructurales en la gónada de *C. elegans*

Para determinar si realmente existen cambios en la estructura de la gónada de *C. elegans* cuando se apaga *car-1*, se realizaron ensayos en animales de la cepa OD95, la cual tiene al marcador de membrana PLC::GFP. PLC es la fosfolipasa C (PLC) se encuentra en la membrana plasmática y participa en el metabolismo del fosfatidilinositol (Rusciano,2020), y un marcador de núcleo, His-58::mcherry.

En los gusanos que crecieron en condiciones control (a 20°C alimentados con bacterias con PV) se observó en la zona distal de la gónada células germinales muy bien delimitadas, organizadas y alineadas lateralmente de modo que permiten que el centro de la gónada o raquis esté bien definido. En contraste, en los animales alimentados con dsRNA para *car-1* se observaron irregularidades en la distribución de las células, ya que se veían como si estuvieran apiladas, incluso, en algunas ocasiones varias de ellas se veían multinucleadas. (Figura 14).

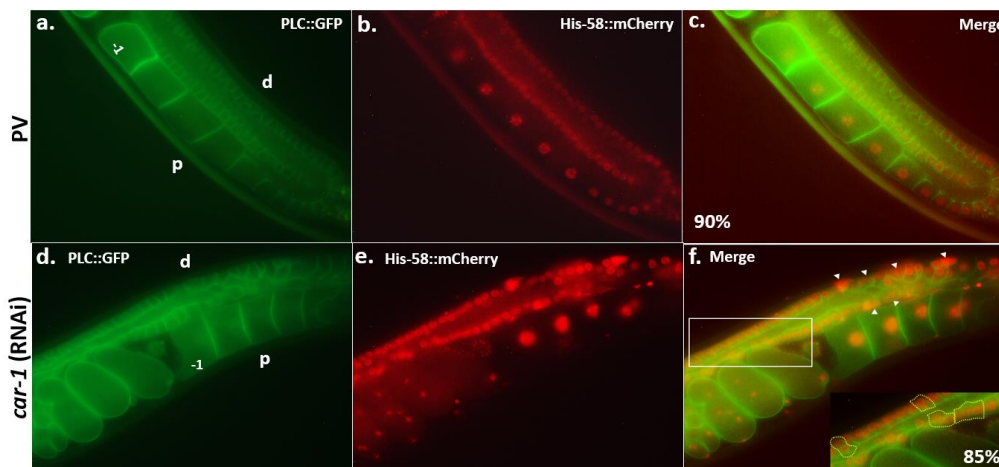


Figura 14. El silenciamiento de *car-1* altera la estructura de la gónada de *C.elegans*. Fotografías de la gónada de gusanos control de la cepa OD95 (a-c) y *car-1*(RNAi) (d-f). Se observa el arreglo de las membranas plasmáticas (a y d); la distribución de núcleos (b y e); así como el empalme de ambas imágenes (c y f). ▲ Células multiucleadas, asimismo del lado derecho se observa el acercamiento a estas células multinucleadas. Se indica la región dista (d), proximal (p) y se marca el ovocito próximo a la espermateca como -1. Este ensayo se realizó dos veces con al menos 20 individuos cada uno y se señala el promedio de animales que presentaron el fenotipo.

Cuando se comparó el tamaño del raquis de las gónadas de los gusanos control con *car-1(RNAi)*, se observó que el raquis de las gónadas con *car-1(RNAi)* se redujo considerablemente (figura 15 a y b). Se midió el tamaño del raquis para determinar cuál era la diferencia entre el tamaño. Al realizar la comparación estadística del diámetro del raquis (s), se observó que las gónadas de los animales *car-1(RNAi)* son significativamente más pequeñas (1.15 μm en promedio) que las del control (1.603 μm en promedio) (figura 15 c). También se realizó una comparación del tamaño de las células germinales superiores e inferiores del grupo control y *car-1(RNAi)* y como se observa en las figuras 15 d y f, ambas células mostraron un aumento significativo con respecto al control.

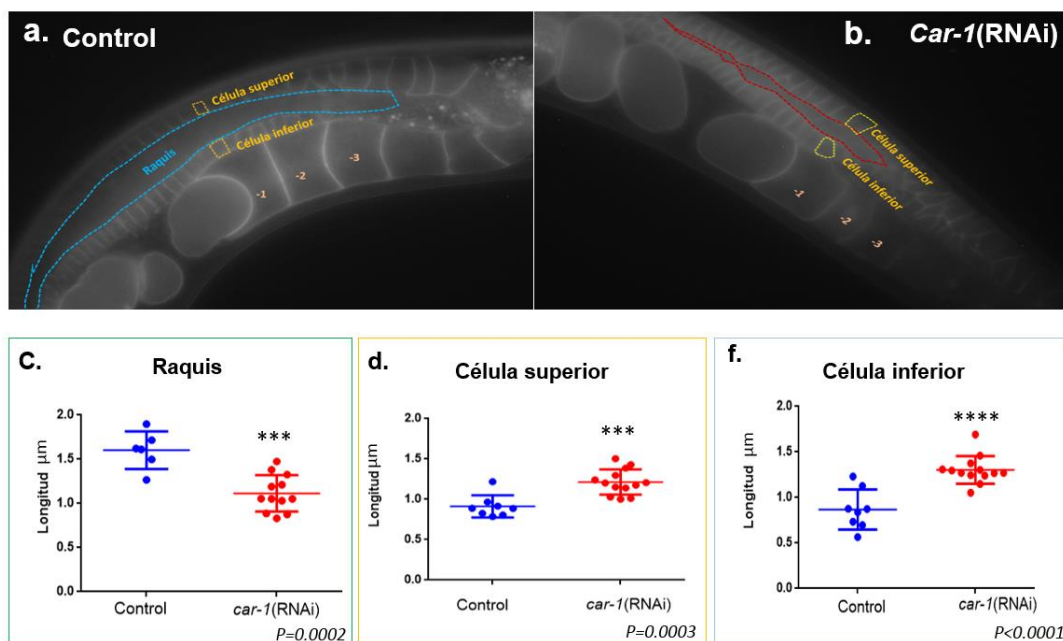


Figura 15. El silenciamiento del gen *car-1* provoca una reducción en el diámetro del raquis de la gónada y un aumento en el tamaño de las células germinales de *C.elegans*. a y b) Fotografías de las gónadas de gusanos de la cepa OD95 en condiciones control (PV) y cuando se silencia el gen *car-1* respectivamente. Se resaltan el raquis, y las célula superior e inferior con unas líneas punteadas. Diámetro de los raquis (c), células superiores (d) y células inferiores (f) de gusanos en condición control (PV) en azul y *car-1(RNAi)* en rojo. Para las tres pruebas estadísticas se utilizó una prueba t- Student. Se realizaron dos experimentos independientes para los cuales se fotografiaron 8 gónadas control y 13 de *car-1(RNAi)*.

IX. Discusión

Características y composición de las regiones importantes para la formación de gránulos de las proteínas CGH-1, GLA-3, CEY-2, CAR-1 PGL-1, TIAR-1, IFE-1 y MEX-5

En el presente trabajo se realizó un análisis bioinformático de las proteínas, GLA-3, CEY-2, CAR-1 PGL-1, TIAR-1, IFE-1 y MEX-5 con el fin de predecir si estas proteínas poseen regiones que les permiten participar en la separación de fases líquida-líquida. La predicción y el análisis de los dominios intrínsecamente desordenados (IDR); los dominios de baja complejidad (LCD); los dominios tipo prion (PrLD); la hidropatía y los potenciales para la separación de fases (SLL) de cada una de las proteínas nos permite clasificarlas en dos grupos; aquellas que tienen regiones que favorecen la separación de fases: TIAR-1, GLA-3, CEY-2, CAR-1, MEX-5 y aquellas que no, como IFE-1 y CGH-1.

Los componentes de los gránulos de RNPs se pueden dividir en dos clases, la primera es la de los *scaffolds* o andamios, que son moléculas esenciales para formación de la estructura y la segunda es la de los clientes, que son moléculas prescindibles para el ensamblaje de los gránulos, comprenden la mayoría de los componentes y frecuentemente se localizan en los gránulos de forma regulada mediante la unión directa a los andamios (Banani, 2017). El montaje, la función y la regulación de los gránulos de RNPs siguen sin ser comprendidos por completo. En el caso de que IFE-1 o CGH-1 participen en la formación de gránulos podría ser que lo hicieran como clientes de otras proteínas.

La RNA helicasa DEAD-box CGH-1 es una proteína que se encuentra en varios tipos de gránulos de RNPs en la gónada, se ha detectado en los gránulos germinales, los cuerpo P, los gránulos de estrés y los gránulos de almacenamiento (Boag, 2008; Schisa, 2014). Además, recientemente se ha demostrado que la familia de las RNA helicasas tipo DEAD-box son reguladoras de condensados en separación de fases que contienen RNA tanto en procariotas como en eucariotas (Hondele, 2019). En este estudio bioinformático no se predice que CGH-1 tenga regiones que le faciliten la separación de fases líquida-líquida, aunque se ha

observado que se asocia a otras proteínas, como CAR-1 y CEY-2 en gránulos de RNPs mediante RNA (Audhya, 2005; Arnorld, 2014). Pese a ello, los dominios específicos y el modo por el cual se dan estas interacciones aún no es claro. No obstante, estudios en otras RNA helicasas tipo DEAD-box como GLH-1 nos podrían dar indicios del modo en que las RNA helicasas pueden integrarse en los diferentes gránulos de RNPs. La RNA helicasa DEAD-box GLH-1 es una proteína que, a pesar de tener un dominio intrínsecamente desordenado en su región N-terminal rico en arginina y glicina, se asocia a los gránulos germinales mediante la actividad de la región de helicasa y no por la región intrínsecamente desordenada, sin embargo, aún no es claro si la localización en los gránulos P de GLH-1 está mediada por el desenrollamiento continuo de RNA o si es un ciclo continuo de otras interacciones con otras proteínas (Marnik, 2019).

