

Estudio de la glucólisis en la cilia primaria en *Caenorhabditis elegans*

Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Victoria Núñez Barón

Laboratorio de Biología de Gusanos

Unidad Mixta: Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Química,
UdelaR

Tutora: Dra. Laura Romanelli

Co-tutor: Dr. Gustavo Salinas

Mayo 2025

Resumen

El ATP se produce principalmente mediante fosforilación oxidativa. Sin embargo, en tejidos con alta demanda energética, la glucólisis puede predominar incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Warburg. En las sinapsis de motoneuronas de *C. elegans* se ha reportado la formación de un “metabolón glucolítico” asociado al ciclo de las vesículas sinápticas en el botón presináptico de las neuronas para acelerar la producción de ATP.

La cilia primaria, organelo encargado de la comunicación de la célula con su entorno, cumple funciones que se presume tienen un alto y fluctuante consumo energético. Se ha descrito que el ATP que la abastece proviene de mitocondrias ubicadas en su base, aunque es cuestionable si la velocidad de difusión del ATP desde allí provee todos los requerimientos energéticos de la cilia. En este trabajo se plantea si, al igual que en la sinapsis, la glucólisis aeróbica podría ser relevante en la cilia primaria.

En esta tesis se propusieron dos abordajes para determinar la existencia de glucólisis en la cilia primaria de *C. elegans*. Por un lado, se planteó determinar la localización subcelular de la enzima fosfofructoquinasa-1 (PFK-1.1) en neuronas ciliadas de *C. elegans*, y por otro lado estudiar fenotipos morfológicos de un conjunto de neuronas ciliadas, en gusanos mutantes en el gen que codifica para la PFK-1.1 (*pfk-1.1*), utilizando el compuesto DiI, colorante que difunde a través de las membranas de las cilias expuestas al ambiente.

Los resultados obtenidos muestran la localización subcelular de PFK-1.1 en la cilia de neuronas, particularmente dentro del subcompartimento de la membrana periciliar, región basal de la cilia involucrada en procesos endocíticos y en el tráfico de proteínas hacia la cilia. La presencia de PFK-1.1 allí sugiere un posible rol de la glucólisis en la generación de ATP para abastecer estos procesos.

Adicionalmente, se concluyó que la mutación en *pfk-1.1* (estirpe DCR3791) no afecta la capacidad de la cilia de incorporar la tinción con el compuesto DiI, y esto sugiere la integridad funcional de la cilia en dicha estirpe. Por otro lado, se observó un fenotipo de disminución en el éxito reproductivo de la estirpe DCR3791, posiblemente asociado a la

afectación de procesos energéticos durante la ovogénesis. Es necesario continuar caracterizando la estructura y funcionalidad de la cilia primaria, para evaluar si la glucólisis es un mecanismo de abastecimiento de energía para este organelo.

Índice

Resumen	3
Índice	5
Introducción	7
Bioenergética y glucólisis	7
Efecto Warburg	11
Metabolón glucolítico	12
Metabolón glucolítico en <i>C. elegans</i> y enzima fosfofructoquinasa-1	13
<i>Caenorhabditis elegans</i>	18
Sistema nervioso de <i>C. elegans</i>	21
Sistema quimiosensorial de <i>C. elegans</i>	23
Ánfidos	24
Fásmidos	25
Células de soporte-glías	25
Cilia primaria	28
Importancia del organelo para la salud humana	28
Estructura de la cilia primaria	29
Particularidades de la cilia en <i>C. elegans</i>	30
Fenotipo <i>dye-filling</i> (Dyf)	31
Metabolismo de la cilia primaria	32
Objetivo	34
Objetivo general	34
Objetivos específicos	34
Metodología	35
Estirpes de <i>C. elegans</i>	35
Mantenimiento de estirpes	35
Medios y soluciones utilizados para el trabajo con <i>C. elegans</i>	35

Cultivo de <i>C. elegans</i>	36
Congelado de estirpes de <i>C. elegans</i>	36
Limpieza de gusanos contaminados	37
Confirmación de genotipo de estirpes de gusanos mediante PCR y secuenciación	37
Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa, purificación de ADN de gel y cuantificación de ADN	39
Secuenciación	39
Tinción con DiI	39
Preparación de las muestras para la observación al microscopio	40
Observación por microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal	40
Generación de organismos transgénicos	42
Diseño de la construcción plasmídica	42
Transformación de células competentes	42
Extracción de ADN plasmídico	42
Crio stock de células XL-1 transformadas con el plásmido <i>Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet</i>	43
Microinyección	43
Generación de machos	43
Generación de nueva estirpe transgénica mediante el cruzamiento de estirpes	44
Caracterización fenotípica de DCR3791	44
Ensayo de caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos de la estirpe DCR3791	44
Ensayo de caracterización de la viabilidad de la estirpe DCR3791 cuando es expuesta a la solución de bleaching	45
Resultados	47
Estudio de la localización subcelular de la enzima glucolítica PFK-1.1	47
Expresión de <i>bbs-1::gfp</i>	47
Expresión de <i>pfk-1.1::mScarlet</i>	50

Estudio de la posible colocalización de las fusiones <i>bbs-1::gfp</i> y <i>pfk-1.1::mScarlet</i>	52
Evaluación de la integridad estructural de la cilia mediante tinción con DiI para la estirpe WT y mutante en <i>pfk-1.1</i> (DCR3791)	54
Caracterización fenotípica de la estirpe DCR3791	58
Ensayo de caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos de la estirpe DCR3791	58
Ensayo de caracterización de la viabilidad de la estirpe DCR3791 cuando es expuesta a la solución de <i>bleaching</i>	60
Confirmación de genotipo de estirpes N2 y DCR3791 mediante PCR y secuenciación	63
Discusión	66
Determinación de la localización subcelular de la enzima PFK-1.1 en neuronas ciliadas de <i>C. elegans</i>	66
Evaluación de la integridad estructural de la cilia mediante tinción con DiI en la estirpe WT y mutante en <i>pfk-1.1</i> (DCR3791)	71
Caracterización fenotípica de la estirpe DCR3791	72
Conclusiones y perspectivas	76
Referencias bibliográficas	80

Introducción

Bioenergética y glucólisis

Los organismos vivos realizan actividades y procesos que requieren energía para mantenerse con vida, crecer y reproducirse. Para ello, son capaces de aprovechar y canalizar la energía hacia el trabajo biológico. Los heterótrofos obtienen energía libre en forma química mediante el catabolismo de moléculas nutritivas y la utilizan para sintetizar ATP, la moneda energética de las células, que dona parte de la energía que almacena en sus enlaces a procesos endergónicos (Nelson y Cox, 2021).

La glucosa, además de cumplir un rol importante en muchas reacciones de biosíntesis, es el combustible principal de las células. Esta molécula rica en energía es almacenada en forma de glucógeno en muchos linajes eucariotas, y se disponibiliza para producir ATP cuando las demandas energéticas aumentan (Nelson y Cox, 2021).

La glucólisis es la vía del catabolismo de la glucosa con el mayor flujo de carbono en las células. Se encuentra ampliamente distribuida en todos los dominios de la vida y conservada evolutivamente, tanto en la estructura de las enzimas que la componen como en la secuencia aminoacídica de las mismas. Esta vía, esquematizada en la **Figura 1**, ocurre en dos etapas. En la fase preparatoria intervienen cinco enzimas que catalizan la isomerización de los intermediarios y realizan dos fosforilaciones, utilizando ATP como donante del grupo fosfato. En la fase de recompensa, otras cinco enzimas intervienen en la oxidación, isomerización y fosforilación de los intermediarios. Se utiliza fosfato inorgánico para la síntesis de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato. Esta fase genera cuatro moléculas de ATP, resultando en un rendimiento neto de dos ATP, dos moléculas transportadoras de electrones NADH y dos moléculas de piruvato por cada molécula de glucosa utilizada (Nelson y Cox, 2021).

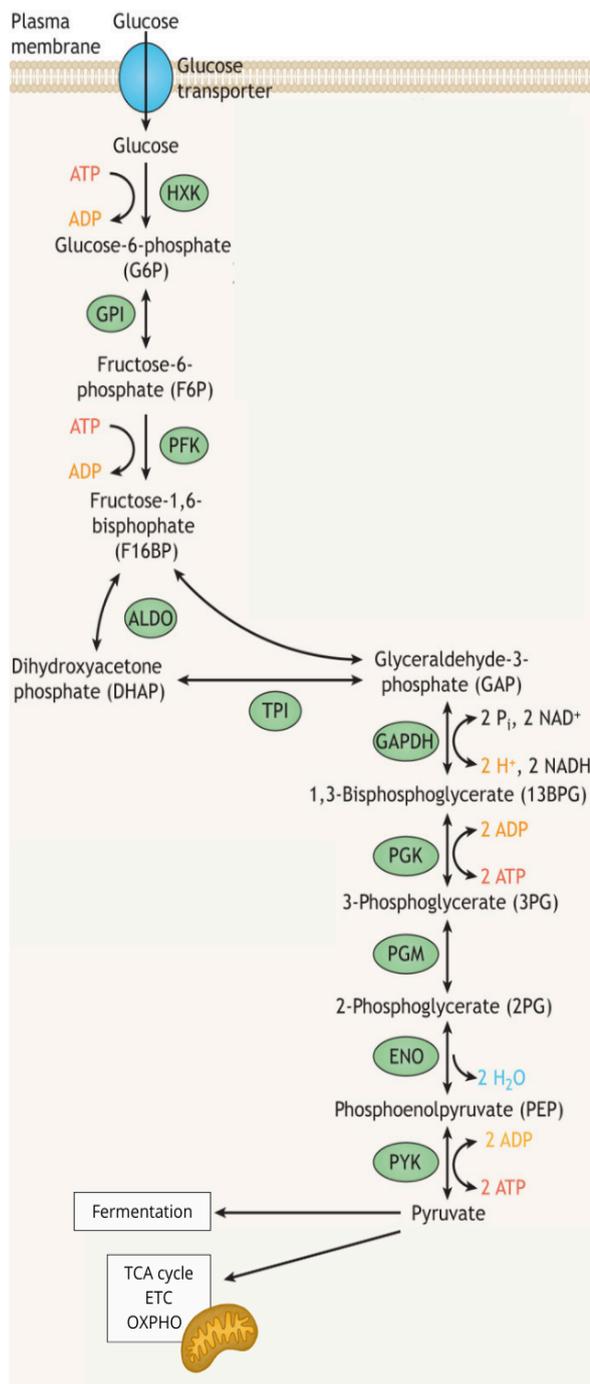


Figura 1. Glucólisis. En las reacciones de la fase preparatoria, la glucosa es fosforilada por la enzima hexoquinasa (HXK) e isomerizada a fructosa 6-fosfato (F6P) por la glucosa 6-fosfato isomerasa (GPI). La F6P es fosforilada generando fructosa 1, 6-bifosfato (F16BP) a través de la actividad de la fosfofructoquinasa (PFK). F16BP es clivada por la enzima aldolasa (ALDO) produciendo dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído 3-fosfato (GAP). La DHAP se interconvierte con el GAP gracias a la actividad de la triosa fosfato isomerasa (TPI), generando 2 equivalentes de GAP por molécula de glucosa. En una reacción dependiente de NAD^+ , la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) convierte el GAP en 1, 3-bifosfoglicerato (13BPG). Luego la fosfoglicerato quinasa (PGK) genera ATP por fosforilación a nivel de sustrato al convertir 1,3BPG en 3-fosfoglicerato (3PG). Este último es convertido en 2-fosfoglicerato (2PG) por la fosfoglicerato mutasa (PGM). Luego la enolasa (ENO) convierte el 2PG en fosfoenolpiruvato (PEP), que es el sustrato de la última enzima de la vía, la piruvato quinasa (PYK), que genera ATP y piruvato. En varios pasos de la glucólisis los metabolitos pueden entrar en vías biosintéticas, pero este esquema se limita a la glucólisis y las vías catabólicas posteriores. El piruvato puede ser fermentado para regenerar NAD^+ , o puede ingresar a la mitocondria y continuar su oxidación a través del ciclo del ácido cítrico (TCA), la cadena de transporte de electrones (ETC) y la fosforilación oxidativa (OXPHO). Modificado de (Fuller y Kim, 2021).

Esta vía libera solo una pequeña parte de la energía total disponible en la glucosa, y en condiciones aeróbicas, el metabolismo continúa en la mitocondria, mediante reacciones oxidativas en la descarboxilación del piruvato, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa, produciendo entre 30 y 32 ATP junto a dióxido de carbono y agua (Nelson y Cox,

2021). En este contexto aeróbico, los equivalentes reducidos generados en la glucólisis y en el ciclo del ácido cítrico (NADH y FADH₂) transfieren sus electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC) ubicada en la membrana mitocondrial interna. Allí, los electrones se desplazan a través de complejos enzimáticos que usan la energía liberada para bombear protones hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico. Finalmente, los electrones se transfieren al oxígeno molecular, aceptor final, que se reduce a agua. Así, se regenera el NAD⁺ y el FAD, necesarios para la continuidad del metabolismo oxidativo. Este proceso se acopla a la síntesis de ATP mediante la ATP sintasa, utilizando en este caso, el gradiente generado por la ETC, completando así la respiración celular (Nelson y Cox, 2021).

Tanto la velocidad como la cantidad de glucosa consumida por las células en condiciones anaeróbicas son mucho mayores que en condiciones aeróbicas, ya que el rendimiento energético de esta vía es mucho menor que el de la oxidación completa de la glucosa. En aerobiosis la glucólisis sigue ocurriendo como fase inicial del metabolismo de la glucosa, y predomina la respiración por su mayor rendimiento, como se describe en el efecto Pasteur (Nelson y Cox, 2021).

La reoxidación de los transportadores de electrones es necesaria para que continúen los procesos metabólicos descritos. En condiciones anaeróbicas o de hipoxia, cuando el NADH no puede reoxidarse a NAD⁺ utilizando al O₂ como aceptor final de electrones, una manera de oxidar el NADH es la fermentación láctica. En la misma el piruvato producido en la glucólisis acepta los electrones del NADH reduciéndose a lactato, y así se regenera el NAD⁺ necesario para continuar la glucólisis (Nelson y Cox, 2021). Además de la fermentación láctica que ocurre típicamente en vertebrados, los animales presentan otras vías fermentativas bajo condiciones de hipoxia o anoxia. Por ejemplo, en algunos nemátodos, como *C. elegans*, en platelmintos y otros invertebrados marinos se da la vía de dismutación del malato, y algunos peces como las carpas presentan fermentación alcohólica. En otros organismos eucariotas como plantas, hongos, protistas y algas, también ocurre fermentación y producen una variedad de productos finales, que incluyen, lactato, etanol, acetato, hidrógeno o glicerol (Müller et al. 2012).

Efecto Warburg

En algunas condiciones la fermentación predomina sobre la respiración, incluso en presencia de oxígeno. A pesar de que su rendimiento sea bajo, la fermentación predomina cuando es crucial una tasa muy alta de producción de ATP (Nelson y Cox, 2021) y este fenómeno es conocido con el nombre de efecto Warburg o “fermentación aeróbica” (**Figura 2**). A diferencia de la fermentación anaerobia, en la fermentación aeróbica las mitocondrias son metabólicamente activas. Warburg y Cori observaron una alta captación de glucosa y excreción de lactato en células cancerosas respecto a células normales (Potter, Newport y Morten, 2016). Así, la fermentación aeróbica ha sido propuesta como un mecanismo para sostener las altas tasas proliferativas de las células cancerosas: además de permitir una rápida producción de ATP, también podría alimentar vías anabólicas para la proliferación celular, con aporte de carbono y poder reductor (Liberti y Locasale, 2016). En este contexto, el flujo de glucosa a través de la vía glucolítica es regulado rápidamente para mantener los niveles de producción de ATP locales por un corto período. Esta regulación está mediada por la interacción entre el consumo de ATP, fluctuaciones en la concentración de metabolitos clave que reflejan el equilibrio celular entre la producción y el consumo de este, la regeneración de NAD^+ y la regulación alostérica de algunas enzimas claves de la vía (Nelson y Cox, 2021).