La proteína IFE-1 es una isoforma de eIF4E que reconoce y se une al *cap* de los mRNA (Amiri, 2001). La IFE-1 es una proteína que está enriquecida en la línea germinal, se distribuye por el citoplasma y se ha observado que colocaliza con GLH-2 y PGL-1 en los gránulos germinales (Amiri, 2001; Huggins, 2020). A pesar de que aparentemente IFE-1 no tiene ninguna región que le permita participar en la separación de fases líquida-líquida, forma parte de los gránulos germinales mediante su interacción con PGL-1 (interacción no mediada por RNA); en ausencia de PGL-1 no se observa la asociación de IFE-1 en los gránulos germinales y se observa principalmente en el citoplasma (Amiri, 2001). Sin embargo, aún no se han reportado cuales son las regiones y el modo en que ambas proteínas podrían estar interactuando.

Aunque IFE-1 es una proteína que aparentemente no tiene las cualidades para separar fases, su asociación con los gránulos germinales es requerida para regular su función durante la espermatogénesis (Amiri, 2001). Los gránulos germinales están presentes tanto en las células germinales masculinas como femeninas durante la mayor parte del desarrollo. Sin embargo, todos los gránulos germinales desaparecen al final de la espermatogénesis. De modo que PGL-1 regula la

presencia y en cierta medida la función de IFE-1 para que participe en las etapas postpaquiteno para completar la espermatogénesis (Amiri, 2001).

En el análisis bioinformático, determinamos que TIAR-1 y GLA-3 podrían interactuar de manera multivalente con otras proteínas y/o RNAs para separarse en fases. Estas proteínas se han asociado a los gránulos de estrés y son claves para su formación (Huelgas-Morales, 2016; Dámazo-Hernandez, 2017). CAR-1 se asocia a los cuerpos de procesamiento o almacenamiento y gránulos germinales (Boag, 2005; Boag, 2008; Audhya 2005). CEY-2 es una proteína que se ha identificado en los gránulos de RNPs que contienen a CGH-1 y CAR-1 (Boag, 2005) mientras que MEX-5 se ha asociado a gránulos de estrés y cuerpos P (Noble, 2008).

Se ha demostrado que la proteína PGL-1 puede formar condensados de una manera dinámica y rápida similar a los líquidos (Putnam, 2019). La PGL-1 es indispensable para el ensamblaje de los gránulos germinales mediante la formación de un núcleo condensado que recluta otros complejos de proteínas-RNA en los gránulos germinales. Se piensa que PGL-1 forma los condensados mediante su caja RGG (dominio predicho como IDR) con que recluta RNA y proteínas unidas al RNA, luego, las proteínas PGL-1 se autoagregan mediante la interacción directa entre sus dominios de dimerización (Hanazawa, 2011; Aoki, 2016). Empero, como se describió anteriormente con IFE-1, puede que tenga un dominio que le permita interactuar directamente con otras proteínas, pero aún no ha sido estudiado.

Un tema intrigante y que hasta la fecha queda poco claro sobre la separación de fases, es el modo en que la composición de aminoácidos de las proteínas puede influir en la concentración umbral de la separación de fases, las propiedades de los gránulos formados o el tipo de proteínas que pueden ser reclutadas en cada tipo de gránulo. Recientemente, en el 2018, Wang y colaboradores propusieron que la composición de los dominios involucrados en la formación de gránulos en las proteínas como los PLDs podrían tener un papel importante. Por ejemplo, los residuos de tirosina (Y) y arginina (R) impulsan la autoasociación de las proteínas y los aminoácidos como la glicina (G), glutamina (Q) y serina (S) determinan la dinámica de las proteínas en los gránulos. Los dominios ricos en G producen gotas

altamente dinámicas al ofrecer flexibilidad a la proteína, mientras que la presencia de residuos de S y Q reducen la fluidez de las gotas.

Teniendo en cuenta lo anterior y dada la composición de sus aminoácidos, las proteínas CAR-1, PGL-1 y MEX-5 tienen una mayor capacidad de autoasociación que TIAR-1, GLA-3 y CEY-2 ya que estas últimas carecen de Y o R. Por el lado de la dinámica las proteínas, TIAR-1, PGL-1 y CAR-1 en sus IDRS son ricas en G, por lo que los gránulos constituidos por estas proteínas tendrían una dinámica más fluida que aquellos formados por las proteínas CEY-2, GLA-3 y MEX-5, las cuales son ricas en Q o S en sus dominios involucrados en la formación de gránulos. A pesar de estas predicciones, para determinar si estas proteínas realmente cuentan con estas características es necesario hacer ensayos experimentales, teniendo en cuenta que además de la composición de aminoácidos hay otros factores que pueden influir, como la temperatura, el pH o las interacciones con otras proteínas.

La ausencia de CAR-1 y PGL-1 altera la localización y tamaño de los gránulos de estrés por calor.

En el estudio de Lázarez-Lagunas, 2014 se demostró que cuando se silencian los genes *car-1*, *mex-5*, *ife-1* y *pgl-1* en la gónada de *C.elegans*, se observa la formación de gránulos de CGH-1 en el centro de la gónada. Si bien CGH-1 es una proteína que se asocia a gránulos de RNPs, es una proteína con una distribución muy amplia dentro de estos, por lo cual resulta difícil identificar a qué tipo de gránulos podría estar afectando el silenciamiento de estos genes. En este trabajo se pretendió determinar si mediante el silenciamiento de *car-1*, *mex-5*, *ife-1* y *pgl-1* se promueve el ensamblaje de los gránulos utilizando otros marcadores. Para ello se realizaron ensayos de RNAi para *car-1*, *mex-5*, *ife-1* y *pgl-1* en los transgenes de dos proteínas de gránulos TIAR-1 y GLA-3.

Los resultados indican que cuando se silencia a *car-1*, *mex-5*, *ife-1* y *pgl-1* no se observa la formación de gránulos de TIAR-1. Esto resulta interesante porque TIAR-1 es una proteína que es utilizada principalmente como marcador de gránulos de estrés. Por lo que podemos decir que los gránulos que se forman al silenciar a *car-1*, *mex-5*, *ife-1* y *pgl-1* (usando como marcador a CGH-1) no son gránulos de estrés.

Cuando se usó el marcador GFP::GLA-3, se observó la formación de gránulos al silenciar a *car-1* y en menor medida a *pgl-1*. El homólogo de GLA-3 en mamíferos, TTP, puede asociarse a cuerpos de procesamiento y de estrés (Kritikou, 2006). Esto sugiere que los gránulos que se forman en las góndas de animales RNAi en *car-1* y *pgl-1* pueden ser similares a los de procesamiento.

Anteriormente se ha estudiado el efecto del silenciamiento de CGH-1 en la localización de algunas de las proteínas del presente trabajo, por ejemplo, se ha observado que CAR-1 se acumula en grandes estructuras en forma de láminas en el centro de la gónada (Audhya, 2005; Boag, 2005). Por otro lado, la localización de PGL-1 se altera después del silenciamiento de CGH-1 (Audhya, 2005). Con estas observaciones los autores proponen que CGH-1 está asociada funcionalmente a estas proteínas. Siguiendo esta idea los resultados de Lázcarez-Lagunas, 2014 y de este trabajo nos podrían indicar que la asociación funcional entre CGH-1/CAR-1, CGH-1/PGL-1 es bidireccional.

Teniendo en cuenta esta propuesta se podría sugerir que CAR-1 es una proteína que está asociada funcionalmente con GLA-3, ya que en ausencia de CAR-1 la formación de gránulos de GLA-3, se observó en casi el 90% de los gusanos y dado que CAR-1 es uno de los principales componentes de los cuerpos P y los gránulos de almacenamiento, se podría sugerir que GLA-3 se localiza en alguno o en ambos gránulos de RNPs, aunque aún debe ser estudiado.

Un resultado interesante es que después de someter a choque térmico a los gusanos *pgl-1(RNAi)* o *car-1(RNAi)* en el fondo de los transgenes TIAR-1::GFP y GLA-3::GFP se observó un cambio en la forma y tamaño de los gránulos de estrés (figura 13). Uno de los motivos por los cuales podría estar sucediendo este fenómeno, es porque PGL-1 es una proteína de andamiaje de los gránulos germinales que se encarga de reclutar varios mRNAs y proteínas, pero al estar ausente PGL-1, estos mRNAs y proteínas quedan suspendidos en el citoplasma. Sin embargo, cuando hay una condición de estrés y se comienzan a formar los gránulos de estrés en el centro de la gónada gran parte de esos mRNAs y proteínas

“libres” son reclutados de manera transitoria en los gránulos de estrés, provocado un aumento en el tamaño de los gránulos de estrés del centro de la gónada.

Por otro lado, con el silenciamiento de *car-1*, los gránulos de GFP::GLA-3 en lugar de ser pequeños focos distribuidos en la gónada, aparecen semifusionados formando una línea semicontinua en el centro de la gónada. La proteína CAR-1 es un componente fundamental de los cuerpos de procesamiento y los gránulos de almacenamiento. Se ha demostrado que CAR-1 controla el tamaño de los cuerpos de procesamiento y posee una relación específica con represores específicos de mRNA (Noble, 2008), por lo que la ausencia de CAR-1 puede alterar la composición de dichos gránulos de RNPs. Dado que varios de los componentes de los gránulos de estrés también son componentes de los cuerpos P (como CGH-1 o DCAP-2), podría ser que la ausencia de CAR-1 altera la regulación de los gránulos de estrés. Otra hipótesis es que la fusión de los gránulos de estrés durante el silenciamiento de *car-1* se promueve por una reducción del espacio dentro de la gónada y esta reducción podrá forzar la fusión de los gránulos que se forman en el centro.

En resumen, los resultados de la distribución y el tamaño de los gránulos de estrés con el silenciamiento de *car-1* y *pgl-1* nos podrían indicar que la alteración de los componentes claves (como los cambios en la expresión) de los gránulos germinales y los cuerpos P influyen en la localización, volumen total y probablemente la composición de los gránulos de procesamiento, así como de manera indirecta a los granulos de estrés.

La ausencia de CAR-1 promueve cambios estructurales en la gónada parecidos a los que se observan durante un estrés

Cuando se realizaron los ensayos con *car-1*(RNAi) nos pareció relevante que había varios cambios significativos en la gónada con respecto al control: i) se observó la presencia de células multinucleadas, ii) las células de la periferia del centro de la gónada parecían estar apiladas formando lo que al principio describimos como “crestas” y iii) hubo una reducción significativa del diámetro del centro de la gónada, el cual podría ser consecuencia del aumento en las células circundantes, ya que se determinó que estas células también aumentan su largo. Sorprendentemente, estos

cambios observados en la gónada de *C. elegans* con *car-1*(RNAi) son muy parecidos a los observados en gusanos con estrés por choque térmico por Morales-Oliva 2020.