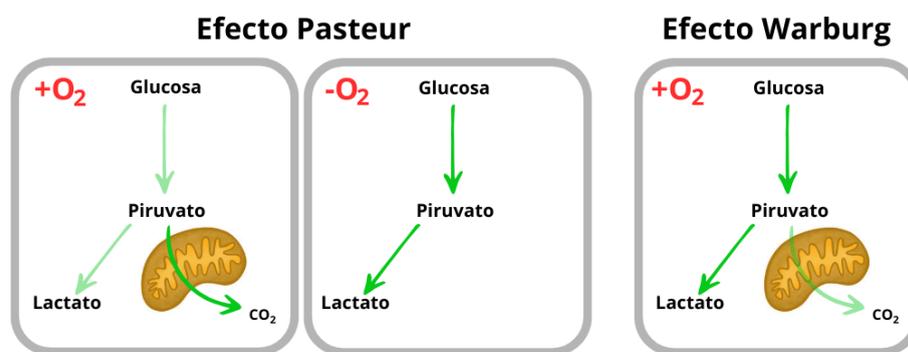


Figura 2. Efecto Pasteur vs. Efecto Warburg. En el efecto Pasteur (izquierda), en aerobiosis el piruvato generado en la glucólisis ingresa a las mitocondrias para ser completamente oxidado (flecha verde oscuro); en estas condiciones el flujo de glucosa en la vía glucolítica es bajo (flecha translúcida). En anaerobiosis no ocurre fosforilación oxidativa y el NADH se reoxida a través de la fermentación, aumentando el flujo de la vía glucolítica y la producción de lactato. En el efecto Warburg (derecha), incluso en presencia de O₂ las células priorizan la fermentación respecto a la fosforilación oxidativa, permitiendo una rápida producción de ATP pero con un menor rendimiento energético; aumenta el flujo de la vía glucolítica y la producción de lactato.

Metabolón glucolítico

En distintos organismos, se ha descrito la formación de un complejo estructural-funcional denominado “metabolón glucolítico”, que se refiere a que las enzimas glucolíticas pierden su disposición difusa en el citoplasma y se relocalizan formando complejos proteicos transitorios no membranosos. Estos complejos aumentan la velocidad de la vía dado que canalizan los metabolitos de una enzima a la siguiente (Fuller y Kim, 2021). Este fenómeno se ha evidenciado en diversos linajes de organismos eucariotas, por lo que se trata de una respuesta adaptativa conservada para aumentar la actividad de la vía durante condiciones de estrés energético (Jin et al., 2017).

En *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito la formación de un metabolón glucolítico, al cual se le denominó “cuerpo G”, en hipoxia. En su formación y regulación están involucradas proteínas de respuesta al estrés, chaperonas, ARNs estructurales y podría también haber mecanismos de regulación postraduccional implicados (Jin et al., 2017). La importancia del metabolón glucolítico en estos organismos es notoria cuando se inhibe su formación, ya que conduce a una división celular anormal y formación de células hijas inviables (Fuller y Kim, 2021).

En metazoarios se ha reportado este tipo de complejos en tejido muscular. En *Drosophila melanogaster*, se demostró que la formación del metabolón es crucial en los músculos asociados al vuelo (Fuller y Kim, 2021). En eritrocitos de humanos y ratones, células que dependen exclusivamente de la glucólisis para la producción de energía, se ha visto que las enzimas glucolíticas se asocian a la membrana celular (Fuller y Kim, 2021).

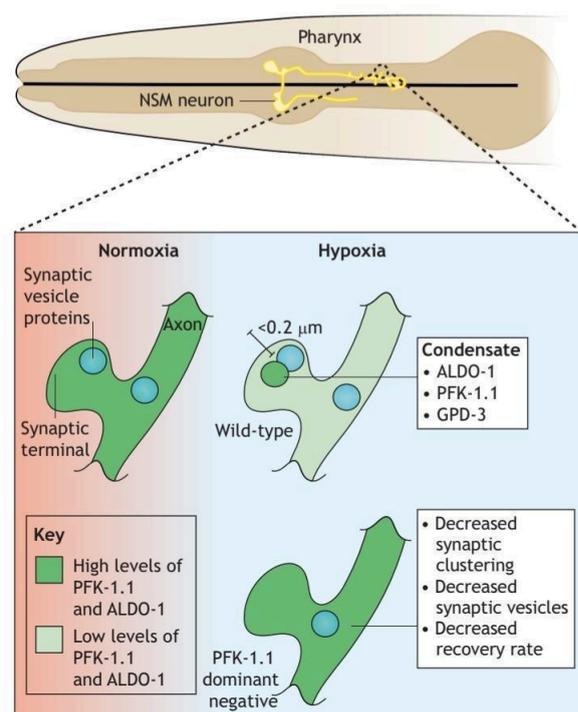
Se ha documentado compartimentalización no membranosa de la glucólisis asociada a funciones celulares que requieren grandes niveles de energía local, como la migración. En este contexto, la remodelación del citoesqueleto en células endoteliales o cancerosas en migración requiere de una gran producción de ATP. Para ello, las enzimas glucolíticas se agrupan con el citoesqueleto de actina en los lamelipodios, filopodios e invadopodios, ya que estas proyecciones celulares tienen un tamaño estrecho y no caben mitocondrias (Zecchin et al., 2015).

En *Caenorhabditis elegans*, se ha documentado *in vivo* la formación del metabolón glucolítico en el botón presináptico de motoneuronas, asociado a la transmisión sináptica, fenómeno que se abordará en detalle en la siguiente sección.

Metabolón glucolítico en *C. elegans* y enzima fosfofructoquinasa-1

La transmisión sináptica conlleva una gran demanda energética con rápidas fluctuaciones, relacionada a la actividad de bombas dependientes de ATP, la liberación sincronizada de vesículas, su reciclaje y el mantenimiento de los niveles de calcio presináptico. En *C. elegans* se observó que en condiciones de gran actividad neuronal o en hipoxia, las enzimas glucolíticas (concretamente fosfofructoquinasa-1, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y aldolasa) pasan de una distribución difusa en el citoplasma a colocalizarse de forma puntuada, asociadas a proteínas de andamiaje de los sitios de liberación presinápticos. La inhibición de la formación del metabolón, causada por la expresión de un alelo dominante negativo de la enzima fosfofructoquinasa-1, bloquea el ciclo vesicular sináptico, afectando la recuperación sináptica y la locomoción del organismo (**Figura 3**) (Jang et al., 2016).

Figura 3. Separación de fase de las enzimas de la glucólisis en *C. elegans*. Vista ampliada de una terminal sináptica individual en la neurona motora neurosecretora NSM. En normoxia, PFK-1.1 y ALDO-1 (verde) están distribuidas difusamente, pero minutos después de que ocurra hipoxia, se acumulan en condensados (círculos verde) ubicados próximos a las vesículas sinápticas (círculos celeste). Un alelo dominante negativo de PFK-1.1 impide el ensamblaje del metabolón, lo que resulta en defectos sinápticos (parte inferior). Tomado de (Fuller y Kim, 2021).



En *C. elegans* se demostró que el metabolón se forma por separación de fases, presenta propiedades líquidas, que lo hacen fluido y dinámico y tiene una forma esferoidal causada por la tensión superficial. En este complejo ocurren rearrreglos moleculares rápidos y tiene un tiempo de formación corto (en el orden de minutos) (Fuller y Kim, 2021; Jang et al., 2020).

La fosfofructoquinasa-1, es una enzima que cataliza una de las tres reacciones irreversibles de la vía glucolítica y es el principal punto de control de la glucólisis (Traut, 2008). Es una enzima alostérica, controlada por “carga energética”, que cataliza la fosforilación de la fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato mediante la hidrólisis de ATP, regulando la entrada a la fase de generación de energía de la glucólisis. En *C. elegans* existen dos isoformas, codificadas por los genes parálogos *pfk-1.1* y *pfk-1.2*, que se expresan en distintos tejidos y forman homotetrámeros. Cada subunidad contiene un sitio catalítico para la unión de fructosa 6-fosfato y ATP, y también sitios regulatorios. Existe en dos conformaciones principales, una forma activa (R) en la que la afinidad por los sustratos es alta y una inactiva (T). La transición a la forma R es promovida por la unión de activadores a los sitios alostéricos; la fructosa 2,6-bifosfato (en eucariotas) y AMP o ADP. Adopta la conformación T con la unión de ATP a los sitios alostéricos cuando se encuentra en concentraciones altas o por la unión de citrato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico (Traut, 2008; Goldhammer y Paradies, 1979).

La región C-terminal contribuye a la estabilidad de las interacciones entre las subunidades, al plegamiento y ensamblaje de la estructura oligomérica, y modula sus propiedades alostéricas (Serre y Garel, 1990; Edelmann et al. 2002). La fructosa 2,6-bifosfato es el activador alostérico más potente de la enzima; y ha sido descrito en *S. cerevisiae* y *Oryctolagus cuniculus* que mutaciones que afectan el sitio de unión al ligando, ubicado en la región C-terminal de la proteína, anulan la formación del tetrámero al disminuir la afinidad por este y en consecuencia su sensibilidad a la regulación (Edelmann et al. 2002; Li et al. 1999).

En un estudio en la termita *Reticulitermes chinensis*, donde se investigaron los efectos del silenciamiento del gen *pfk*, se encontró que la deficiencia de PFK, además de afectar directamente la producción de energía, provocó locomoción anormal. Esto se interpretó como una incapacidad en la toma de decisiones inmediatas en respuesta a cambios en el entorno

(Hassan et al. 2021); de forma similar, en el mutante en PFK de *C. elegans* con el ciclo vesicular sináptico bloqueado se afectó la recuperación sináptica y la locomoción del organismo.

La localización espaciotemporal de PFK-1 influye en su actividad y es un requisito para el control metabólico preciso durante momentos cruciales del desarrollo. En etapas específicas de la embriogénesis en ratones, se ha observado expresión localizada de PFK-1, fenómeno también registrado durante el desarrollo de aves y anfibios (Campos y Albrecht, 2023). Por otra parte, en humanos está descrito que la PFK es reclutada a los sitios de formación de caveolas en la membrana plasmática cuando hay altas concentraciones de glucosa extracelular. Además, la PFK interactúa con filamentos de actina, lo que aumenta su actividad enzimática. Así, la remodelación dinámica y reversible de la localización de PFK-1, podría haber evolucionado para permitir una regulación más estricta sobre los procesos celulares, compensando la irreversibilidad de su actividad (Campos y Albrecht, 2023).

En vertebrados, existen tres isoformas de la enzima PFK-1, codificadas por diferentes genes y expresada en distintos tejidos: PFK-M (muscular), PFK-L (hepática) y PFK-P (plaquetaria) (Musumeci et al. 2012). Respecto a la deficiencia de PFK, existe heterogeneidad en los fenotipos generados; no hay una correlación específica genotipo-fenotipo que explique la variabilidad de los síntomas generados. Se han identificado mutaciones puntuales en residuos conservados evolutivamente, alteraciones en el *splicing*, corrimientos del marco de lectura y mutaciones que generan terminaciones prematuras de la traducción. Las manifestaciones clínicas son diversas y varían en severidad, van desde dolores musculares, intolerancia al ejercicio, anemia hemolítica, hasta formas graves que llevan a la muerte neonatal o infantil (Musumeci et al. 2012). La enfermedad de Tauri es la principal patología asociada a mutaciones de pérdida de función de la isoforma muscular. Es una enfermedad autosómica recesiva que impide la degradación de glucosa y genera acumulación de glucógeno en el músculo esquelético (Gazzerro et al. 2013). También se manifiesta con hemólisis, ya que los glóbulos rojos expresan PFK-L y PFK-M formando heterotetrámeros y mutaciones en la PFK-M disminuyen la actividad enzimática. Los eritrocitos dependen exclusivamente de esta vía para obtener energía ya que carecen de mitocondrias, por lo que la presencia de una

subunidad no funcional lleva a la destrucción temprana de estas células (Gazzerro et al., 2013).

En *D. melanogaster*, la reducción en la expresión de PFK genera defectos musculares, incluyendo una disminución en la longitud del sarcómero, lo que sugiere que la deficiencia en PFK afecta el desarrollo y la estructura muscular (Lim, 2023).

Las mutaciones en PFK también están vinculadas al cáncer, ya que es una enzima clave que determina la velocidad de la glucólisis. La reprogramación metabólica del cáncer implica un aumento de la glucólisis aeróbica, como se describe en el efecto Warburg. Se ha reportado aumento en la expresión de PFK-1 en muchos tipos de cáncer (pulmón, cerebro, vejiga y colon), particularmente las isoformas PFK-L y PFK-P. En estos casos, se han encontrado tanto mutaciones que aumentan la actividad enzimática como otras que la disminuyen, sugiriendo una redirección hacia la vía de las pentosas fosfato. A diferencia de las mutaciones que dan lugar a deficiencia de la PFK-M, las asociadas al cáncer generan alteraciones específicas en la actividad, de aumento o disminución (Campos y Albrecht, 2023).

Caenorhabditis elegans

C. elegans es un nemátodo de vida libre que alcanza un tamaño de 1 mm de largo en su etapa adulta. Tiene un cuerpo cilíndrico no segmentado que se estrecha en los extremos, habita suelos ricos en materia orgánica en descomposición y se alimenta principalmente de bacterias. Se trata de un modelo animal ampliamente utilizado en diversas áreas de investigación. Dentro de las características que lo hacen un gran modelo se encuentra el hecho de que es un organismo eutélico, es decir que posee un número fijo y constante de células somáticas durante la adultez, con 959 células el hermafrodita y 1031 el macho. Tiene un pequeño tamaño corporal, es fácil de cultivar en el laboratorio y se puede criopreservar. Además, tiene un ciclo de vida corto, progenie numerosa, y al ser transparente posibilita la observación de procesos celulares *in vivo*. *C. elegans* fue el primer metazoario en tener su genoma completamente secuenciado, lo que ha potenciado su uso en genética y biología molecular (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Su ciclo de vida se completa en 3 días en condiciones óptimas (20°C) y está formado por una etapa embrionaria, cuatro estadios larvarios (L1, L2, L3 y L4), y la adultez. El desarrollo embrionario comienza dentro del útero, el embrión es depositado en el exterior en la etapa de la gastrulación y al finalizar la embriogénesis ocurre la eclosión de la larva L1. En presencia de alimento comienza el desarrollo postembrionario, y avanzan a través de mudas de la cutícula en los distintos estadios larvarios hasta convertirse en adultos reproductivamente activos (Altun y Hall, 2009a). Sin embargo, cuando en el ambiente hay baja cantidad de alimento y una alta densidad poblacional el embrión eclosiona y, las larvas L1 entran en el estadio L2d y a continuación en el estadio alternativo Dauer, en el que se detiene el desarrollo. Al entrar en esta vía se engrosa la cutícula y se reduce el volumen corporal del gusano, mientras exploran el entorno con comportamientos característicos hasta encontrar condiciones adecuadas para continuar el ciclo (Wolkow y Hall, 2015).

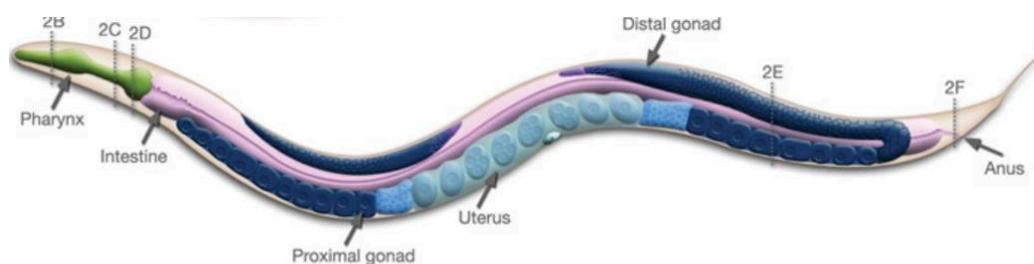


Figura 4. Anatomía del gusano *C. elegans* hermafrodita adulto. Dibujo esquemático de las estructuras anatómicas. Modificado de (Altun y Hall, 2009a).