En reportes anteriores se ha observado que cuando hay un aumento de células multinucleadas también hay un aumento de la apoptosis (Kritikou, 2006), aunque aún no es claro el modo en que las células multinucleadas son reconocidas por la maquinaria de apoptosis (Morales-Oliva 2020). Con el silenciamiento de *car-1*, se ha observado la presencia de células multinucleadas y un aumento de dos a tres veces de las células en estado de apoptosis en línea germinal, en comparación con el control (Boag, 2005).

El motivo por el cual se presentan células multinucleadas en la gónada de *C. elegans* cuando hay una condición de estrés o apoptosis fisiológica aún no es claro. La presencia de las células multinucleadas con la falta *car-1* se puede deber a una falla en la etapa tardía de la citocinesis, ya que se ha descrito que provoca, un defecto en la estructura del huso acromático de la anafase durante la mitosis y la meiosis, de modo que los haces de microtúbulos interzonales están ausentes o reducidos significativamente y se observan cromosomas rezagados, así como puentes cromosómicos empobrecidos (Audhya, 2005).

No obstante, en animales con alta incidencia de células multinucleadas (que carecen de *ced-1* y que sirven de marcador de apoptosis) se determinó que las células multinucleadas observadas no surgen por una falla en la citocinesis sino más bien de la fusión de las células germinales posmitóticas (Raiders, 2018).

Aunque estas observaciones son interesantes, no es clara la relación entre la disminución de la expresión de *car-1* en animales en estrés, con el aumento de la apoptosis y el mecanismo por el cual aparecen las células multinucleadas, por lo cual es un tema que requiere de un estudio con mayor profundidad.

X. Conclusiones

- Las proteínas PGL-1, CEY-2, CAR-1, MEX-5 TIAR-1 y GLA-3 son proteínas con dominios desordenados (IDR), dominios de baja complejidad (LCD) y dominios tipo prion (PrLD). Estos dominios probablemente les permiten facilitar la separación de fases líquida-líquida.
- Las proteínas IFE-1 y CGH-1 no contiene regiones importantes para la separación de fases, a pesar de que se encuentran en una gran diversidad de gránulos, por lo que podrían ser proteínas que son acarreadas a los gránulos.
- Debido a la composición de aminoácidos, proponemos que las proteínas CAR-1, PGL-1 y MEX-5 tienen una mayor capacidad de autoasociación que TIAR-1, GLA-3, y CEY-2. Esto podría deberse a que TIAR-1, GLA-3 y CEY-2 carecen de residuos de Y o R. Las proteínas, TIAR-1, PGL-1 y CAR-1 son ricas en G mientras que CEY-2, GLA-3 y MEX-5 son ricas en S o G en los dominios de baja complejidad.
- Los resultados de la distribución y el tamaño de los gránulos de estrés con el silenciamiento de *car-1* y *pgl-1* nos dan indicios de que la alteración de los componentes de los cuerpos de procesamiento y/o los gránulos germinales influyen en la localización, volumen total y probablemente en la composición de los cuerpos de procesamiento y de estrés.
- El silenciamiento de *mex-5*, *ife-1*, *pgl-1* y *car-1* no promueven la formación de gránulos con el marcador TIAR-1::GFP.
- El silenciamiento de *pgl-1* y *car-1* promueve la formación de gránulos del marcador GFP::GLA-3.
- El silenciamiento de *car-1* promueve la presencia de células multinucleadas, células apiladas y una reducción significativa del diámetro del centro de la gónada, estos

datos nos indican que posiblemente este gen participe de alguna manera en la estructura de la gónada.

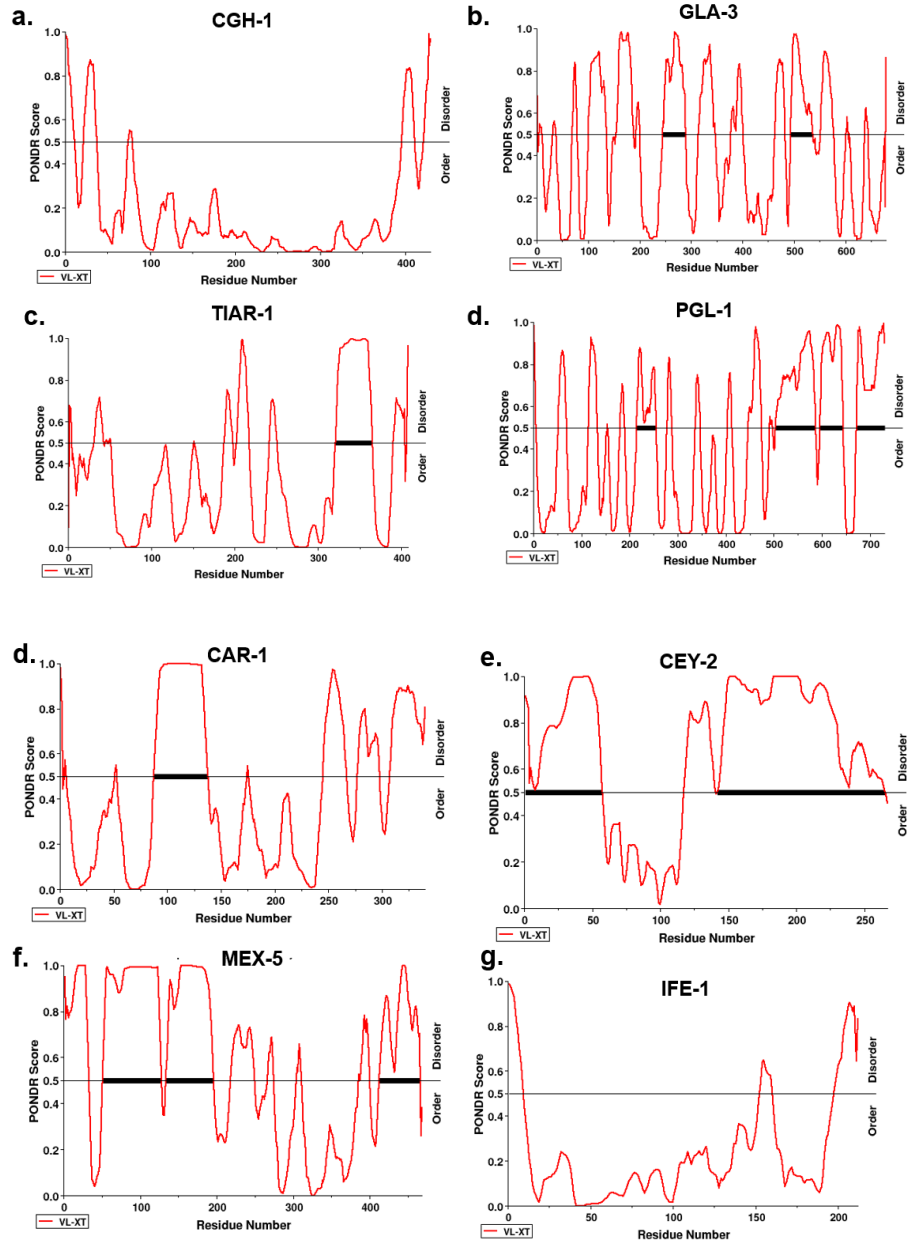
XI. Perspectivas

- Investigar si los dominios encontrados en cada una de las proteínas son funcionales y necesarios para la formación de gránulos.
- Estudiar la relación que existe entre las proteínas CGH-1, CAR-1, MEX-5, IFE-1 y PGL-1.
- Determinar si GLA-3 se asocia a los cuerpos P mediante su colocación con un marcador de cuerpos P y/o a gránulos de almacenamiento.
- Determinar de manera más clara cómo la alteración de los componentes claves de los gránulos germinales y los cuerpos P influyen en la localización, volumen total y probablemente en la composición de los gránulos de estrés.
- Determinar el papel de CAR-1 en la estructura de la gónada y en la apoptosis.