Son organismos pseudocelomados, lo que implica que tienen una cavidad pseudocelómica. Esta se ubica rodeando el tubo interno, que contiene a la faringe, el intestino y la gónada (**Figura 4**). Hacia el exterior limita con el tubo externo que contiene la hipodermis y la cutícula, el sistema excretor, las neuronas y la musculatura. El fluido que llena la cavidad pseudocelómica baña los órganos internos protegiéndolos, y actúa como un esqueleto hidrostático que brinda soporte para la locomoción. Además, la cavidad cumple funciones de circulación y respiración, a través del fluido circulan gases que ingresan y salen por difusión a través de la cutícula, también nutrientes y señales de comunicación intercelular, que se desplazan por los movimientos del fluido debido al desplazamiento del gusano (Altun y Hall, 2009b).

Existen dos formas sexuales: hermafroditas autofecundables y machos. Los hermafroditas son protándricos, ya que en primer lugar producen espermatozoides en la etapa L4, y próximo a la adultez comienzan a producir ovocitos. Los machos sólo producen espermatozoides (Corsi et al., 2015).

La gónada hermafrodita se organiza en forma de dos brazos en U, dispuestos simétricamente rodeando el intestino (**Figura 5**) (Corsi et al., 2015). En el extremo de cada brazo se ubica la línea germinal, que contiene un sincitio donde hay células germinales mitóticas unidas a un raquis central y hacia la curvatura de la gónada hay células meióticas en distintas etapas (Lints y Hall, 2009a). Luego de la formación de los espermatozoides, éstos se acumulan en la espermateca. A continuación, los ovocitos van madurando y al pasar por la espermateca son fecundados por los espermatozoides que residen allí y luego los embriones pasan hacia el útero, la cámara que une los dos brazos de la gónada. En el útero, se desarrollan los huevos hasta la etapa de gástrula y son expulsados a través de la vulva, estructura ubicada en la línea media ventral del animal, produciendo alrededor de 300 huevos durante el ciclo de vida completo (Corsi et al., 2015).

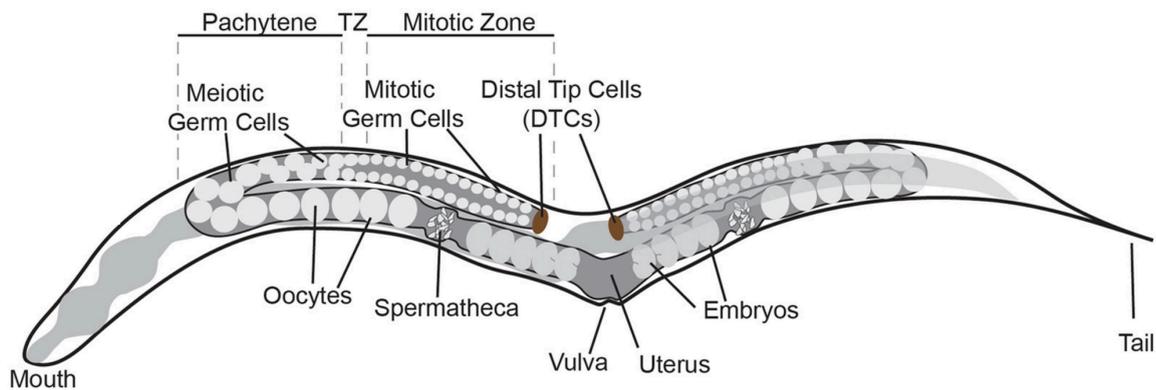


Figura 5. Representación de la gónada del gusano *C. elegans* hermafrodita adulto. Los dos brazos de la gónada tienen en su extremo distal células DTC que controlan la mitosis en la línea germinal. Al alcanzar la zona de transición (TZ), las células germinales avanzan a la meiosis. En el brazo proximal maduran a ovocitos, que luego son fertilizados en la espermateca, los embriones maduran en el útero y son expulsados a través de la vulva. Tomado de (Marchal y Tursun, 2021).

El hecho de que la línea germinal distal es un sincitio, en la investigación científica es aprovechado para la edición génica mediante microinyección de ADN, ya que el material inyectado allí se distribuye eficientemente en las células germinales que comparten el citoplasma y así se incorpora en los gametos (Evans, 2006). Ambos sexos son diploides para los cinco cromosomas autosómicos y se diferencian en los cromosomas sexuales, los hermafroditas tienen dos cromosomas X (genotipo XX) mientras que los machos tienen uno solo (genotipo X0) (Altun y Hall, 2009a).

Como modelo de investigación, la autofecundación de los hermafroditas es ventajosa en el mantenimiento de las cepas. Un solo animal da lugar a toda una población, y en homocigosis produce descendencia genéticamente idéntica. Además, al reducir la heterocigosidad en las generaciones sucesivas, es posible identificar rápidamente rasgos autosómicos recesivos (Corsi et al., 2015).

Si bien en las poblaciones naturales predominan los hermafroditas, se producen machos en baja frecuencia (0,1-0,2%) producto de errores en la disyunción meiótica de los cromosomas X. Sin embargo, es posible aumentar la frecuencia de machos en una población, por ejemplo estresando el organismo con calor y una vez generado un macho, se puede cruzar con un hermafrodita y así aumentar la proporción de machos en la población hasta un 50%. El cruce

de los dos sexos también es útil para la transferencia de mutaciones entre cepas (Corsi et al., 2015; Lints y Hall, 2009b). El dimorfismo sexual en machos está dado por la gónada de menor tamaño que presenta un único lóbulo en forma de U, y hace que tengan un cuerpo más delgado ya que no almacenan huevos. Es característico el engrosamiento que presentan en el extremo de la cola, allí se ubica el aparato copulador, que contiene una extensión de la cutícula en forma de abanico que recubre rayos sensoriales, y en la parte ventral de esta se ubica la cloaca asociada a sensilios, implicados en el comportamiento de apareamiento (**Figura 6**) (Lints y Hall, 2009b).

El sistema digestivo se extiende desde el estomodeo (cavidad bucal y faringe) hasta el

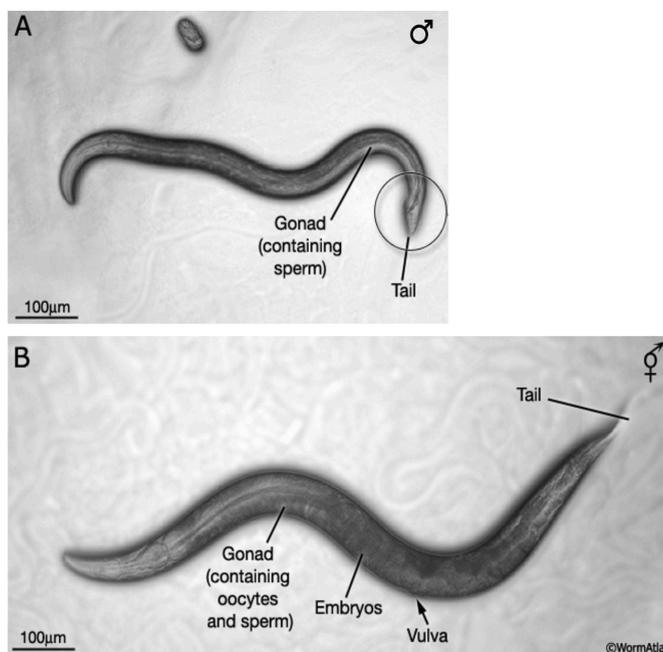


Figura 6. Micrografías ópticas de la anatomía del macho y el hermafrodita de *C. elegans*. A. Macho. B. Hermafrodita. Modificado de (Lints y Hall, 2009b).

proctodeo (recto y ano en hermafroditas o cloaca en machos). La faringe está compuesta por dos lóbulos musculares, cuya contracción posibilita la succión y el triturado del alimento, que luego pasa al intestino a través de una válvula. En el intestino, constituido por células epiteliales con microvellosidades apicales, ocurre la digestión, y los residuos son posteriormente eliminados por el proctodeo (**Figura 4**) (Altun y Hall, 2009c).

Sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso es el sistema más complejo de *C. elegans* y abarca un tercio de todas las células del animal. Se ha mapeado cada una de las 302 neuronas del hermafrodita y 381 del macho y las conexiones que estas establecen que conforman un conectoma invariable entre individuos (White et al., 1986). A pesar de su pequeño tamaño, este sistema comparte

características fundamentales a los de organismos más complejos, y eso lo ha convertido en un importante modelo para el estudio de preguntas neurobiológicas (Corsi et al., 2015).

El sistema nervioso del gusano se puede clasificar en dos partes. Por un lado, se encuentra el sistema nervioso somático que contiene la gran mayoría de las neuronas, y por otro el faríngeo, integrado únicamente por 20 neuronas. Estos sistemas son estructuralmente independientes, pero se conectan a través de interneuronas. Las neuronas somáticas se ubican entre la hipodermis y la musculatura corporal, mientras que las faríngeas se encuentran directamente entre los músculos faríngeos (Altun y Hall, 2010a).

En la cabeza se encuentra gran parte del sistema nervioso (**Figura 7A**). El anillo nervioso se dispone rodeando el istmo faríngeo y es el principal neuropilo del sistema. El neuropilo es un sitio crucial para la integración y procesamiento de la información, sobre este convergen los procesos neuronales y se establecen sinapsis. De forma adyacente se encuentran una gran cantidad de cuerpos celulares agrupados (formando el ganglio anterior), asociados a funciones sensoriales ya que en la cabeza se encuentra una gran cantidad de receptores sensoriales (Altun y Hall, 2010a; White et al., 1986).

Del anillo nervioso parte un conjunto de haces de procesos longitudinales que conectan con las neuronas motoras y con los cuatro ganglios pequeños de la cola. El haz principal es el cordón nervioso ventral, que va desde el anillo nervioso hasta la cola y contiene los cuerpos celulares y procesos de las neuronas motoras del circuito motor del cuerpo. También existe el cordón nervioso dorsal que se conecta con el ventral, para coordinar los movimientos, a través de comisuras circunferenciales (**Figura 7B**) (Altun y Hall, 2010a; Durbin, 1987).

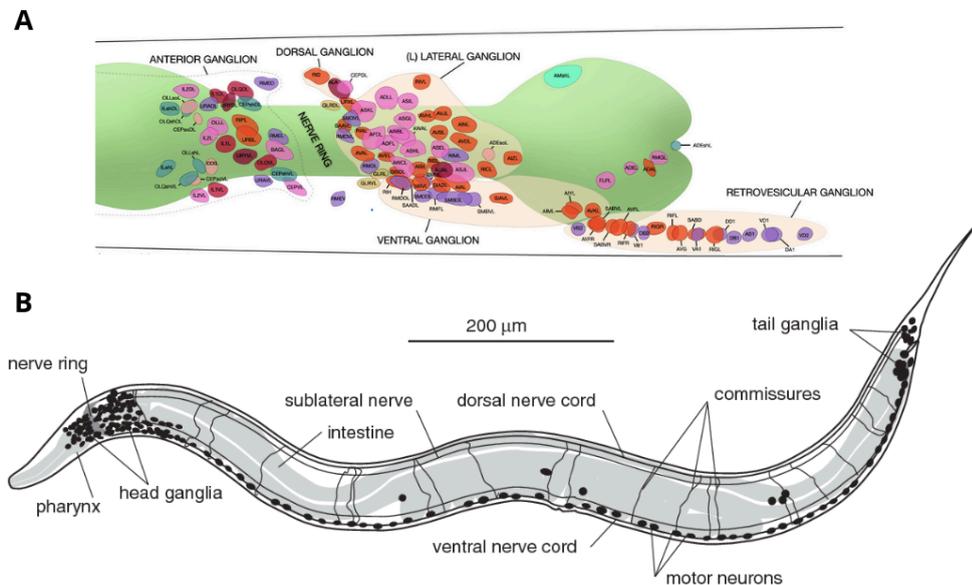


Figura 7. Sistema nervioso de *C. elegans* adulto. **A.** Magnificación sobre el sistema nervioso de la cabeza. El anillo nervioso se encuentra rodeando el istmo faríngeo y alrededor de este los ganglios donde se encuentran la mayoría de los somas neuronales. Modificado de (Altun y Hall, 2009d). **B.** Organización general del sistema nervioso. Se observan los ganglios cefálicos, los de la cola, el cordón nervioso ventral conectado al dorsal a través de las comisuras. No se muestran todos los haces axonales. En A y B los organismos se orientan con la región anterior hacia la izquierda y la región posterior hacia la derecha. Tomado de (Hobson et al., 2017).

Sistema quimiosensorial de *C. elegans*

A pesar de tener un sistema nervioso compacto, *C. elegans*, además de las funciones básicas como locomoción, búsqueda de alimento, alimentación y defecación, tiene comportamientos complejos. La detección de una amplia variedad de señales sensoriales, como temperatura, estímulos mecánicos, sustancias volátiles y solubles en agua, permiten que se dé quimiotaxis, evitación rápida, cambios en la motilidad, entrada y salida de la etapa Dauer, o detección de la presencia, densidad y sexo de nemátodos cercanos. La complejidad está dada porque gran parte de su sistema nervioso y más del 5% de sus genes están dedicados al reconocimiento de señales ambientales (Bargmann, 2006).

Estos comportamientos son regulados principalmente por sensilios que se encuentran concentrados en la cabeza y la cola de *C. elegans*. Los sensilios son órganos sensoriales epiteliales con disposición simétrica bilateral y radial, compuestos por dendritas de una o más

neuronas sensoriales rodeadas por un canal formado por una célula de soporte del tipo *sheath* y una o más del tipo *socket*. Cada una de estas neuronas presenta en el extremo de su dendrita una cilia primaria, que se exponen al ambiente directa o indirectamente a través de los sensilios. Los sensilios se clasifican en ánfidos, órganos labiales internos, externos, sensilios cefálicos y sensilios *deirid* anteriores, en la cabeza, y *deirid* posteriores y fásmidos en la parte posterior del organismo (**Figura 8**) (Altun y Hall, 2010b).

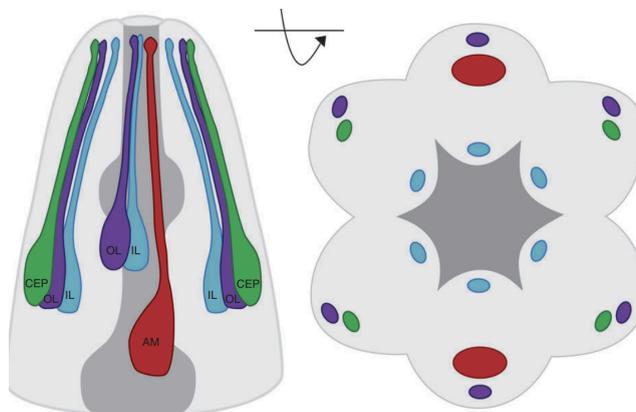


Figura 8. Sensilios de la cabeza de *C. elegans*. Esquema de la cabeza de *C. elegans* que muestra los cuatro sensilios principales en vistas longitudinal (izquierda) y transversal (derecha). (OL) labial externo (violeta); (CEP) cefálico (verde); (AM) ánfido (rojo); (IL) labial interno (celeste). Tomado de (Mizeracka y Heiman, 2015).

Cada una de las neuronas de estos órganos expresa un conjunto específico de genes de receptores sensoriales y detecta

un conjunto característico de estímulos. Las preferencias quimiosensoriales pueden ser modificadas por adaptación sensorial, historia del desarrollo y aprendizaje asociativo, permitiendo que *C. elegans* integre contexto y experiencia en su comportamiento (Altun y Hall, 2010; Bargmann, 2006). A pesar de que las neuronas sensoriales de ánfidos y fásmidos pertenecen a pares bilateralmente simétricos, son estructuralmente similares en la morfología de la cilia, el axón y en las sinapsis que establecen, suelen ser funcionalmente distintos en la detección de estímulos (Bargmann, 2006).