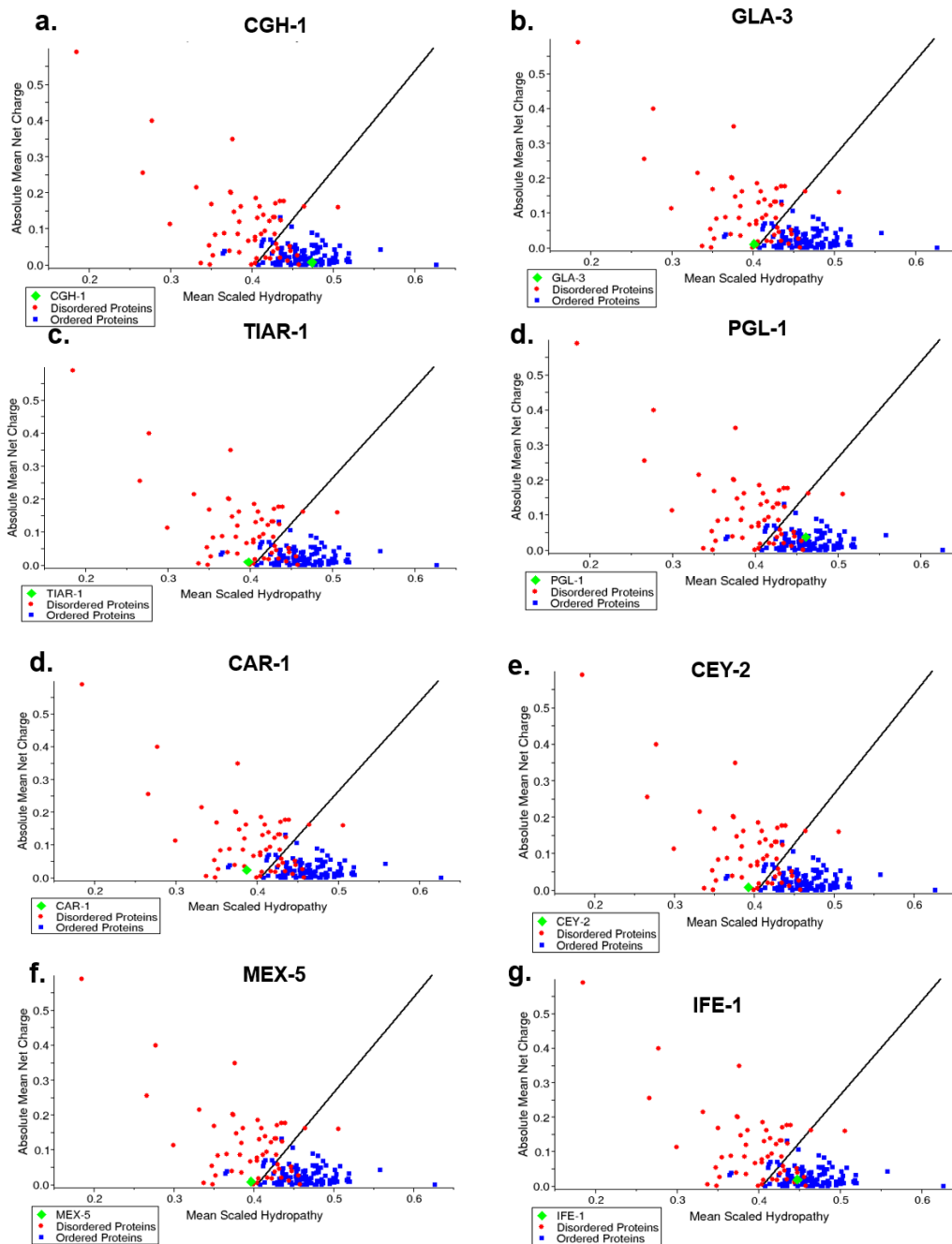
XII. Suplementarias

A. Regiones intrínsecamente desordenados (IDR)

Regiones intrínsecamente desordenadas de las proteínas de estudio. Las regiones remarcadas con la línea negra gruesa son aquellas con mayor probabilidad de ser desordenadas.

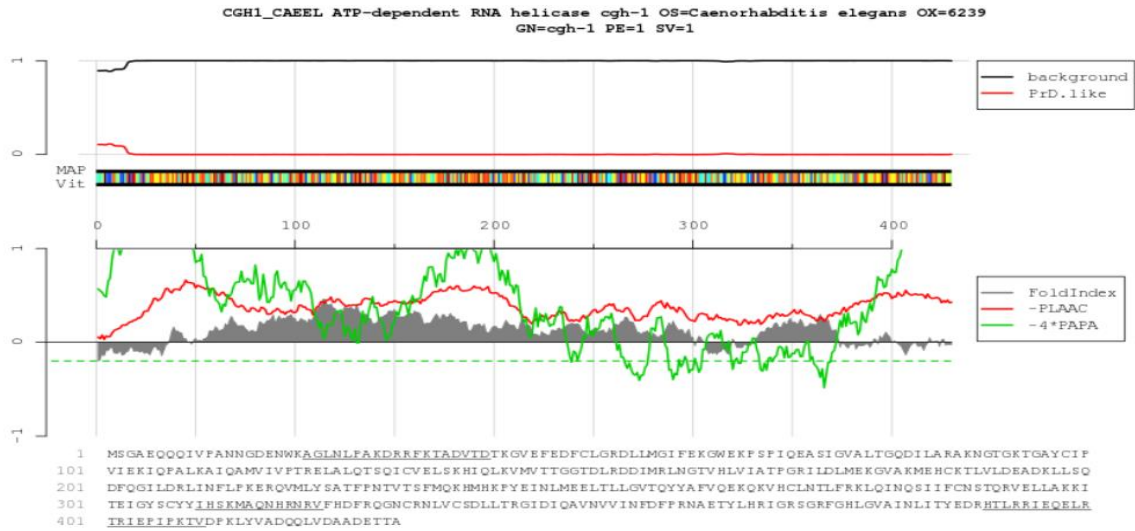


B. Relación de hidropatía de las proteínas de estudio.

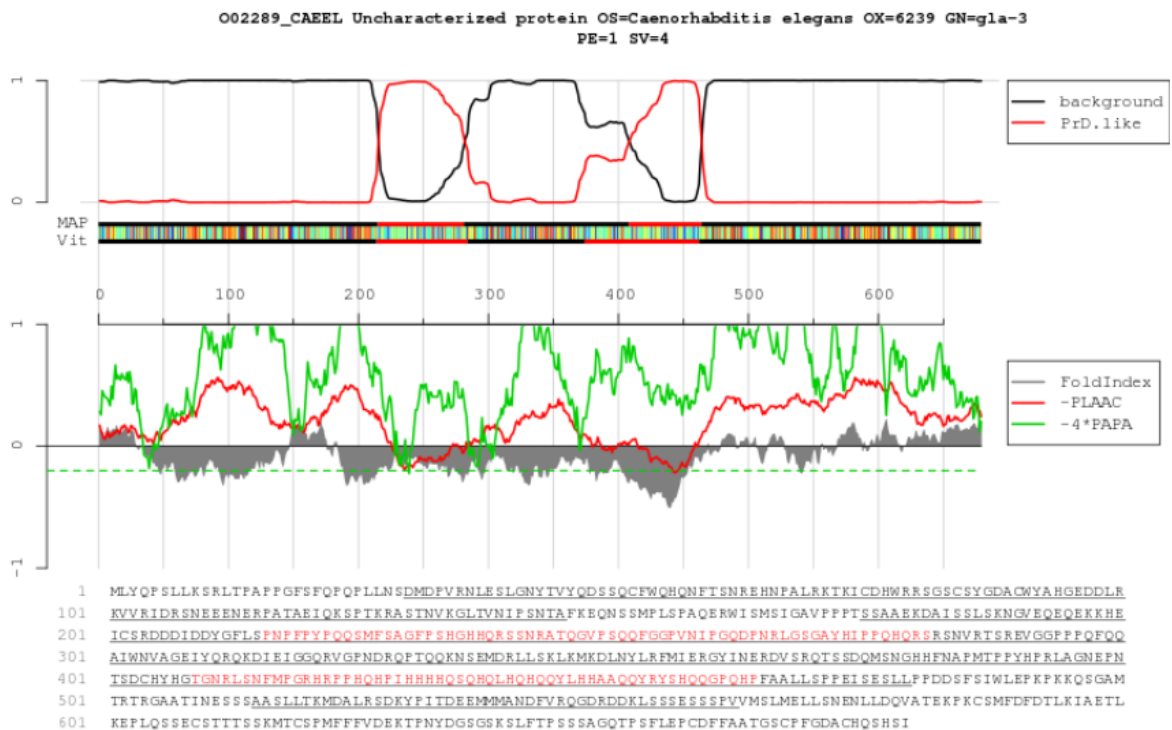


C. Regiones parecidas a priones de las proteínas de estudio. En la parte de abajo se detallan las secuencias de aminoácidos de las regiones parecidas a priones en rojo.

CGH-1

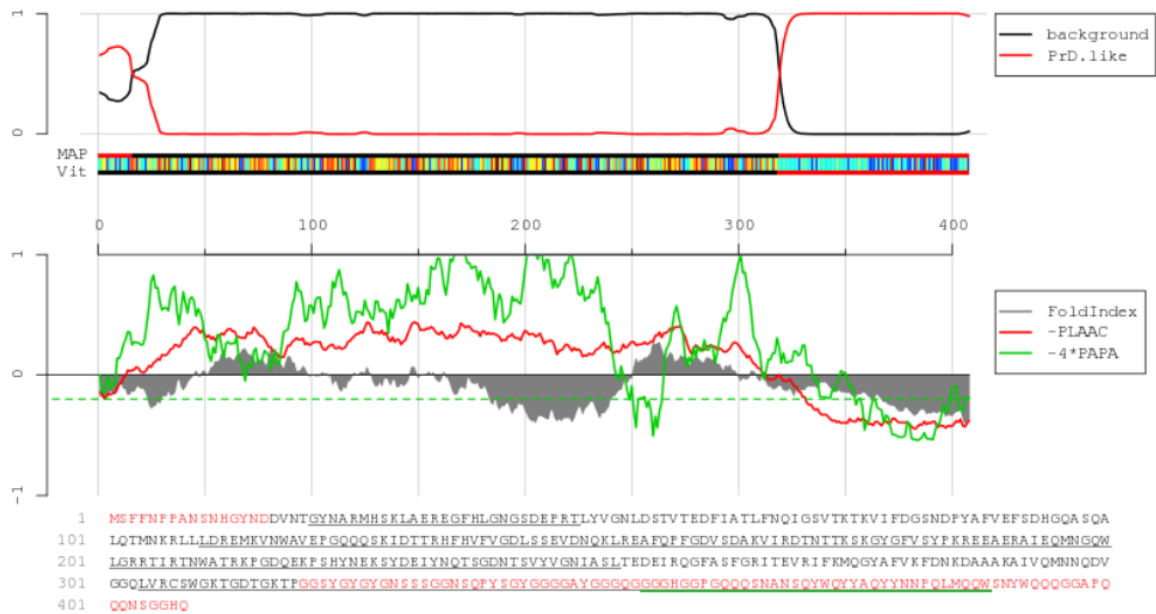


GLA-3



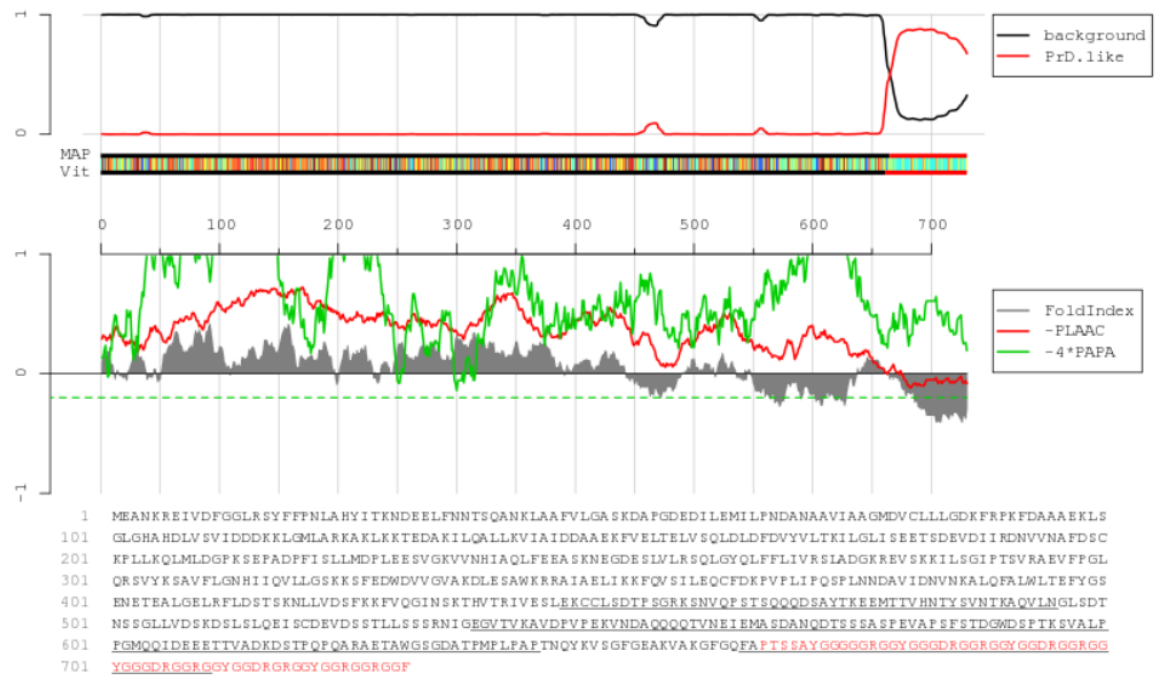
TIAR-1

Q95QV8_CAEEL RRM domain-containing protein OS=Caenorhabditis elegans OX=6239
GN=tiar-1 PE=1 SV=1