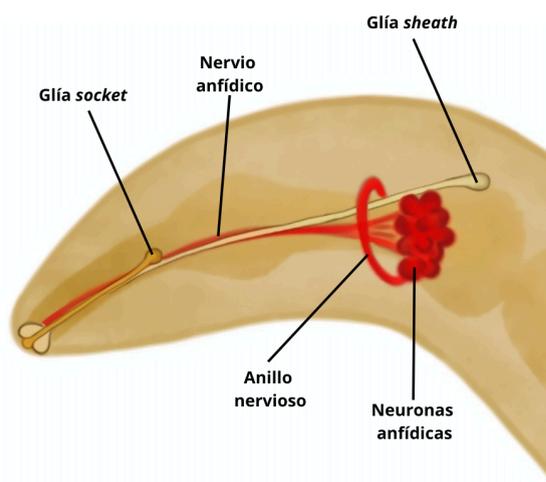


Figura 9. Ánfido de *C. elegans*. Se representa uno de los dos ánfidos de la cabeza de *C. elegans* en vista lateral. En rojo se marcan las 12 neuronas anfídicas, cuyos somas se ubican de forma anterior al bulbo de la faringe y sus dendritas se dirigen hacia la apertura del sensilio, todas rodeadas en la punta por una única glía *socket* y una *sheath*.

Ánfidos

Los ánfidos son los órganos quimiosensoriales principales de *C. elegans* (**Figura 9**). Se ubican lateralmente en la cabeza y los somas de

las neuronas que los integran se ubican en la región anterior al bulbo faríngeo. Sus axones se asocian al anillo nervioso y las dendritas se extienden hacia el extremo anterior del animal, donde terminan en cilias con diversas morfologías que se abren al exterior a los lados de los labios (Altun y Hall, 2010b; Inglis et al., 2007). Cada uno de los dos anfidos está formado por 12 neuronas sensoriales ciliadas (ADF, ADL, AFD, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK, AWA, AWB, AWC), cuya nomenclatura está asociada a la estructura de sus cilias: *single* (S), *wing* (W), *dual* (D), *finger like* (F). Los anfidos también están formados por una célula de soporte *sheath* y una *socket* (Altun y Hall, 2010).

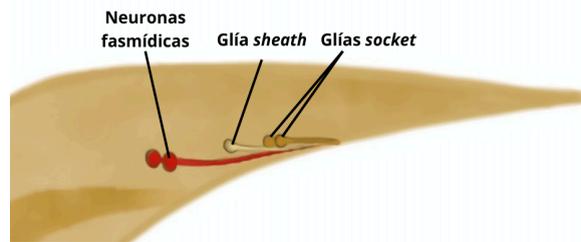


Figura 10 Fásmido de *C. elegans*. Se representa el fásmido del lado derecho de la cola de *C. elegans* en vista lateral. En rojo se marcan las neuronas fasmídicas, que se ubican detrás del recto y sus dendritas se dirigen hacia la apertura del sensilio, rodeadas en la punta por dos glías *socket* y una *sheath*.

Fásmidos

Los fásmidos se encuentran en los lados laterales de la cola, detrás del recto (**Figura 10**). Están compuestos por una célula *sheath*, dos células *socket* y las dendritas ciliadas de las neuronas PHA, PHB y PQR, esta última se encuentra solo en el lado izquierdo. Las cilias de las neuronas PHA y PHB se extienden hacia el medio externo a través del poro creado por las células *socket* en cada lado y están implicadas en la modulación del comportamiento de quimiorrepulsión. Por su parte, la punta de la dendrita de la neurona PQR está envuelta dentro de la célula denominada PHso2L y funciona como un mecanorreceptor. Los somas de estas neuronas están ubicados en los ganglios lumbares (Altun y Hall, 2010b).

Células de soporte-glías

Las terminaciones de las neuronas sensoriales están encerradas dentro de un ambiente protegido por las células epiteliales especializadas *sheath* y *socket* (**Figura 11**). Estas se encuentran estrechamente asociadas con las terminaciones ciliadas de las neuronas y forman en conjunto el canal anfídico (Altun y Hall, 2010b). Las terminaciones de las neuronas y las

células de soporte en cada órgano sensorial anfídico se van entrelazando a medida que se proyectan hacia el labio por el que se exponen al ambiente (Doroquez et al., 2014).

Las células *socket* tienen proyecciones citoplasmáticas que envuelven las regiones más distales de las cilias, creando un poro a través del cual las cilias pueden extenderse hacia la cutícula y, en algunos casos, hacia el exterior del animal (Altun y Hall, 2010b). Además, contienen vesículas en su citoplasma, y secretan cutícula que recubre la abertura externa de algunos sensilios. Cada célula *socket* envuelve la región más distal de la cilia conectándose consigo misma. Adicionalmente, establece conexiones con la hipodermis y con las células *sheath* próximas (Doroquez et al., 2014). Están involucradas en la navegación de las dendritas sensoriales hacia órganos sensoriales específicos, el cuerpo celular de estas es más pequeño y se ubican más cerca de los órganos sensoriales que las *sheath* (Altun y Hall, 2010b).

Los procesos de las células *sheath* rodean la región distal de la dendrita y proximal de la cilia. Establecen uniones con la base de la cilia y sus procesos están conectados a los procesos de las células *socket*. En su citoplasma tienen grandes cisternas de Golgi y vesículas electrondensas cargadas de matriz extracelular, que son secretadas hacia el lumen extracelular (Doroquez et al., 2014). En las terminaciones anfídicas el espacio extracelular por el que transcurren las cilias es muy pronunciado y se estrecha en el canal anfídico, que conecta las cilias con el ambiente a través de la célula *socket*. Las células *sheath* pueden ser muy grandes, en los ánfidos cada una encierra 12 cilias (Altun y Hall, 2010).

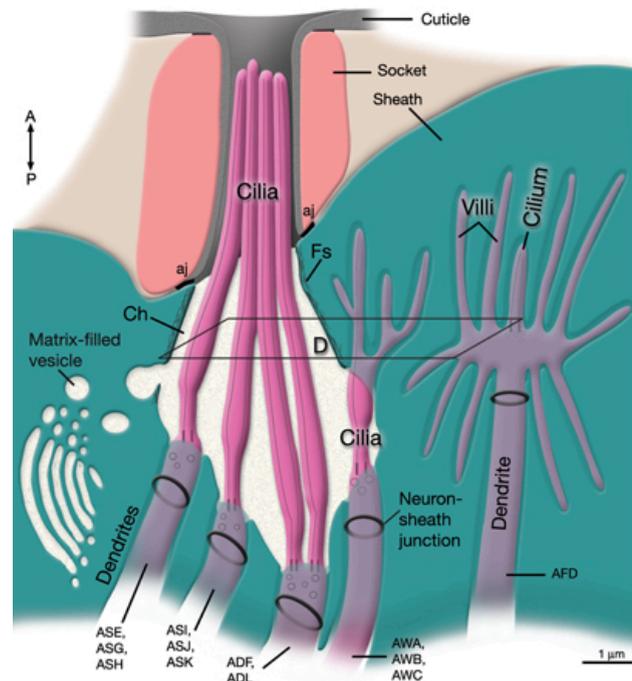


Figura 11. Vista longitudinal de la apertura de un ánfido. Se representa la organización de las terminaciones ciliadas de neuronas sensoriales anfídicas y su interacción con las células de soporte *sheath* y *socket*, que forman el canal anfídico (Ch). Las dendritas sensoriales penetran en la célula *sheath*, y las cilias de ocho neuronas (ADF, ADL, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK) se extienden a través del canal anfídico hacia el exterior. Las cilias de AWA, AWB y AWC terminan en sacos intracelulares dentro de la célula *sheath*, mientras que la neurona AFD termina en una estructura con vellosidades incrustada en la célula *sheath*. La célula *socket* envuelve la región distal de las cilias y secreta cutícula, creando un poro que conecta con el ambiente externo. La *sheath* rodea la región distal de la dendrita y proximal de la cilia, y genera vesículas cargadas de matriz dirigidas hacia el canal. A: anterior, P: posterior. Tomado de (Altun y Hall, 2010b).

Las dendritas sensoriales de 11 neuronas anfídicas, excepto las de AFD, penetran en forma agrupada la célula *sheath*, y luego entran en el canal anfídico. Las cilias de 8 de estas neuronas (ADF, ADL, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK) se extienden por el poro que forma la célula *socket* y se exponen directamente al medio externo, con roles en la quimiotaxis, mecanosensación, osmotaxis y detección de feromonas de Dauer. Las cilias de AWA, AWB y AWC, entran al canal anfídico pero se desvían y se ramifican terminando en sacos ciegos dentro de la célula *sheath*, donde sensan sustancias volátiles (Oikonomou y Shaham, 2011). La dendrita de la neurona termorreceptora AFD está totalmente incrustada en la célula *sheath* y termina en un cilio con muchas vellosidades (Altun y Hall, 2010).

Cilia primaria

La cilia primaria es un organelo celular alargado que sobresale de la superficie celular de organismos eucariotas unicelulares hasta vertebrados. Forma un compartimento con una gran superficie de membrana, donde se concentran receptores y componentes de señalización, que la hacen muy eficiente en la transducción de señales ambientales físicas y químicas, y señales del desarrollo (Johnson y Leroux, 2010). Además, tienen función secretora al liberar vesículas extracelulares implicadas en la comunicación intercelular, mecanismo clave en *C. elegans* para la comunicación entre organismos, particularmente en comportamientos de apareamiento (Wang et al., 2014).

Se infiere que el eucariota primordial poseía en su superficie una o dos cilias, utilizadas para la detección del entorno y la locomoción. Estos organelos se propagaron a lo largo de la evolución en la mayoría de los organismos eucariotas actuales. Existen dos tipos de cilias, que comparten principios de su funcionamiento como consecuencia de su origen común, la cilia primaria (no móvil) ya mencionada, y la cilia móvil. Esta última tiene la capacidad de generar batido ciliar que propulsa los fluidos para generar flujo a través de las superficies celulares, así como también posibilita el movimiento de organismos eucariotas unicelulares y larvas de invertebrados (Quarmby y Leroux, 2010).

Importancia del organelo para la salud humana

Debido a su presencia en la mayoría de los tipos celulares de vertebrados y a su rol crucial en los procesos de señalización sensorial, las cilias primarias son esenciales para la viabilidad de los organismos, y la alteración de sus funciones afecta numerosos procesos fisiológicos. Las ciliopatías constituyen un diverso grupo de trastornos del desarrollo y degenerativos, dentro de los que se encuentran el síndrome de Bardet-Biedl, el síndrome de Meckel y el síndrome de Joubert. Se caracterizan por diversas afecciones clínicas que incluyen obesidad, degeneración de la retina, enfermedad renal poliquística, anomalías esqueléticas, defectos en la lateralidad de los órganos, discapacidad sensorial y malformaciones cerebrales (Hildebrandt et al., 2011).

Debido a la importancia de este organelo en la salud humana y la conservación evolutiva de su estructura, se han generado aportes para entender la biología de la cilia y modelar enfermedades humanas a partir del estudio en organismos filogenéticamente diversos, como *C. elegans*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis* y *Mus musculus* (Fry et al., 2014).

Estructura de la cilia primaria

Dentro de la cilia se encuentra el axonema, conformado por nueve pares de microtúbulos externos (o dobletes); en *C. elegans* hay además microtúbulos únicos centrales en número variable (**Figura 12**). Los filamentos de cada par están fusionados lateralmente: uno completo formado por trece protofilamentos y uno incompleto, con diez protofilamentos (Doroquez et al., 2014).

Los microtúbulos del axonema se extienden desde un cuerpo basal, derivado de un centriolo maduro ubicado justo debajo de la superficie celular. A medida que los microtúbulos crecen, empujan la membrana plasmática, dando origen a la cilia (Fry et al., 2014).

Entre el cuerpo basal y el axonema se encuentra la zona de transición (ZT); subcompartimento que actúa como barrera de difusión al regular el tráfico de proteínas y lípidos hacia y desde la cilia. La ZT está estructurada por fibras en forma de Y (*Y-links*), que conectan los microtúbulos externos a la membrana ciliar (Blacque y Sanders, 2014). Además, la cilia en esta región se vuelve más estrecha debido a estructuras internas que organizan de forma compacta los microtúbulos, lo que podría conferir rigidez mecánica a la base de la cilia. En *C. elegans*, esta estructura conocida como anillo apical, se ubica en la cara interna de los microtúbulos externos (**Figura 12**) (Mercey et al., 2024).

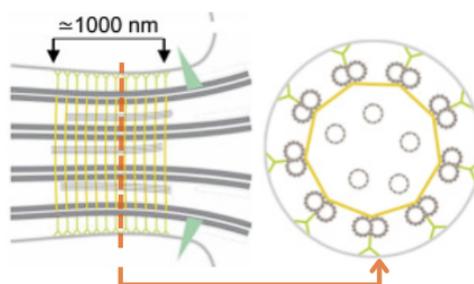


Figura 12. Estructura de la ZT de *C. elegans*. Representación esquemática de una sección longitudinal y una transversal de la ZT. En la sección transversal se ven los nueve pares de dobletes externos asociados a la membrana ciliar a través de las *Y-links* (verde) y conectados hacia el interior por el anillo apical (amarillo), que tiene un tamaño de 1000 nm. También se observan los microtúbulos simples internos. Modificado de (Mercey et al., 2024).

Dado que la cilia carece de maquinaria traduccional, depende de mecanismos de transporte activo para conformar su proteoma y lipidoma. Estos componentes son transportados mediante rutas de transporte vesicular desde el aparato de Golgi o el endosoma de reciclaje hacia la base ciliar. Allí, las vesículas se fusionan con la membrana y el contenido atraviesa la barrera de difusión. Una vez en el axonema, las moléculas son desplazadas a lo largo de los microtúbulos por el sistema de transporte intraflagelar (IFT) (Long y Huang, 2020).

A partir de la zona de transición, los microtúbulos crecen hacia el extremo del axonema, formando el segmento medio. Hacia el segmento distal del axonema solo se encuentran extendidos los filamentos completos, ya que los incompletos se sueltan en el segmento medio y se curvan formando estructuras con forma de gancho (Doroquez et al., 2014).

Particularidades de la cilia en *C. elegans*

En *C. elegans* el *core* del cuerpo basal degenera durante el desarrollo del organismo, y no está presente en la cilia madura (Nechipurenko y Sengupta, 2017). Como resultado, los microtúbulos no están anclados en esa base, por lo que adoptan una disposición abierta en lugar de la típica estructura cilíndrica (**Figura 13**), extendiéndose dentro del compartimento de la membrana periciliar (PCMC) (Doroquez et al., 2014).

El PCMC es un ensanchamiento con forma de bulbo de la punta distal de la dendrita, desde donde protruye la cilia, y está delimitado en su lado proximal por una unión adherente en forma de cinturón entre la neurona sensorial y la célula de soporte *sheath* que la envuelve (**Figura 13**). Por su composición se trata de un subcompartimento ciliar auxiliar, ya que está enriquecido en proteínas ciliares asociadas a la señalización sensorial y el transporte en las cilia (Blacque y Sanders, 2014). Es una zona activa de endocitosis y exocitosis, y el equilibrio entre estos procesos regula la homeostasis estructural y funcional de la cilia (Olivier-Mason et al., 2013). Actúa como un centro de tráfico para el transporte y clasificación de proteínas que ingresan y salen de la cilia, similar a lo que se ha descrito en los bolsillos ciliar y flagelar, de protistas y mamíferos (Blacque y Sanders, 2014). Estos bolsillos son invaginaciones de la membrana periciliar en las que se anclan las cilia, especializados en el tráfico de vesículas (**Figura 13**) (Benmerah, 2013).