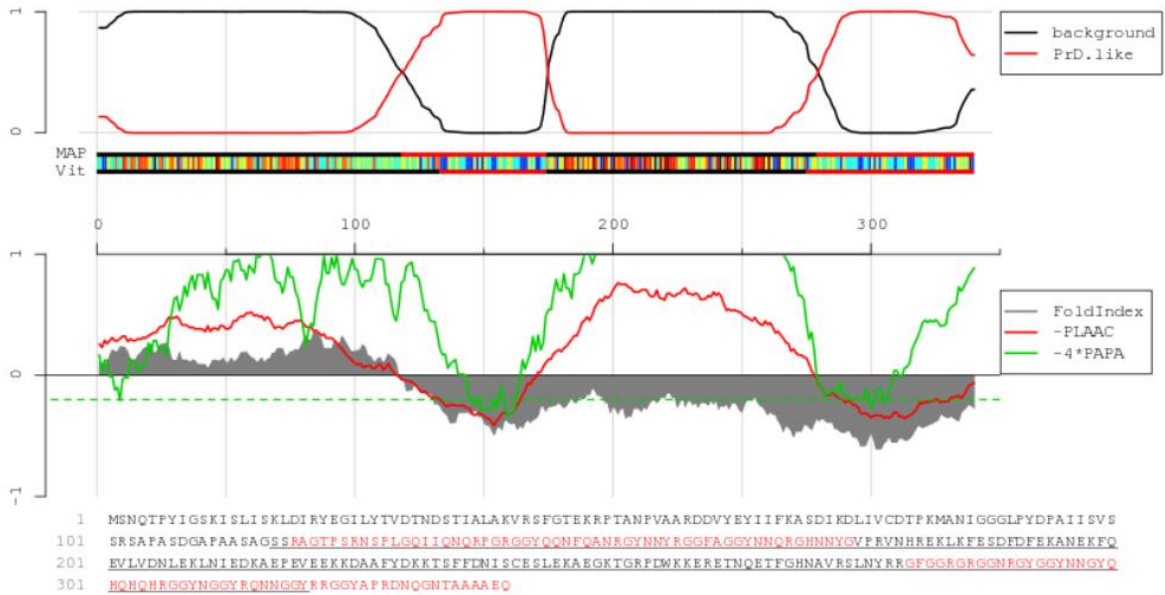
PGL-1

PGL1_CAEEL Guanyl-specific ribonuclease pgl-1 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239
GN=pgl-1 PE=1 SV=1



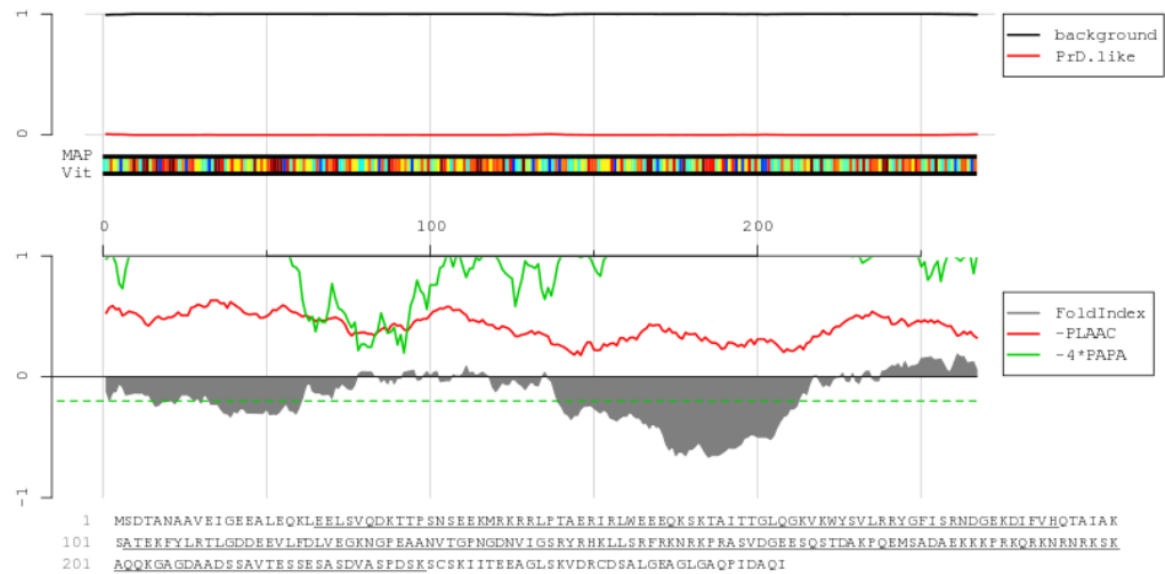
CAR-1

Q9XW17_CAEEL Cytokinesis, Apoptosis, RNA-associated OS=Caenorhabditis elegans
OX=6239 GN=car-1 PE=1 SV=1



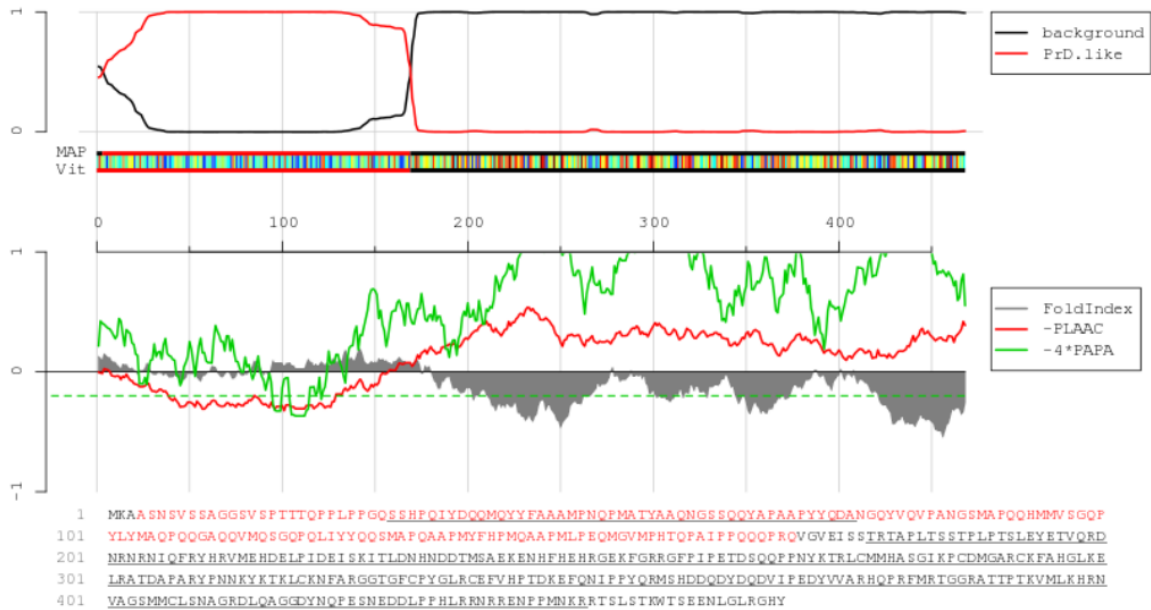
CEY-2

P91306_CAEEL CSD_1 domain-containing protein OS=Caenorhabditis elegans OX=6239
GN=cey-2 PE=1 SV=1



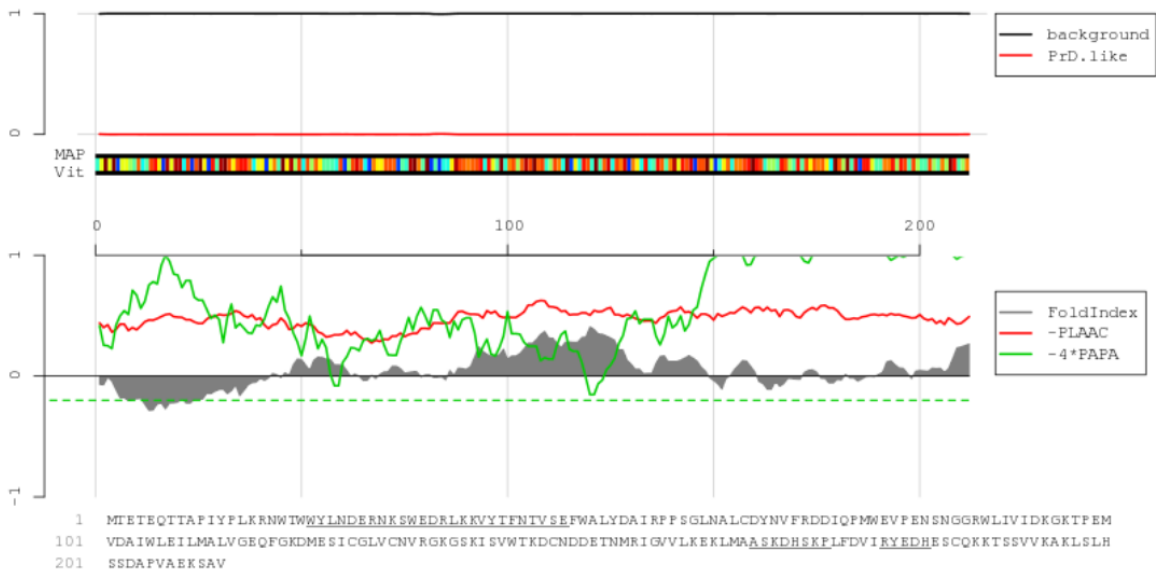
MEX-5

MEX5_CAEEL Zinc finger protein mex-5 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=mex-5 PE=1 SV=1