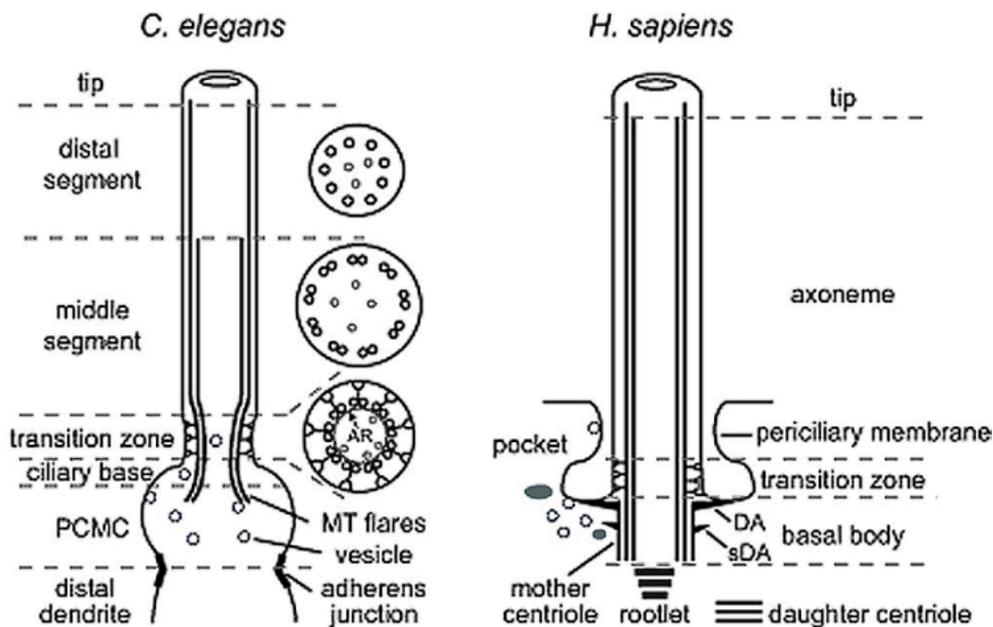


Figura 13. Estructura de los subcompartimentos de las cilias. Izquierda: cilia anfídica de *C. elegans*. Los microtúbulos (MT) se extienden sobre el cuerpo basal degenerado en la base ciliar y se expanden hacia el compartimento de la membrana periciliar (PCMC). El PCMC está limitado en su lado proximal por una unión adherente entre la neurona y la célula de soporte adyacente no representada. Una zona de transición (TZ) ciliar de $\sim 0.8 \mu\text{m}$ de largo emerge desde la base ciliar, contiene 9 pares de microtúbulos estrechamente unidos a través del anillo apical (ver sección transversal), con cada doblete conectado a la membrana ciliar mediante *Y-links*. También están presentes los microtúbulos únicos internos. La TZ es seguida por un segmento medio de $\sim 4 \mu\text{m}$ de largo formado por 9 dobletes, después los filamentos incompletos se sueltan y continúan los filamentos completos en el segmento distal de $\sim 3 \mu\text{m}$ de largo. Derecha: cilia primaria humana canónica. Se representa el cuerpo basal y los apéndices asociados; distal (DA) y subdistal (sDA), la zona de transición y los compartimentos axonémicos. Se representa a la cilia anclada en un bolsillo ciliar; una invaginación de la membrana periciliar observada en algunos subtipos de cilias. Modificado de (Blacque y Sanders, 2014).

Fenotipo *dye-filling* (Dyf)

La cilia en *C. elegans* se encuentra únicamente en 60 neuronas sensoriales compartidas entre sexos y en 52 específicas de machos (**Figura 14**) (Inglis et al., 2007). Existe una manera de estudiar la integridad estructural de algunas de estas cilias evaluando la absorción de tintas fluorescentes, como el fluorocromo derivado de la fluoresceína FITC, y los marcadores lipofílicos DiO y DiI que tiñen las neuronas por difusión lateral en la membrana plasmática (Thermo Fisher Scientific, s.f.). Estas tinciones ingresan a las células a través de sus terminaciones ciliadas expuestas al ambiente, en el caso de los ánfidos marcan las neuronas

ASI, ADL, ASK, AWB, ASH y ASJ y en los fásmidos PHA y PHB. Varios mutantes que tienen la cilia afectada o las células *socket* y *sheath* alteradas, presentan fenotipo *dye-filling* (Dyf) anormal. Sin embargo, también existen alteraciones en la cilia que no afectan el fenotipo Dyf (Inglis et al., 2007).

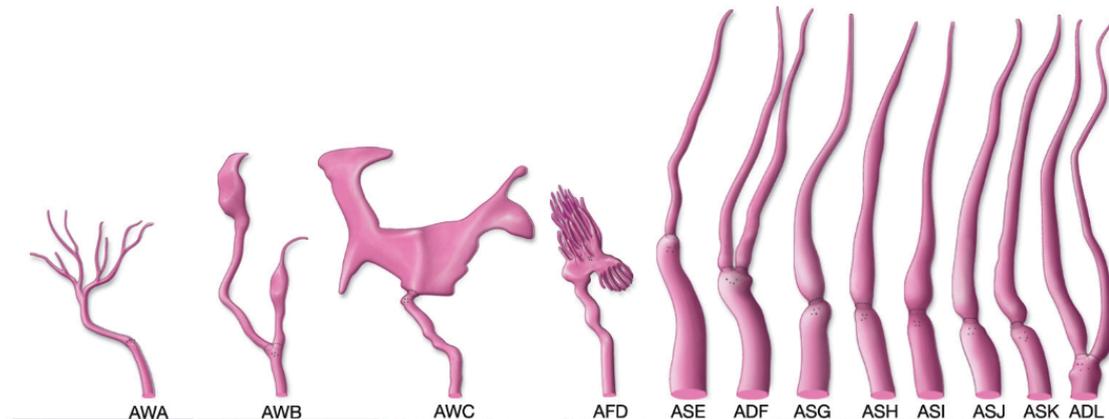


Figura 14. Cilias del ánfido de *C. elegans*. La mayoría de las cilias tienen una forma similar, con uno o dos cilindros alargados *finger-like*. Dentro de las cilias *wing* (AWA, AWB, AWC), AWC adopta una estructura amplia, mientras que AWA y AWB son más pequeñas, AWA tiene forma arborizada en su extremo distal y AWB tiene dos terminaciones ciliosas que se vuelven irregulares y aplanadas en su extremo distal. La dendrita de AFD termina en una estructura *brush-like* con vellosidades rodeando una única cilia. Modificado de (Altun y Hall, 2010b).

Metabolismo de la cilia primaria

La mayoría de los organelos celulares en eucariotas son de localización intracelular y el ATP que estos requieren para su funcionamiento lo obtienen de la gran disponibilidad que hay en el citosol. Hay un grupo de organelos de forma cilíndrica alargada que se encuentran en células altamente especializadas, dentro de los que se encuentran las cilias móviles e inmóviles y microvellosidades. Estos requieren de un elevado abastecimiento energético para llevar a cabo sus funciones, que no es satisfecho de la misma manera que ocurre en otros organelos (Villar et al., 2020).

En relación a la fuente que provee de energía a la cilia primaria, lo más descrito es que existen mitocondrias próximas a su base que son responsables de la síntesis del ATP (Fluegge et al. 2012; Moruzzi et al. 2022), pero esta vía podría ser ineficiente para abastecer a toda su

longitud. Se ha demostrado en cilia olfatorias de mamíferos que usan una combinación de estrategias para obtener el ATP necesario para la quimiotransducción (**Figura 15**). Por un lado, generan ATP en el *knob* de la dendrita (en la base de la cilia) por fosforilación oxidativa, que luego ingresa a la cilia a través de ATP-*shuttles* (Acevedo et al., 2019). Por otro lado, se ha encontrado que en su superficie las cilia tienen transportadores que ingresan glucosa desde la mucosa olfatoria, y una vez en su interior es catabolizada a través de la glucólisis para producir más ATP y abastecer el extremo apical (Villar et al., 2020).

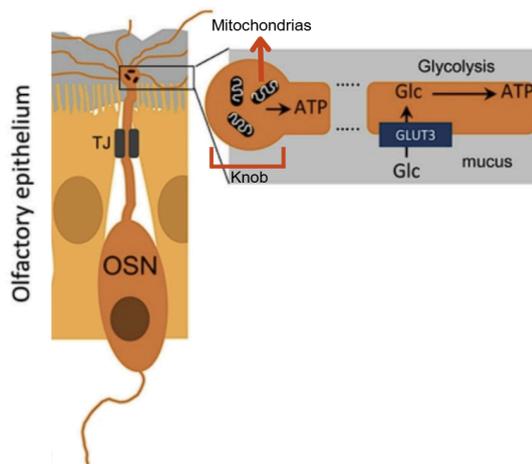


Figura 15. Utilización de glucosa por la cilia olfatoria de mamíferos. En el moco que se ubica encima del epitelio olfatorio hay glucosa, que es transportada hacia cilia a través de transportadores (GLUT3), donde se metaboliza por glucólisis, generando ATP. Las mitocondrias contenidas en el *knob* dendrítico también proporcionan ATP a las cilia, mediante fosforilación oxidativa. Modificado de (Villar et al., 2017).

Como se mencionó en el apartado de metabolón glucolítico, en el axón de neuronas motoras de *C. elegans*, la fuente de energía de las sinapsis en condiciones de alto requerimiento energético es la glucólisis aeróbica, con la formación del metabolón, incluso en presencia de mitocondrias.

Teniendo en cuenta lo observado en las cilia olfatorias de mamíferos y en la sinapsis de motoneuronas de *C. elegans*, surge la pregunta de si la cantidad y velocidad de difusión del ATP desde la base de la cilia hasta el extremo apical cubre todos sus requerimientos energéticos. En este contexto, la hipótesis de este trabajo es que en la cilia primaria de *C. elegans* ocurre glucólisis.

A su vez, este estudio se enmarca en un proyecto más amplio que plantea investigar si, en caso de confirmarse glucólisis en la cilia primaria, se forma un metabolón glucolítico constitutivo o inducido en condiciones de alto requerimiento energético o falta de oxígeno.

Objetivo

Objetivo General

Determinar la existencia de glucólisis en la cilia primaria de *C. elegans* mediante el estudio de la localización subcelular de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa-1 y de fenotipos morfológicos en mutantes en el gen que codifica para dicha enzima.

Objetivos específicos

- Determinación de localización subcelular de la enzima fosfofructoquinasa-1 en neuronas ciliadas de *C. elegans*.
- Determinación de integridad estructural de un conjunto de cilias en el organismo mutante en el gen que codifica para la fosfofructoquinasa-1 (*pfk-1.1*), mediante tinción con el compuesto DiI.

Metodología

Estirpes de *C. elegans*

Tabla 1: Estirpes empleadas en el trabajo.

Estirpe	Genotipo	Característica
N2		Estirpe silvestre, aislado en Bristol
DCR3791	<i>pfk-1.1(ola72)</i>	Enzima PFK-1.1 con disminución en su funcionalidad: Sustitución aminoacídica (Cys → Tyr próxima a sitio de unión al activador alostérico principal)
MX23	<i>dpy-5(e907); nxEx23[dpy-5(+); bbs-1::gfp]</i>	Marcador ciliar: Expresa <i>bbs-1::gfp</i>
IH42	<i>Ex[rol-6(su1006);Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]</i>	Localización de la enzima glucolítica PFK-1.1 en neuronas ciliadas: Expresa <i>pfk-1.1::mScarlet</i> y <i>rol-6(su1006)</i>
IH45	<i>dpy-5(e907)/+; Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1:: mScarlet;dpy-5(+); bbs-1::gfp]</i> (F1)	Localización de la enzima PFK-1.1 en neuronas ciliadas y marcador ciliar: Expresa <i>bbs-1::gfp</i> , <i>pfk-1.1::mScarlet</i> y <i>rol-6(su1006)</i>

Mantenimiento de estirpes

Medios y soluciones utilizados para el trabajo con *C. elegans*

Tabla 2: Componentes de los medios y soluciones empleadas.

Medio de cultivo o solución	Componentes
Solución de congelado 2X	5,85 g/L NaCl, 6,8 g/L KH ₂ PO ₄ , 300 g/L glicerol, NaOH 5,6 mM, MgSO ₄ 0,3 mM
Buffer M9	3 g/L KH ₂ PO ₄ , 6 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0,5g/L NaCl, H ₂ O c.s.p.
Medio <i>Nematode Growth Medium</i> (NGM)	3 g/L NaCl, 2,5 g/L peptona, 17 g/L agar, 5 µg/L colesterol, MgSO ₄ 1 mM, CaCl ₂ 1 mM, KPO ₄ 0,025 M, pH 6 (108,3 g/L KH ₂ PO ₄ y 35,6 g/L K ₂ HPO ₄)
Solución de <i>Bleaching o de limpieza</i>	1 vol. NaOH 5 M, 1,5 vol. NaOCl 40%, 2,5 vol. H ₂ O
Cultivo de <i>E. coli</i>	Medio LB: triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%
Buffer de lisis	KCl 50 mM, Tris pH 8.2 10 mM, MgCl ₂ x6 H ₂ O 2,5 mM, Tritón X-100 0,45%, Tween 0,45%, gelatina 0,01%, H ₂ O c.s.p.
Levamisol 4 mM	
Azida de sodio 0,1 M	

Cultivo de *C. elegans*

Las estirpes (**Tabla 1**) fueron mantenidas en medio *Nematode Growth Medium* (NGM) agar (composición en **Tabla 2**) en placas de Petri de 5 cm con un césped de la cepa de *E. coli* OP50 como fuente de alimento, incubadas a 20°C. La bacteria *E. coli* OP50 presenta auxotrofia por uracilo; dado que el medio NGM presenta una cantidad limitada de este nutriente, se limita el crecimiento del césped de bacterias (Stiernagle, 2006).

Congelado de estirpes de *C. elegans*

Para congelar las estirpes, los gusanos se crecieron en una placa de Petri de 9 cm y cuando se acabó el alimento y predominaron los estadios L1-L2, se recuperaron con 2 mL de buffer M9 (composición en **Tabla 2**) en un tubo de 15 mL. A la suspensión de gusanos se le agregó un volumen igual de solución de congelado 2X (composición en **Tabla 2**) y se mezcló con vortex. Se almacenaron en alícuotas de 1 mL en criotubos que se colocaron en un recipiente de espuma plast a -80°C para congelarlos progresivamente. Luego de 15 días se descongeló uno de los tubos, colocando su contenido en una placa de NGM con alimento y se monitoreó durante una semana para evaluar si el proceso de congelado fue correcto. El resto de los tubos se mantienen a -80 °C en las cajas de almacenamiento de estirpe hasta su uso.

Limpieza de gusanos contaminados

La limpieza de gusanos contaminados por hongos o bacterias distintas a *E. coli* OP50, se realizó tratando a gusanos hermafroditas adultos grávidos con la solución de *bleaching* (composición en **Tabla 2**). Esta solución elimina la contaminación y degrada a los nemátodos de cualquier estadio larvario y adultos, únicamente sobreviven los embriones protegidos por su envoltura.

Alternativamente, si no era posible usar la solución de *bleaching* por algún motivo, una manera de disminuir la contaminación que se utilizó fue pasar alrededor de 20 gusanos de a uno a la vez a una nueva placa NGM con alimento y luego de 30 min se repitió el procedimiento con esos mismos 20 gusanos a una nueva placa, un total de 6 veces.

Confirmación de genotipo de estirpes de gusanos mediante PCR y secuenciación

Para confirmar el genotipo de las estirpes N2 y DCR3791 se realizaron PCRs, utilizando como molde ADN genómico de un conjunto de gusanos de cada estirpe.

Para la extracción del ADN genómico, se colocaron 25 gusanos en 25 µL de buffer de lisis (composición en **Tabla 2**) con proteinasa K (20 mg/mL) en un tubo de PCR. Se incubaron

durante 15 min a -80°C y luego se expusieron 1 hora a 65°C, y 15 min a 95°C. El ADN se conservó a -20°C. Se utilizó 1 µL de la reacción para la realización de la PCR.