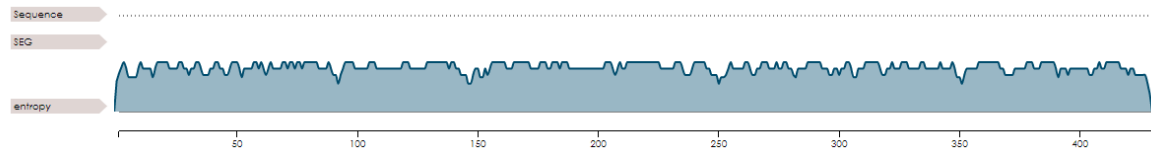
IFE-1

IF4E1_CAEEL Eukaryotic translation initiation factor 4E-1 OS=Caenorhabditis elegans OX=6239 GN=ife-1 PE=1 SV=2



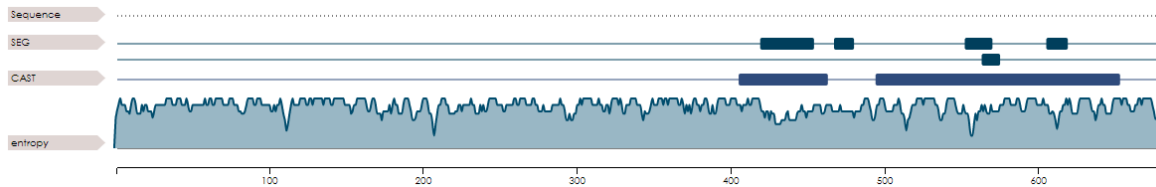
D. Predicción de las regiones de baja complejidad de las proteínas de estudio con dos diferentes algoritmos (SEG y CAST). La parte inferior, muestra con rojo las secuencias en las que ambos algoritmos coinciden como regiones de baja complejidad.

CGH-1



Sin regiones de baja complejidad.

GLA-3

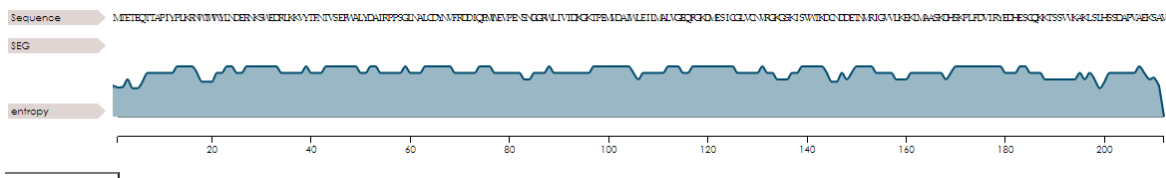


- SEG
- CAST

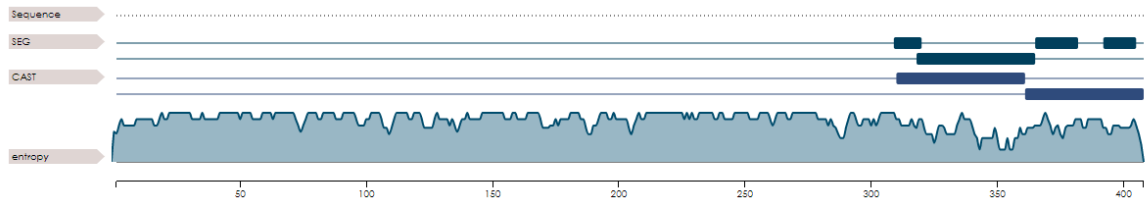
Type:

MLYQPSLLKS RLTPAPPGFS FQPQPLLNSD MDPVRNLESL GNYTVYQDSS QCFWQHQNFT
 SNREHNPALR KTKICDHWRR SGSCSYGDAC WYAHGEDDLR KVVRIIRSNE EENERPATAE
 IQKSPTKRAS TNVKGLTVNI PSNTAFKEQN SSMPLSPAQE RWISMSIGAV PPPTSSAAEK
 DAISLSKNG VEQEQEKKE ICSRDDDDIDD YGFLSPNPFY YPQQSMFSAG FPSHGHHQRS
 SNRATQGVPS QQFGGPVNIP GQDPNRLGSG AYHIPPQHQR SRSNVRTSRE VGGPPPQFQQ
 AIWNVAGEIY QRQKDIEIGG QRVGPNDRQP TQQKNSEMDR LLSKLMKDL NYLRFMIERG
 YINERDVSRQ TSSDQMSNGH HFNAPMTTPY HPRLAGNEPN TSDCHYHGTG NRLSNFMPGR
HRPPHQHPIH HHHQSQHQLH QHQQYLHHA QQYRYSHQQG PQHPFAALLS PPEISELLP
 PDDSFSIWLE PKPKQSGAM TRTRGAATIN ESSSAASLLT KMDALRSDKY PITDEEMMMA
 NDFVRQGRD **DKLSSSESS PVVMSLMELL SNENLLDQVA** TEKPKCSMFD FDTLKIAETL
 KEPL**QSECS TTSSKMTC**S PMFFVDEKT PNYDGSQSKS LFTPSSAGQ TPSFLEPCDF
 FAATGSCFPD DACHQSHSI

IFE-1



TIAR-1

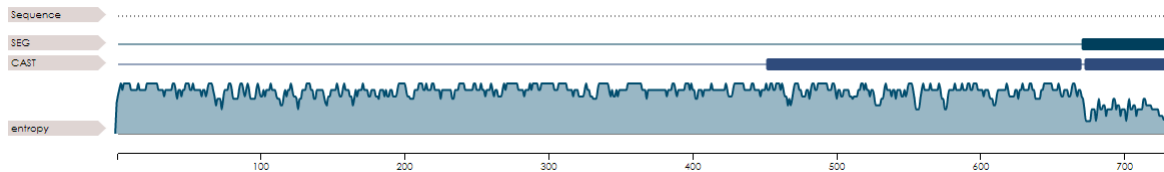


- SEG
- CAST

Type:

MSFFNPPANS NHGYNDDVNT GYNARMHSKL AEREGFHLGN GSDEPRTLYV GNLDSTVTE
FIATLNFQIG SVTKTKVIFD GSNDPYAFVE FSDHGQASQA LQTMNKRLLL DREMKNWAV
EPGQQQSKID TTRHFHFVVG DLSSEVDNQK LREAFQPFQD VSDAKVIRDT NTTKSKGYGF
VSYPKREEAE RAIEQMNGQW LGRRTIRTNW ATRKPGDQEK PSHYNEKSYD EIYNQTSQDN
TSVYVGNIAS LTEDAIRQGF ASFGRITEVR IFKMQGYAFV KFDNKDAAAK AIVQMNNQDV
GGQLVRCSWG **KTGDTGKTPG GSYGYGYGNS SSGGNSQPYS GYGGGGAYGG GQGGGGHGGP**
GQQQSNANSQ YWQYYAQYYN NPQLMQQWSN YWQQQGGAPQ QQNSGGHQ

PGL-1

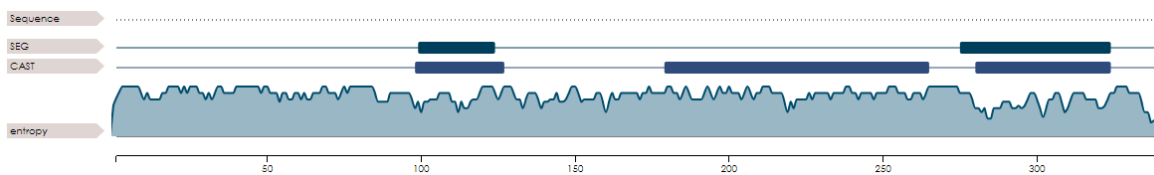


- SEG
- CAST

Type:

MEANKREIVD FGGLRSYFFP NLAHYITKND EELFNNTSQA NKLAAFVLGA SKDAPGDEDI
LEMILPNDAN AAVIAAGMDV CLLGDKFRP KFDAAAELKLS GLGHAHDLVS VIDDDKKLGM
LARKAKLKT EDAKILQALL KVIAIDDAE KFVELTELVS QLDLDFDVYV LTKILGLISE
ETSDEVDIIR DNVVNAFDSC KPLLKQLMLD GPKSEPADPF ISLLMDPLEE SVGKVVNHIA
QLFEEASKNE GDESLVLRSQ LGYQLFFLIV RSLADGKREV SKKILSGIPT SVRAEVFPGL
QRSVYKSAVF LGNHIIQVLL GSKKSFEDWD VVGVAKDLES AWKRRRAIAEL IKKFQVSILE
QCFDKPVPLI PQSPLNNDVAV IDNVNKALQF ALWLTEFYGS ENETEALGEL RFLDSTSKNL
LVDSFKKFVQ GINSKTHVTR IVESLEKCCCL SDTPSGRKSQ VQPSTSQQQD SAYTKEEMTT
VHNTYSVNTK AQVLNGLSDT NSSGLLVDSK DLSLSLQEISC DEVDSSTLLS SSRNIGEGVT
VKAVDPVPEK VNDAQQQQTV NEIEMASDAN QDTSSASPE VAPSFSTDGW DSPTKSVALP
PGMQQIDEEE TTVADKDSTP QPQARAETAW GSGDATPMPL PAPTNYKVS GFGEAKVAKG
FGQFAPTSSA **YGGGGRRGGY GGGDRGRRGG YGGDRGRRGG YGGDRGRRG GYGGDRGRRG**
YGGRRGRRGF

CAR-1

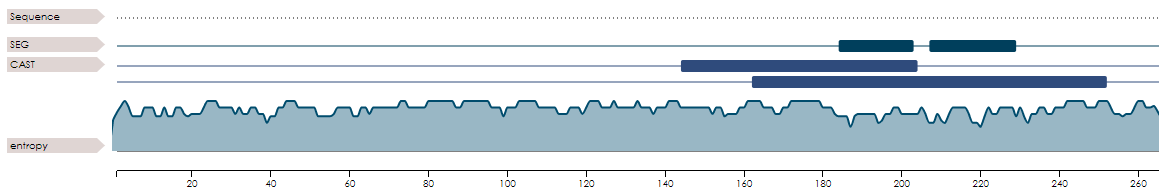


- SEG
- CAST

Type:

MSNQTPYIGS KISLISKLDI RYEGILYTVD TNDSTIALAK VRSFGTEKRP TANPVAARDD
VYEYIIFKAS DIKDLIVCDT PKMANIGGGL PYDPAIISVS SRSAPASDGA PAASAGSSRA
GTPSRNSPLG QIIQNQRPGR GGYQQNFQAN RGYNNYRGGF AGGYNNQRGH NNYGVPRVNH
REKLFESDF DFEKANEFQ EVLVDNLEKL NIEDKAEPEV EEKDAAFYD KKTSSF DNIS
CESLEKAEGK TGRPDWKKER ETNQETFHGN AVRSLNYRRG FGGRGRGGNR GYGGYNGYQ
HQHQHRGGYN GGYRQNNGGY RGGYAPRDN QGNTAAAAEQ

CEY-2

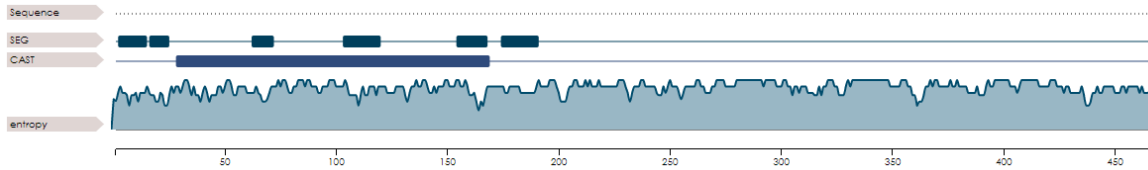


- SEG
- CAST

Type:

MSDTANA AVE IGEEALEQKL EELSVQDKTT P5NSEEKMRK RRLPTAERIR LWEEEQKSKT
AITTGLQGKV KWYSVLRRYG FISRNDGEKD IFVHQTAIAK SATEKFYLRT LGDDEEVLFD
LVEGKNGPEA ANVTGPNGDN VIGSRYRHLKLSRFRKNRKP RASVDGEESQ STDAKPQEMS
ADAEKKKPRK QRKNRNRKSK AQQKGAGDAA D5SAVTESSA SASDVASPD5 K5CSKIITEE
AGL5KVDRCD SALGEAGLGA QPIDAQI

MEX-5



- SEG
- CAST

Type:

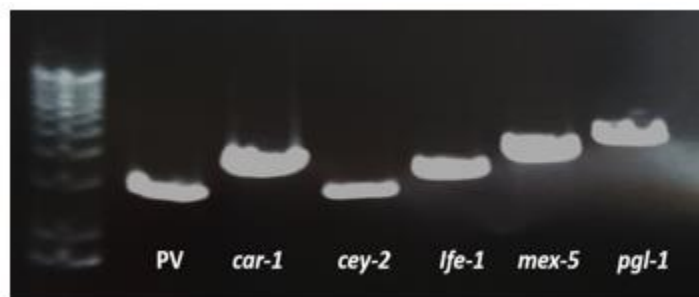
MKAA5NSVSS AGGSV5PTTT QPPLPPGQSS HPQIYDQQMQ YYFAAAMPNQ PMATYAAQNG
SSQQYAPAAP YYQDANGQYV QVPANGSMAP QQHMMVSGQP YLYMAQPQQG AQQVMQSGQP
 QLIYYQQSMA PQAAPMYFHP MQAAPMLPEQ MGVM**MPHTQPA IPPQQQPRQV** GVEISSTRTA
 PLTSSSTPLPT SLEYETVQRD NNRNRNIQFRY HRVMEHDELP IDEISKITLD NHNDDTMSAE
 KENHFHEHRG EKFGRRGFPI PETDSQQPPN YKTRLCMMHA SGIKPCDMGA RCKFAHGLKE
 LRATDAPARY PNNKYKTKLC KNFARGGTGF CPYGLRCEFV HPTDKEFQNI PPYQRM5HDD
 QDYDQDVIPE DYVVARHQPR FMRTGGRATT PTKVMLKHRN VAGSMMCLSN AGRDLQAGGD
 YNQPESNEDD LPPHLRRNRR ENPPMNRRT SLSTKWTSEE NLGLRGHY

E. Predicción de las proteínas participan en la separación de fases.

PSPredictor predic

Seq ID	Score	PSP(Si/No)
CGH-1	0.0031	No
GLA-3	0.9961	Si
TIAR-1	0.9755	Si
PGL-1	0.9933	Si
CAR-1	0.9843	Si
CEY-2	0.7588	Si
MEX-5	0.9820	Si
IFE-1	0.0067	No

F. Electroforesis de plásmidos purificados de las bacterias con el RNA de doble cadena de los genes de estudio.



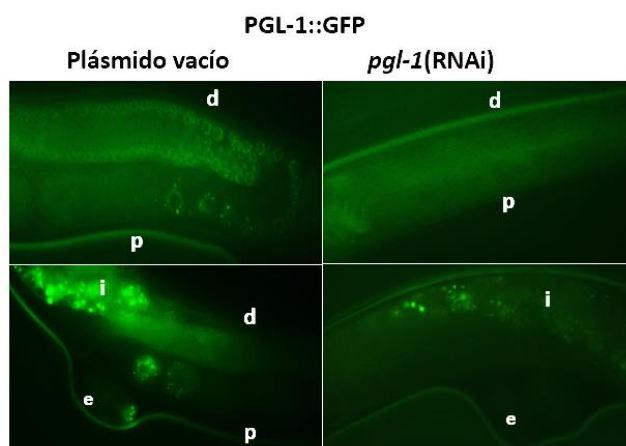
Comparación de las secuencias obtenidas en la secuenciación de los plásmidos con la base de datos (BLAST).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident
Caenorhabditis elegans Guanyl-specific ribonuclease pgl-1 (pgl-1) .partial mRNA	Caenorhabditis...	1596	1596	91%	0.0	99.77%
Caenorhabditis elegans Zinc finger protein mex-5 (mex-5) .mRNA	Caenorhabditis...	1616	1616	91%	0.0	99.89%
Caenorhabditis elegans Cytokinesis Apoptosis RNA-associated (car-1) mRNA	Caenorhabditis...	1624	1624	91%	0.0	99.89%
Caenorhabditis elegans Eukaryotic translation initiation factor 4E-1 (lfe-1) .mRNA	Caenorhabditis elegans	1181	1181	67%	0.0	100.00%
Cloning vector pBac1EG-irEG .complete sequence	Cloning vector pBac1EG-irEG		1367	1367	87%	0.0 99

G. Fenotipos observados de los gusanos con el silenciamiento de los genes.

Gen silenciado	Fenotipo
PGL-1	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilidad a 26°C • Gónadas más estrechas
CAR-1	<ul style="list-style-type: none"> • Desorganización muscular leve • Tamaño de cría ligeramente reducido.
IFE1	<ul style="list-style-type: none"> • Esterilidad sensible a la temperatura no producen embriones pero si ponen ovocitos. • Los espermatozoides se acumulan como células multinucleadas incapaces de madurar a espermátidas. • La producción de ovocitos se ralentiza, pero parecen relativamente normales y son fértiles (aparición largada de los ovocitos)

Ensayos de silenciamiento de *pgl-1* en una cepa con PGL-1::GFP en la que se corrobora que el dsRNA es eficiente.



d distal; **p** proximal; **i** intestino; **e** embriones

XIII. Referencias

- Al-Amin, M., Min, H., Shim, Y. H., & Kawasaki, I. 2016. Somatic expressed germ-granule components, PGL-1 and PGL-3, repress programmed cell death in *C. elegans*. *Scientific reports*, 6, 33884.
- Alberti, S., Mateju, D., Mediani, L., & Carra, S. 2017. Granulostasis: Protein Quality Control of RNP Granules. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 84.
- Albrecht, M., & Lengauer, T. 2004. Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. *FEBS letters*, 569(1-3), 18–26.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2009. Introduction. In *WormAtlas*.
- Altun, Z.F. and Hall, D.H. 2011. Nervous system, general description. In *WormAtlas*.
- An, H., & Shelkovernikova, T. A. 2019. Stress granules regulate paraspeckles: RNP granule continuum at work. *Cell stress*, 3(12), 385–387.
- Aoki, S. T., Kershner, A. M., Bingman, C. A., Wickens, M., & Kimble, J. 2016. PGL germ granule assembly protein is a base-specific, single-stranded RNase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(5), 1279–1284.
- Apfeld, J., & Alper, S. 2018. What Can We Learn About Human Disease from the Nematode *C. elegans*?. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1706, 53–75.
- Arnold, A., Rahman, M. M., Lee, M. C., Muehlhaeusser, S., Katic, I., Gaidatzis, D., Hess, D., Scheckel, C., Wright, J. E., Stetak, A., Boag, P. R., & Ciosk, R. 2014. Functional characterization of *C. elegans* Y-box-binding proteins reveals tissue-specific functions and a critical role in the formation of polysomes. *Nucleic acids research*, 42(21), 13353–13369.
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Bentmann E., Haass C.y Dormann D Stress granules in neurodegeneration – lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. 2013. *FEBS Journal* 280 4348–4370 ^a 2013 The Authors Journal compilation.