Las condiciones utilizadas para las PCRs se describen en las **Tablas 3 y 4**. Se diseñaron cebadores para la amplificación de una secuencia de 430 pb, dentro de la cual se encuentra la posición nucleotídica que es sustituida en la estirpe mutante DCR3791 (cambio de una guanina por una adenina en la posición 1685 del marco abierto de lectura). Las secuencias de los cebadores utilizados fueron la siguientes: *Forward primer*: 5' ACTATGCCTCAACTTGCTGC 3' que se encuentra a 151 pb *upstream* de la mutación y *Reverse primer*: 5' TGAACGGTGAATGGCTCTTC 3' a 258 pb *downstream* (**Figura 16**). El amplicón generado fue secuenciado para confirmar el genotipo.

GGGACTTGCCAATGGGTCATTCAAACAGTTCAAGTGGTCCGATGTTACTAACTGGGCAATGAACGGAGGATC
 GTTCCTTGGCACACAGAAAAGTCTTCCAACCTGAGAAAACTATGCCTCAACTTGCTGCCTCAACTGAAGAAGCA
 CAATATCAAGCGTTATTGCTTGTGGAGGATTTGAAGCGTATCACAGCACAATAATTCTTGCTGAAAATCG
 CGAAAAGTATCCCGAGTTTGCATTCCAATGTGTGCATCCCATCACCATCTCGAACAATGTTCCAGgttt
 gtttttcattatataaggtttttaacaatacatttctaatttttagGAACTATGGTGTCTCTCGGATCCGAT
 ACCGCGATCAATGAGATTTGCCAGATGATCGACAAAATCAAGCAATCTGCCACTGGTACCAAGAGAAGAGTT
 TTCATTGTCGAAACAATGGGAGGATACTGTGGTTACCTTGCCACTCTTCTGCGTTGAGCTCCGGTGCCGAT
 AATGCGTACATTTTTGAAGGCCATTCACCGTTTCAGACCTCTCCGATGATGTTGATGTGATTCTCTCAAAG
 ATGGAAGTTGGAGCGAAACGCTACTTGGTTGTCAGAAATGAGTGGGCCGACAAGAACCTCACCACAGATTTT

Figura 16. En colores se resaltan los cebadores diseñados para amplificar la región genómica de interés, en rojo la posición de sustitución en DCR3791.

Tabla 3: Reactivos utilizados para la PCR y sus respectivas concentraciones.

Compuesto	Concentración final por reacción (20 µL)
H ₂ O	Cantidad suficiente para 20 µL
Buffer 10X	1X
dNTPs	200 µM c/u
Forward primer	0,5 µM
Reverse primer	0,5 µM
DMSO	3%
Phusion™ High-Fidelity ADN polimerasa	0,02 U/µL
Molde de ADN	1 µL

Tabla 4: Programa de termociclador

Etapa	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C, 30 s	1
Desnaturalización Hibridación Extensión	98°C, 10 s 58°C, 30 s 72°C, 15 s	35
Extensión final	72°C, 10 min 4°C, 10 min	1

Visualización de productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa, purificación de ADN de gel y cuantificación de ADN

El producto de la amplificación por PCR de cuatro reacciones para cada estirpe, se visualizó en un gel de agarosa 1%, utilizando el agente intercalante bromuro de etidio, y como marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*.

La purificación del ADN de gel de agarosa se realizó utilizando el kit de Wizard®, y el ADN purificado se almacenó a -20°C.

La concentración del ADN purificado se cuantificó por absorbancia utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX+.

Secuenciación

La secuenciación de los amplicones generados con la estirpe silvestre y con la estirpe mutante se realizó con el método Sanger, realizado por la empresa Macrogen.

Tinción con DiI

Para la tinción de las neuronas anfídicas (ASI, ADL, ASK, AWB, ASH y ASJ) y fasmídicas (PHA y PHB) se utilizó el compuesto fluorescente DiI (1,1'-Dioctadecil-3,3,3',3'-Tetrametilindocarbocianina Perclorato). Dicho compuesto tiene un

máximo de excitación a la longitud de onda de 550 nm y emite fluorescencia con un pico máximo a 580 nm.

Inicialmente los gusanos de cada estirpe fueron cosechados de una placa enriquecida en adultos con 1 mL de buffer M9, se colocaron en tubos de centrifuga de 1,5 mL y se realizaron dos lavados. Para cada lavado los tubos con gusanos en 1 mL de buffer se centrifugaron a 300 g durante 30 s y se retiró el sobrenadante. Luego se resuspendieron nuevamente en 1 mL de M9 y se repitió el procedimiento. Luego, se incubaron en una solución de DiI 0,6 ng/ μ L, durante 2 h en agitador. Al finalizar la incubación con el colorante, se realizaron cuatro lavados siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Preparación de las muestras para la observación al microscopio

El montaje de los gusanos para su observación en el microscopio, se realizó preparando una solución de agarosa 3% en agua, de la cual se depositó una gota (aproximadamente 25 μ L) sobre un portaobjeto y rápidamente se aplastó con otro portaobjeto para formar una fina capa de agarosa, conocido con el nombre de *pad*. En el ensayo de evaluación de la integridad de la cilia se colocó sobre el *pad* una gota de 5 μ L de azida de sodio 0,1 M para anestesiarse a los gusanos. Para la inmovilización de los gusanos se ha reportado que 20 mM de azida y 1 mM de levamisol permiten inmovilizar y recuperar los gusanos incubados (Manjarrez y Mailler, 2020). Sin embargo, durante la puesta a punto de los experimentos de localización subcelular de PFK-1.1, se evaluaron distintas condiciones de inmovilización que se reportan en este trabajo: levamisol (4 mM) y azida de sodio (0,5 mM y 25 mM). Para cada estirpe, los gusanos se colocaron sobre un *pad* y se cubrieron con un cubreobjetos.

Observación por microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal

La visualización de la tinción con DiI de gusanos, se realizó utilizando el microscopio de epifluorescencia Olympus IX81, con la cámara Hamamatsu ORCA ER, y las imágenes fueron capturadas con el programa 4.17 micro-manager (Edelstein et al. 2014). Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 60x/1.25 NA. Dados los máximos de excitación y emisión del DiI, se empleó el filtro dicróico U-MWIG3 (excitación 530-550 nm / emisión 570 nm). Para obtener imágenes de los cuerpos celulares de las neuronas ubicadas en distintos planos, se adquirieron *Z-stacks* con un intervalo de 0,4 μ m entre planos, abarcando una profundidad de 27 μ m para

los ánfidos y 16 μm para los fásmidos. El procesamiento de las imágenes se realizó con el programa FIJI (Schindelin et al., 2012). Se seleccionaron las mejores imágenes de los *Z-stack* de la cabeza y la cola de los gusanos, se procesó cada una ajustando el brillo y el contraste para corregir el fondo y la saturación de la imagen. Para mejorar la visualización de la neurona ASI, se seleccionó individualmente el soma de ésta y se aumentó el brillo. Luego se hizo una proyección máxima de esos planos a través de un *Z Project*.

Para el estudio de la localización subcelular de la proteína PFK-1.1 en neuronas ciliadas se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 800. Las imágenes se capturaron con el software de microscopía ZEN blue. El procesamiento se llevó a cabo con FIJI (Schindelin et al., 2012), lo que implicó ajustar el brillo y contraste de cada canal y luego hacer una superposición de estos. Para el caso de los *Z-stacks* se hizo una proyección máxima a través de un *Z Project*. Se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 63x/1.4 NA, y los *Z-stacks* para visualizar las cilias de la cabeza se adquirieron con un espaciado entre planos de 0,22 μm , abarcando una profundidad de 2,5 μm . Para las cilias de la cola, el espaciado fue de 0,6 μm , abarcando una profundidad de 4,8 μm . Para captar las neuronas de un ánfido que expresaban *pfk-1.1::mScarlet*, se adquirió un *Z-stack* con un intervalo de 0,4 μm , abarcando 7,6 μm de profundidad en el eje Z. Los rangos de detección espectral se establecieron como se muestra en la **Figura 17**. La resolución óptica empleada fue de 222 nm para EGFP y 594 nm para mScarlet, considerando la longitud de onda de sus máximos de emisión, y la apertura numérica del objetivo. La resolución digital fue de 10,1 px/ μm , considerando el tamaño de píxel de 0,09 μm y un tamaño de imagen de 1024 x 1024 px.

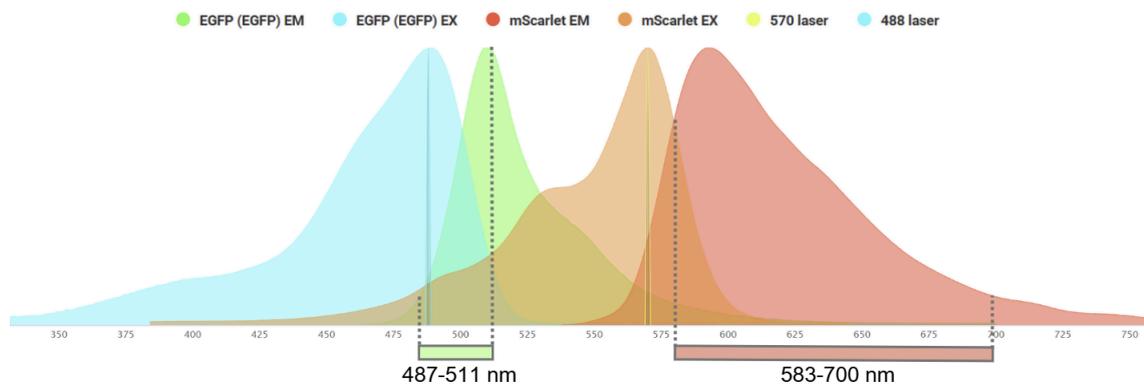


Figura 17. Esquema espectral de adquisición confocal. En celeste y verde se representan los espectros de excitación (EX, máximo en 488 nm) y emisión (EM, máximo en 509 nm) de EGFP. El láser de 488 nm excita en

el máximo de absorción de EGFP, el rango 487-511 nm corresponde a la fracción de la emisión del fluoróforo configurada para ser detectada. En anaranjado (EX, máximo en 569 nm) y rojo (EM, máximo en 594 nm) se representan los espectros de mScarlet. Se utilizó un láser de 570 nm para la excitación, y para ese fluoróforo la fracción del espectro de emisión detectada abarcó el rango de 583-700 nm. Modificado de FPbase (Lambert, 2019).

Generación de organismos transgénicos

Diseño de la construcción plasmídica

La construcción diseñada para el estudio de la localización de PFK-1.1 incluyó de 5' a 3' los siguientes elementos dentro del plásmido pIN4 (**Figura 18**): el promotor del gen *tsp-6*, los exones e intrones del gen *pfk-1.1*, la secuencia codificante del gen que codifica para la proteína reportera mScarlet y la región 3'UTR del gen *unc-54*. La región 3'UTR del gen *unc-54*, se utiliza de rutina en la generación de transgénicos de *C. elegans* ya que se sabe que mejora la estabilidad del ARNm y la expresión de la proteína. Dicha construcción fue sintetizada por la empresa GenScript y se identifica en este trabajo con el nombre: *Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet*.

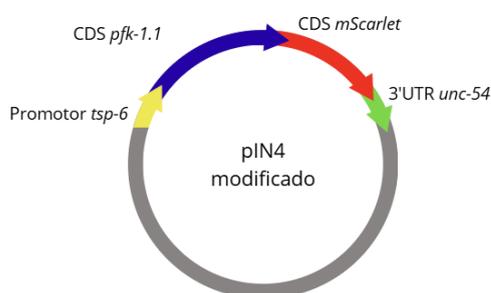


Figura 18. Esquema de la construcción plasmídica codificante para PFK-1.1::mScarlet.

Transformación de células competentes

La transformación de células competentes de *E. coli* XL1-Blue se realizó siguiendo el protocolo descrito en la referencia (Stratagene, 2004). Se transformaron células competentes con 5 ng/μL de la construcción, y se crecieron en medio LB-ampicilina 100 μg/mL, ya que el plásmido contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Extracción de ADN plasmídico

La extracción de DNA plasmídico de bacterias se realizó utilizando el kit Wizard®. La solución plasmídica se cuantificó utilizando el espectrofotómetro DeNovix DS-11 FX+ y se almacenó a -20°C.

Crio *stock* de células XL-1 transformadas con el plásmido *Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet*

Para la realización de un crio *stock* de las células XL-1 transformadas con el plásmido de interés se mezcló un cultivo de 16 horas de las células de interés con una solución de glicerol 50% en medio LB en una relación 1:1. Se almacenó a -80°C.

Microinyección

Los organismos transgénicos se generaron mediante la microinyección de la construcción en la gónada de gusanos adultos hermafroditas, siguiendo el protocolo detallado en el protocolo 1 de la referencia (Evans, 2006). Junto a la construcción de interés se co-inyectó un marcador de inyección para identificar fácilmente aquellos organismos transgénicos. Los plásmidos inyectados forman un arreglo que será internalizado por algunos núcleos de las células germinales. El marcador de inyección utilizado (plásmido pRF4) es un alelo dominante (*su1006*) del gen *rol-6*, gen que se expresa en la cutícula y que provoca una alteración en la morfología de la misma que afecta el movimiento del gusano (Cox et al., 1980). Aquellos gametos que incorporan el ADN inyectado resultan en un gusano con fenotipo *roller*, y describen trayectorias circulares sobre el sustrato debido a que rotan sobre su eje longitudinal, en lugar de presentar el movimiento sinusoidal silvestre (Cox et al., 1980). Cabe consignar que la estirpe finalmente utilizada en esta tesis fue generada por Laura Romanelli durante el entrenamiento en microinyección.

Una vez inyectados gusanos adultos con el ADN de interés, se seleccionó la progenie con fenotipo *roller*.

La mezcla de inyección utilizada contenía el plásmido pRF4 a 100 ng/μL, y la construcción *Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet* a 30 ng/μL en agua libre de ARNasas y ADNasas.

Generación de machos

Para cruzar las cepas de interés, se generaron machos. Se incubaron 20 hermafroditas en el estadio L4 a 37°C durante 35 min en una placa de NGM con alimento y luego se mantuvieron a 20°C. Se espera que el 2-5% de la progenie de estos gusanos expuestos a alta temperatura sean machos (Sulston y Hodgkin, 1988). Posteriormente, para aumentar la proporción de

machos, se realizó un cruce de los machos obtenidos en el *shock* de calor con hermafroditas de la misma estirpe.

Generación de nueva estirpe transgénica mediante el cruzamiento de estirpes

Para generar gusanos que expresen tanto la enzima PFK-1.1 fusionada al reportero mScarlet como también el marcador ciliar BBS-1 fusionado a GFP, se realizó un cruce entre machos *dpy-5(e907);nxEx23[dpy-5(+); bbs-1::gfp]* y hermafroditas *N2;Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]* (**Figura 19**). Se colocaron 7 machos adultos jóvenes junto a 2 larvas L4 *roller* hermafroditas, en una nueva placa con alimento. De la descendencia del cruce (F1) se seleccionaron los organismos que expresaban ambos reporteros utilizando la lupa de fluorescencia Nikon SMZ800.

$\text{♂}/\text{♀}$	+; <i>Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]</i>	+
<i>dpy-5(e907);nxEx23[dpy-5(+); bbs-1::gfp]</i>	<i>e907/+; Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet; dpy-5(+); bbs-1::gfp]</i>	<i>e907/+;nxEx23[dpy-5(+); bbs-1::gfp]</i>
<i>dpy-5(e907)</i>	<i>e907/+; Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]</i>	<i>e907/+</i>

Figura 19. Cuadro de Punnett. Representación del cruce de las estirpes *dpy-5(e907);nxEx23[dpy-5(+); bbs-1::gfp]* y *Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]*, que da lugar a la F1 de interés (resaltado en rosa), de genotipo: *dpy-5(e907)/+;Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet; dpy-5(+); bbs-1::gfp]*.

Caracterización fenotípica de DCR3791

Estirpe DCR3791 (alelo *ola72*)

Esta cepa fue generada por Jang et al. (2016), a partir de análisis genéticos directos no dirigidos para identificar moléculas necesarias para la localización de proteínas de vesículas sinápticas. El alelo *ola72* causó distribución difusa de las proteínas de vesículas sinápticas en hipoxia, y a través de clonado posicional del alelo *ola72* se describió una mutación de cambio

de sentido en el cromosoma X, que da lugar a una sustitución aminoacídica de una cisteína por una tirosina en el gen que codifica para la enzima glucolítica *pfk-1.1*.

Ensayo de caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos de la estirpe DCR3791

Para estudiar el desarrollo de la progenie de las estirpes y el tiempo de puesta de huevos, tanto para la estirpe mutante *pfk-1.1(ola72)* como la silvestre N2, se aislaron gusanos del estadio L4 (generación P0) colocando 1 gusano por placa de NGM con alimento, y cada 24 h esos gusanos P0 se cambiaron a una nueva placa (1 por placa) por los siguientes 4 días (**Figura 20**). De esta manera se evaluó cuántos días los gusanos P0 pusieron progenie (generación F1). Además, se estudió la viabilidad de la F1, para esto se cuantificó la proporción entre embriones inviábiles y viables en cada placa, y para la proporción viable se monitoreó su tiempo de desarrollo (número de días desde embrión hasta adulto). Se realizaron 4 réplicas para cada estirpe en 3 experimentos independientes. Los experimentos se realizaron a 20°C.

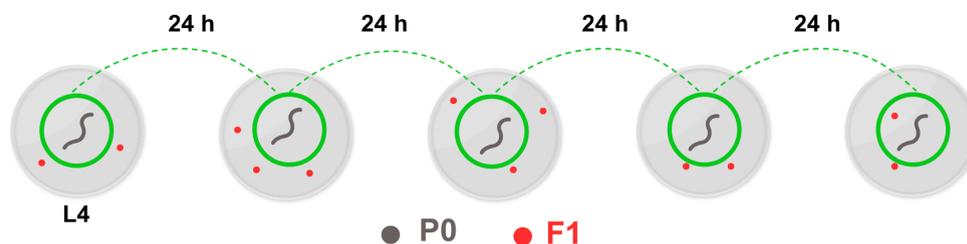


Figura 20. Diseño experimental para la caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos. El esquema representa las placas de petri en la que se siembra un gusano del cual se cuantificará el número de embriones F1 que produce y el número de días que pone huevos. A la izquierda se ubica la placa de petri con el gusano P0 que se coloca en la placa en el estadio L4 el primer día del experimento, tras 24 h dicho gusano es pasado a otra placa y así sucesivamente durante 4 días. En rojo se representa la progenie F1.

Ensayo de caracterización de la viabilidad de la estirpe DCR3791 cuando es expuesta a la solución de *bleaching*

Para estudiar si las condiciones del procedimiento de descontaminación de rutina (*bleaching*) afectan o no la viabilidad de la estirpe mutante, diseñamos un ensayo para estudiar el desarrollo y reproducción de la progenie (generación P0) contenida en el útero de gusanos adultos que se expusieron a la solución de *bleaching* (o limpieza) y adultos que no. Para la

condición de *bleaching*, se colocaron 15 adultos grávidos sobre una gota de 25 μ L de la solución en una placa de NGM con alimento. Para la condición control sin *bleaching*, como forma alternativa de aislar embriones sin utilizar la solución, se colocaron 10 adultos grávidos en una placa de NGM con alimento que pastorearon y depositaron huevos durante 2 h, luego de ese tiempo se retiraron los adultos de la placa (**Figura 21**). En ambos procedimientos había aproximadamente 50 individuos P0 por placa. Se realizaron 3 réplicas para cada condición de la estirpe mutante y se comparó con la estirpe silvestre N2, en 3 experimentos independientes.

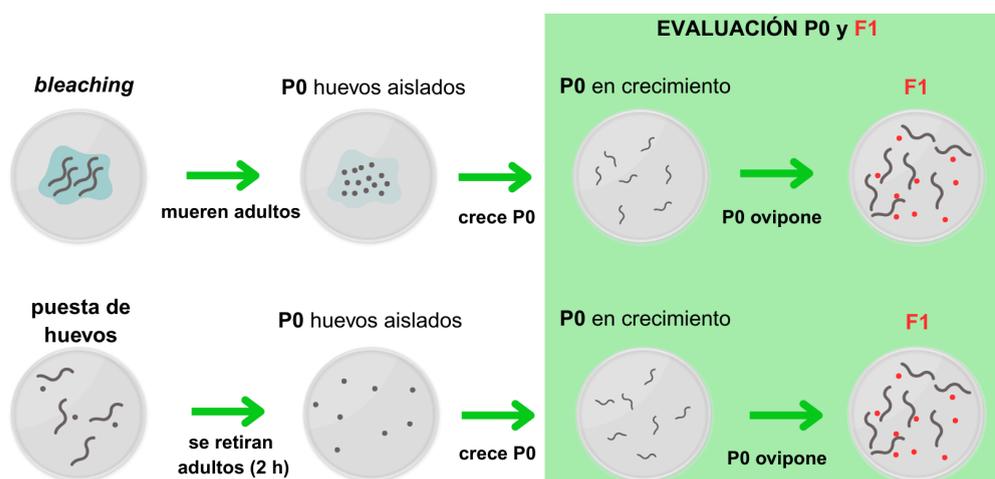


Figura 21. Diseño experimental para el ensayo de *bleaching*. En la fila superior se representa la condición de *bleaching*: se exponen gusanos grávidos a la solución, mueren los adultos y permanecen los huevos (P0), que al llegar a la madurez sexual da lugar a la generación F1. En la fila inferior se representa la forma alternativa de aislamiento de embriones (“puesta de huevos”): se colocan adultos en una placa de petri y pastorean durante 2 h mientras oviponen, luego de ese tiempo los adultos son retirados. En la placa permanece la generación P0, que al llegar a la madurez sexual da lugar a la generación F1. El cuadro verde representa las generaciones evaluadas (P0 y F1).

Resultados

Estudio de la localización subcelular de la enzima glucolítica PFK-1.1

Para el estudio de la localización subcelular de la enzima PFK-1.1, se generó mediante microinyección una línea transgénica (*N2;Ex[rol-6(su1006); Ptsp-6::pfk-1.1::mScarlet]* de ahora en adelante *pfk-1.1::mScarlet*) que expresa exones e intrones del gen *pfk-1.1* fusionado al reportero *mScarlet* bajo el promotor del gen *tsp-6*, (este último se expresa en un conjunto de neuronas dentro de las que se encuentran las AWA (*wing*), las neuronas con cilias *rod-like* del canal anfídico y las neuronas fasmídicas) (Nikonorova et al., 2022). Por otra parte, para la visualización de la cilia primaria y la eventual localización de la PFK-1.1 en dicho organelo, se realizó el cruce de la estirpe generada en este trabajo (*pfk-1.1::mScarlet*) con una estirpe transgénica que expresa el gen *bbs-1* (específico de cilia) fusionado a *gfp* (de ahora en adelante *bbs-1::gfp*). Dicho reportero marcador de cilia se localiza predominantemente en el compartimento de la membrana periciliar, en la base, en la zona de transición y en el axonema de la cilia de un conjunto de neuronas ciliadas. Es interesante mencionar que inicialmente en la estirpe *bbs-1::gfp* la localización de *bbs-1* fue reportada en la zona de transición y axonema ciliar (Blacque et al., 2004) y posteriormente se describió el subcompartimento ciliar de la membrana periciliar (Kaplan et al., 2012).

Expresión de *bbs-1::gfp*

Como marcador de cilia se utilizó la estirpe MX23 (*dpy-5(e907); nxEx23 [dpy-5(+); bbs-1::gfp]*), que expresa la fusión BBS-1::GFP de forma uniforme en la cilia. En la Figura 22A se observa la expresión del marcador ciliar en un par de neuronas de la cola, esta fue mayor en las cilias: en el axonema, por debajo en la zona de transición (que se aprecia como una región más estrecha), en la base de la cilia y en el compartimento de la membrana periciliar (abultamiento en el extremo distal de la dendrita). Dado que se reconoce cada subcompartimento del organelo en algunas neuronas, como se ve en la magnificación de un par de cilias de la cola (Figura 22A), podemos afirmar que la expresión de BBS-1::GFP abarca el largo completo de las cilias. Además, el largo de las cilias de la cola, considerando esas regiones de expresión más intensa, coincidió con la medida promedio reportada de 7 μm

(Hong et al., 2021). Adicionalmente, se observó expresión en menor medida en los somas y procesos neuronales, tanto en neuronas ciliadas de la cola como de la cabeza del organismo (Figura 22B y C).

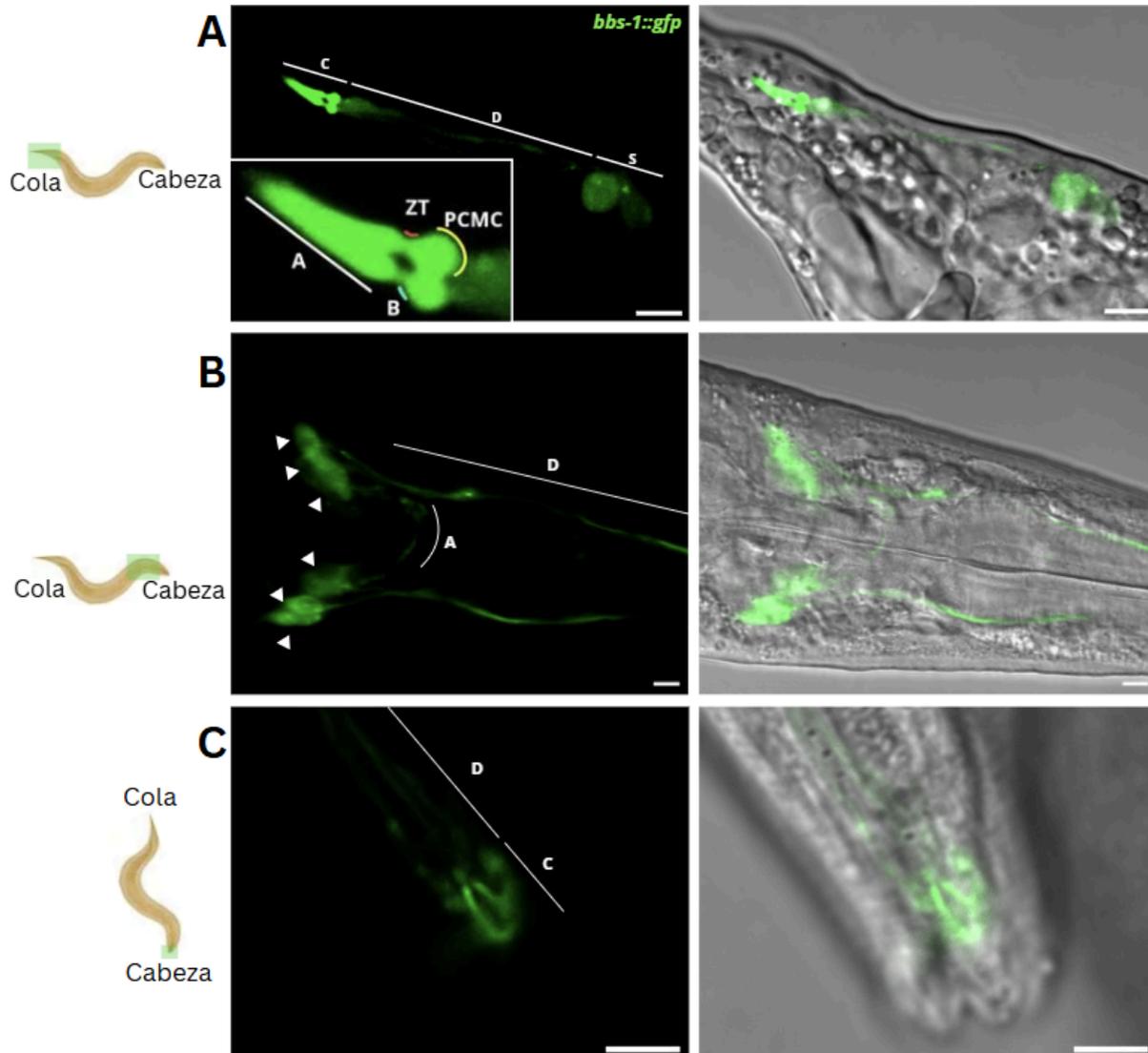


Figura 22. Expresión de BBS-1::GFP en neuronas anfídicas y fasmídicas. A la izquierda de cada fila de imágenes se esquematiza la región del organismo capturada y su orientación. A. Micrografía de un plano de la cola donde se observa un par de neuronas fasmídicas. Se representan las estructuras celulares donde se expresa BBS-1::GFP: somas (S), dendritas (D) y cilias (C). En la esquina se encuentra una magnificación de las dos cilias, donde se señalan los subcompartimentos ciliares: en amarillo el compartimento de la membrana periciliar (PCMC), en celeste la base de la cilia (B), en rojo la zona de transición (TZ), y en blanco el axonema (A). A la derecha se encuentra la misma imagen superpuesta con la imagen de luz transmitida. B. Micrografía confocal de la proyección de un *Z-stack*, se ven en vista dorso-ventral las neuronas de los anfidos de la cabeza expresando BBS-1::GFP de forma uniforme en los somas (señalados con flechas), en las dendritas (D) que se dirigen hacia la boca y en los axones (A) que forman el anillo nervioso. A la derecha se observa la misma micrografía

superpuesta con la imagen de luz transmitida. C. Micrografía de un plano con acercamiento sobre el extremo anterior de la cabeza, se observa BBS-1::GFP en cilias © y con menor intensidad en dendritas anfídicas (D). A la derecha se encuentra la misma imagen superpuesta con la imagen de luz transmitida. Escala: 5 μ m.

Expresión de *pfk-1.1::mScarlet*

En todos los casos los gusanos se montaron en hipoxia, ya que los preparados estaban cubiertos por cubreobjetos, lo que disminuye la disponibilidad de oxígeno (Jang et al., 2016). A su vez, se incubaron en distintas condiciones: con levamisol y/o azida de sodio. El levamisol inmoviliza los gusanos ya que es un agonista de receptores de nicotina/acetilcolina, que genera contracción sostenida de los músculos y finalmente parálisis espástica en el nemátodo (Turani, 2020). La azida de sodio es un inhibidor del complejo mitocondrial citocromo oxidasa (Bogucka y Wojtczak, 1966), por lo que mediante su uso además de inmovilizar a los gusanos se puede evaluar si la inhibición de la fosforilación oxidativa modifica el patrón de expresión de PFK-1.1 en las neuronas (adicionalmente al efecto de hipoxia del cubreobjeto). En la mayoría de los gusanos estudiados se observó el mismo patrón tanto en neuronas anfídicas (Figura 23A) como en fasmídicas (Figura 23B); por un lado, una expresión homogénea de *pfk-1.1::mScarlet* en las dendritas y axones de las neuronas. Por otro lado, en algunas áreas del citosol de los cuerpos celulares se observó expresión discreta detectada como puntos saturados, mientras que en otras regiones del soma, la expresión tuvo iguales características a las de los procesos celulares, con distribución uniforme y menor intensidad de la fluorescencia (**Figura 23**).