- Boag, P. R., Atalay, A., Robida, S., Reinke, V., & Blackwell, T. K. 2008. Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *The Journal of cell biology*, 182(3), 543–557.
- Boag, P. R., Nakamura, A., & Blackwell, T. K. 2005. A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 132(22), 4975–4986.
- Buchan, J. R., & Parker, R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular cell*, 36(6), 932–941.
- Cao, X., Jin, X., & Liu, B. 2020. The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases. *Aging cell*, 19(4), e13136.
- Carranza-García E. y Navarro R.E., 2020. Insights Into the Hypometabolic Stage Caused by Prolonged Starvation in L4-Adult *Caenorhabditis elegans* Hermaphrodites. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Vol.8. Mini Review.
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. 2015. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407.
- Dámazo-Hernandez .A. A. 2017. La proteína de unión RNA GLA-3 participa en la respuesta al estrés en la gónada del *Caenorhabditis elegans*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de México UNAM.
- Dos Santos Picançoa L.C, Ozelaa P.F, De Brito Britoa D.F, Pinheiroa A.A. et al.2018. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis,New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 3141-3159.
- Fire, A. y Timmons L. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*, 395: p. 854.
- Frézal L. y Félix. 2015. *C. elegans* outside the Petri dish. The natural history of model organisms. *eLife*.
- Gallo, C. M., Munro, E., Rasoloson, D., Merritt, C., & Seydoux, G. 2008. Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Developmental biology*, 323(1), 76–87.

- Gao, M. y Arkov, A. L. 2013. Next generation organelles: structure and role of germ granules in the germline. *Molecular reproduction and development*, 80(8), 610–623.
- Hanazawa, M., Yonetani, M., & Sugimoto, A. 2011. PGL proteins self associate and bind RNPs to mediate germ granule assembly in *C. elegans*. *The Journal of cell biology*, 192(6), 929–937.
- Herndon, L.A., Wolkow, C.A., Driscoll, M. and Hall, D.H. 2018. Introduction to Aging in *C. elegans*. In *WormAtlas*.
- Hondele, M., Sachdev, R., Heinrich, S., Wang, J., Vallotton, P., Fontoura, B., & Weis, K. 2019. DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature*, 573(7772), 144–148.
- Hou Y., Dan X., Babbar M., Wei Y., Hasselbalch S.G., Croteau D.L. y BohrAgeing V.A. 2019. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 15, 565–581.
- Hubbard E.J.A y Greenstein D. 2000. The *Caenorhabditis elegans* gonad: A test tube for cell and developmental biology. *Dev. Dyn.*, 218: 2-22.
- Huelgas-Morales G. 2016. La proteína de unión a RNA TIAR-1 protege a las células germinales de estrés en *Caenorhabditis elegans*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de México. México.
- Huelgas-Morales G., Silva-García C.G., Salinas L.S. 2016. The Stress Granule RNA-Binding Protein TIAR-1 Protects Female Germ Cells from Heat Shock in *Caenorhabditis elegans*. *G3: GENES, GENOMES, GENETICS* vol. 6 no. 4 1031-1047.
- Hyman A.A., Weber C.A. y Julicher F. 2014. Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30:39–58.
- Ishikawa-Ankerhold H., Ankerhold R. Drummen G. 2014. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP). eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kawasaki I, Shim YH, Kirchner J, Kaminker J, Wood WB, Strome S. 1998. PGL-1, a predicted RNA-binding component of germ granules, is essential for fertility in *C. elegans*. *Cell*. 94(5):635-45.

- Kritikou, E. A., Milstein, S., Vidalain, P. O., Lettre, G., Bogan, E., Doukoumetzidis, 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 & development*, 20(16), 2279–2292.
- Kroschwald S., Maharana S., Simon A. 2017. Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *MPI-CBG*.
- Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nüske, E., Poser, I., Richter, D., & Alberti, S. 2015. Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules. *eLife*, 4, e06807.
- Láscarez-Lagunas L.I. 2014. Regulación de la apoptosis inducida por ayuno en la gónada *Caenorhabditis elegans*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma de México. México.
- Lechler, M. C., & David, D. C. 2017. More stressed out with age? Check your RNA granule aggregation. *Prion*, 11(5), 313–322.
- Lints, R. and Hall, D.H. 2009. Reproductive system, somatic gonad. In *WormAtlas*.
- Luo Y., Na Z. y Slavoff S.A. 2018. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions *Biochemistry*. 2018 May 1; 57(17): 2424–2431.
- Marnik, E. A., Fuqua, J. H., Sharp, C. S., Rochester, J. D., Xu, E. L., Holbrook, S. E., & Updike, D. L. (2019). Germline Maintenance Through the Multifaceted Activities of GLH/Vasa in *Caenorhabditis elegans* P Granules. *Genetics*, 213(3), 923–939.
- Mittag, T., & Parker, R. 2018. Multiple Modes of Protein-Protein Interactions Promote RNP Granule Assembly. *Journal of molecular biology*, 430(23), 4636–4649.
- Morales-Oliva E. 2020. Estudio de la relación entre estrés fusión celular y la apoptosis en la gónada de *Caenorhabditis elegans*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de México. México.
- Navarro, R. E., Shim, E. Y., Kohara, Y., Singson, A., & Blackwell, T. K. 2001. *cgh-1*, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 128(17), 3221–3232.

- Noble, S. L., Allen, B. L., Goh, L. K., Nordick, K., & Evans, T. C. 2008. Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *The Journal of cell biology*, 182(3), 559–572.
- Nunes C., Mestre I., Marcelo A., Koppenol R., Matos C.A., Nóbrega C. 2019. MSGP: the first database of the protein components of the mammalian stress granules, Database. Oxford University Press.
- Oeffinger M. y Daniel-Zenkhusen (Eds). 2019. The Biology of mRNA: Structure and Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1203. Sidibé H. y Vande-Velde C. RNA Granules and Their Role in Neurodegenerative Diseases.
- Pazdernik N. y Schedl T. 2013. Introduction to Germ Cell Development in *Caenorhabditis elegans*. En, Schedl T. (Ed.) *Germ Cell Development in C. elegans*. 1-16. Springer New York Heidelberg Dordrecht London.
- Phillips, C. M., Montgomery, T. A., Breen, P. C., & Ruvkun, G. 2012. MUT-16 promotes formation of perinuclear mutator foci required for RNA silencing in the *C. elegans* germline. *Genes & development*, 26(13), 1433–1444.
- Putnam, A., Cassani, M., Smith, J., & Seydoux, G. 2019. A gel phase promotes condensation of liquid P granules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature structural & molecular biology*, 26(3), 220–226.
- Raiders, S. A., Eastwood, M. D., Bacher, M., & Priess, J. R. 2018. Binucleate germ cells in *Caenorhabditis elegans* are removed by physiological apoptosis. *PLoS genetics*, 14(7), e1007417.
- Rajyaguru P, Parker R. 2009. CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends Cell Biol* 19 (1): 24-8.
- Rajyaguru P., Parker R. 2008. CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Cell Press. Rev.* 24-28.
- Rusciano, I., Marvi, M. V., Owusu Obeng, E., Mongiorgi, S., Ramazzotti, G., Follo, M. Y., Zoli, M., Morandi, L., Asioli, S., Fabbri, V. P., McCubrey, J. A., Suh, P. G., Manzoli, L., Cocco, L., & Ratti, S. 2021. Location-dependent role of phospholipase C signaling in the brain: Physiology and pathology. *Advances in biological regulation*, 79, 100771.

- Salinas, L. S., Maldonado, E., & Navarro, R. E. 2006. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell death and differentiation*, 13(12), 2129–2139.
- Schisa J. A. 2014. Effects of stress and aging on ribonucleoprotein assembly and function in the germ line. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 5(2), 231–246.
- Schisa J.A., Pitt J.N. y Priess J.R. 2001. Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development* 128 1287-1298.
- Schubert, C. M., Lin, R., de Vries, C. J., Plasterk, R. H., & Priess, J. R. 2000. MEX-5 and MEX-6 function to establish soma/germline asymmetry in early *C. elegans* embryos. *Molecular cell*, 5(4), 671–682.
- Seydoux G. 2018. The P Granules of *C. elegans*: A Genetic Model for the Study of RNA-Protein Condensates. *Journal of molecular biology*, 430(23), 4702–4710.
- Silva-García CG, Estela Navarro R. 2013. The *C. elegans* TIA-1/TIAR homolog TIAR-1 is required to induce germ cell apoptosis. *Genesis*. Oct;51(10):690-707.
- Squirrell, J. M., Eggers, Z. T., Luedke, N., Saari, B., Grimson, A., Lyons, G. E., Anderson, P., & White, J. G. 2006. CAR-1, a protein that localizes with the mRNA decapping component DCAP-1, is required for cytokinesis and ER organization in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Molecular biology of the cell*, 17(1), 336–344.
- Strange K. 2006. An Overview of *C. elegans* Biology. En Strange K.(Ed.) . *Methods in molecular biology, C. elegans methods and applications*. 1-12. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Suresh, P. S., Tsutsumi, R., & Venkatesh, T. 2018. YBX1 at the crossroads of non-coding transcriptome, exosomal, and cytoplasmic granular signaling. *European Journal of Cell Biology*, 97(3), 163–167.
- UniProt (de universal protein). Consultado el 1 de mayo del 2020. <https://www.uniprot.org/>.
- Updike, D., & Strome, S. 2010. P granule assembly and function in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *Journal of andrology*, 31(1), 53–60.

- Vilgelm A. E., Chumakov S. P. y Prassolov V. S. 2006. RNA Interference: Biology and Prospects of Application in Biomedicine and Biotechnology. Vol. 40, No. 3, pp. 387–403.
- Voronina E. 2013. The diverse functions of germline P-granules in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Reprod Dev.*80(8):624-631
- Voronina, E., Seydoux, G., Sassone-Corsi, P. y Nagamori, I. 2011. RNA granules in germ cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a002774.
- Wan, G., Fields, B. D., Spracklin, G., Shukla, A., Phillips, C. M., & Kennedy, S. 2018. Spatiotemporal regulation of liquid-like condensates in epigenetic inheritance. *Nature*, 557(7707), 679–683.
- Wang, J., Choi, J. M., Holehouse, A. S., Lee, H. O., Zhang, X., Jahnel, M., Maharana, S., Lemaitre, R., Pozniakovsky, A., Drechsel, D., Poser, I., Pappu, R. V., Alberti, S., & Hyman, A. A. 2018. A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell*, 174(3), 688–699.e16.
- Wells C. M. y Parsons M. (Eds.), 2011. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. Carisey A., Stroud M., Tsang R., y Ballestrem C. Fluorescence Recovery After Photobleaching. *Methods in Molecular Biology*, vol.769 Springer Science Business Media.
- Wolkow, C.A. and Hall D.H. 2015. Introduction to the Dauer Larva, Overview. In *WormAtlas*.
- Wormbase consultado el 1 de mayo del 2020 en <https://wormbase.org/#012-34-5>.