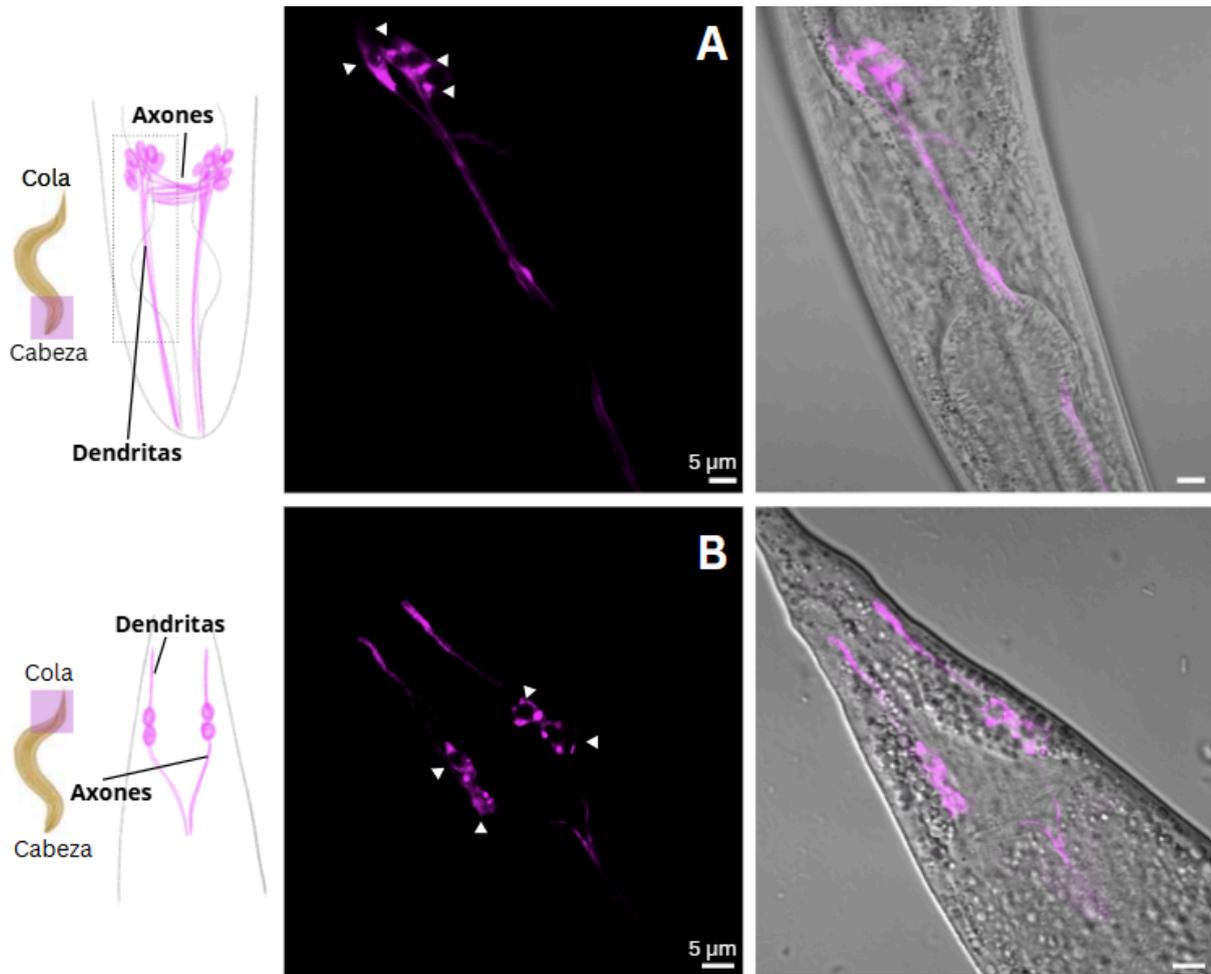


Figura 23. Expresión de PFK-1.1::mScarlet en neuronas anfídicas y fasmídicas. A la izquierda de cada fila de imágenes se esquematiza la región del organismo capturada y su orientación. A. Micrografía confocal de la proyección de un *Z-stack*, se adquirió con un espaciado entre planos de 0,22 μm , abarcando una profundidad de 2,5 μm . Se ven 4 neuronas de un ánfido de la cabeza expresando PFK-1.1::mScarlet, señaladas con flechas. En algunas zonas del citosol de los somas la expresión no parece homogénea ya que hay regiones con más intensidad de fluorescencia. Las dendritas y axones expresan PFK-1.1::mScarlet de forma uniforme. A la derecha se observa la misma micrografía superpuesta con la imagen de luz transmitida. Se utilizó azida de sodio (25 mM) como anestesia. B. Micrografía confocal de la proyección de un *Z-stack*, el espaciado fue de 0,6 μm , abarcando una profundidad de 4,8 μm . Se ven las neuronas de los 2 fásmidos de la cola con el mismo patrón de expresión de PFK-1.1::mScarlet que las neuronas de la cabeza. Las dendritas se extienden hasta la región más distal del gusano, luego se encuentran los 2 cuerpos celulares de cada fásmido, y los axones que se extienden hacia el ganglio preanal. A la derecha se observa la imagen superpuesta con la imagen de luz transmitida. Se empleó levamisol (4 mM) y azida de sodio (0,5 mM). Escala: 5 μm .

Estudio de la posible colocalización de las fusiones *bbs-1::gfp* y *pfk-1.1::mScarlet*

Para determinar si la PFK-1.1 se localiza en la cilia se generó una nueva estirpe transgénica cruzando las estirpes que expresan *pfk-1.1::mScarlet* y *bbs-1::gfp* y la progenie del cruce se analizó por microscopía confocal. Dado que en la cola hay 2 cilias de estructura *single rod* en cada fásmodo, con una disposición fácilmente distinguible, la colocalización fue más fácil de determinar en estos órganos que en los ánfidos de la cabeza. En cambio, en la cabeza fue más complejo observar colocalización debido a la gran cantidad de cilias con distintas morfologías y disposición intrincada, sumado a que la expresión de las dos proteínas (BBS-1 y PFK-1.1) no ocurre exactamente en las mismas neuronas, ya que los transgenes tienen distintos promotores; por este motivo en los ánfidos se trató de seleccionar planos con pocas células para identificar terminaciones nerviosas que expresaran ambas construcciones.

Tanto en la cabeza como en la cola, la colocalización de las dos proteínas es clara en el compartimento abultado de la membrana periciliar (**Figura 24**).

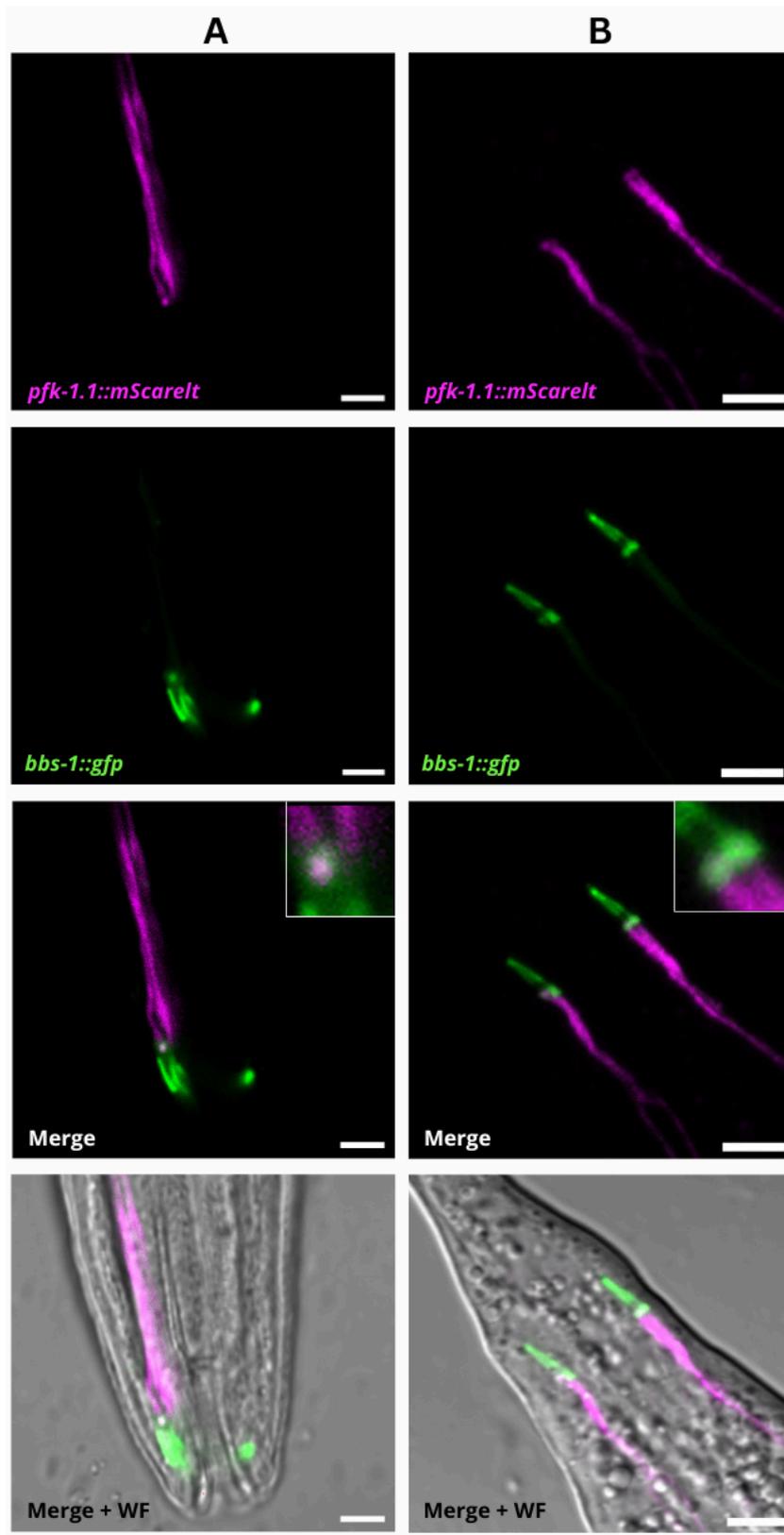


Figura 24. Colocalización de PFK-1.1::mScarlet y BBS-1::GFP en neuronas anfídicas y fasmídicas. A. Micrografías confocales de un solo plano, se ven neuronas de un ánfido de la cabeza. B. Micrografías de la proyección de un *Z-stack*: se ven las neuronas de los dos fásmidos de la cola. Para la cabeza y la cola la localización de PFK-1.1::mScarlet ocurre en las dendritas hasta el compartimento membranoso periciliar (PCMC), y la localización del marcador BBS-1::GFP ocurre en las cilias. La colocalización de los dos fluoróforos se observa a través de la superposición de las imágenes de los dos canales (*merge*): en A en la región que corresponde con el subcompartimento PCMC de 1 neurona. En B en la región que corresponde con el subcompartimento PCMC de las 4 neuronas fasmídicas. En la esquina se incluye una magnificación de la región en la que se observa colocalización. Por último, se incluye la superposición de los dos canales y campo claro (WF). Escala: 5 μ m.

A partir de las imágenes obtenidas se observó que el grado de incorporación de la tinción fue similar en las dos estirpes. A pesar de que no se cuantificó la intensidad de fluorescencia, en todos los casos se distinguió claramente la mayoría de las neuronas con sus procesos neurales y somas. Las neuronas anfídicas ASK, ADL y ASI se ubican próximas entre sí y en algunos casos quedan superpuestas y resulta difícil su individualización mediante microscopía de epifluorescencia (**Figura 26A y B**). Dado esto, en algunos individuos, tanto salvajes como mutantes, el número de neuronas de la cabeza identificadas fue menor al esperado, como se observa en la distribución de los datos de las gráficas de la **Figura 25A**. Dado el número de réplicas realizadas y que se observa lo mismo en ambas estirpes, especulamos que en aquellos individuos en los que se cuantificaron menos de 12 neuronas anfídicas, se deba a la dificultad de individualizarlas y no a otro fenómeno. En cambio, en la cola se marcaron los dos pares de neuronas fácilmente identificables y por lo tanto se apreció una distribución menos dispersa de los datos (**Figura 25B**).

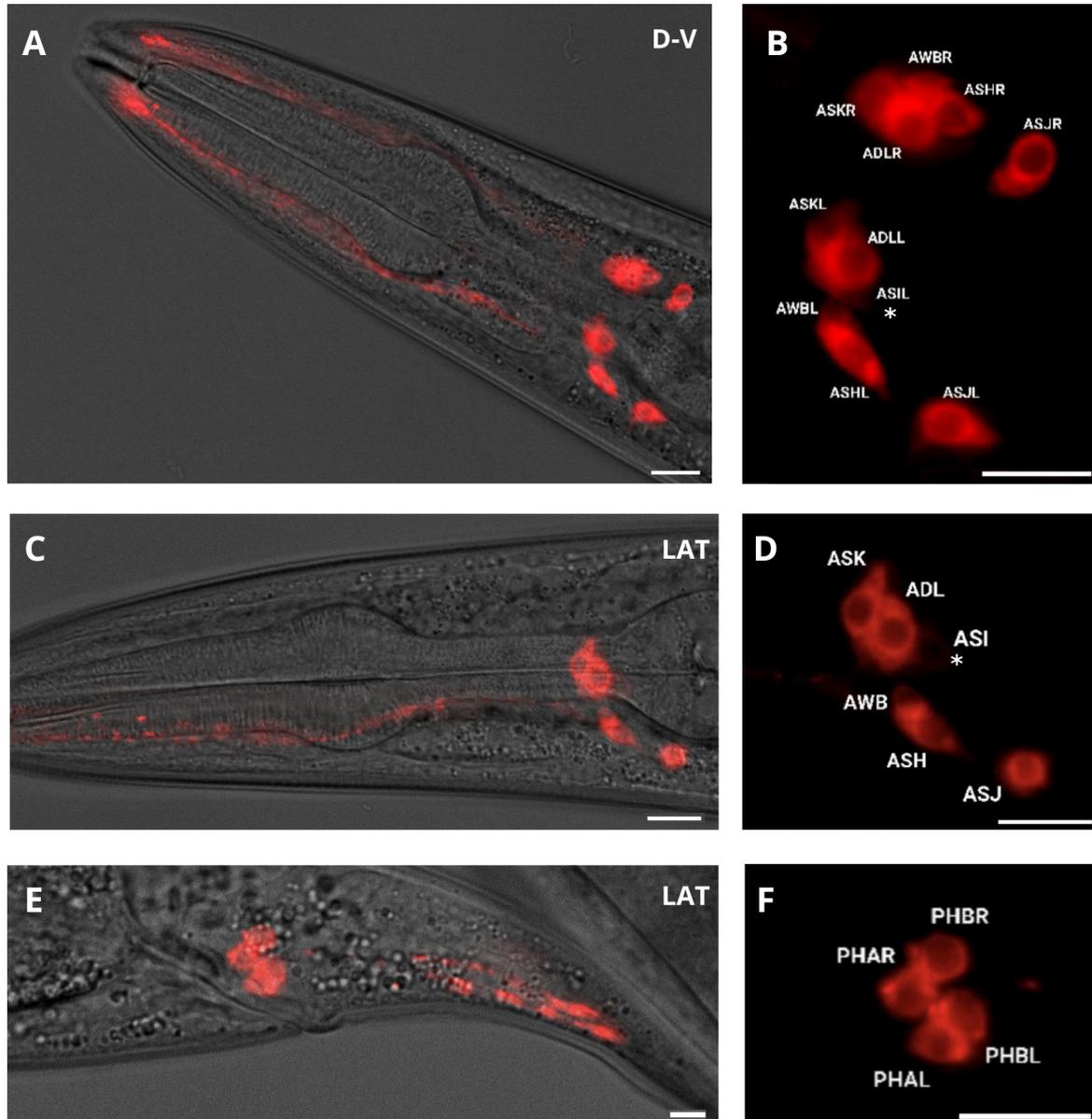


Figura 26: Neuronas anfídicas y fasmídicas teñidas con DiI en gusanos de la estirpe silvestre N2. A y B: En vista dorso-ventral (D-V) se observan los dos grupos de neuronas que integran los anfídicos, a cada lado de la faringe. En A se pueden observar las dendritas que se extienden hacia el extremo anterior del animal y conforman nervios anfídicos (A). En B se ven únicamente los cuerpos celulares, en el anfídico izquierdo se visualizan las 6 neuronas anfídicas que se tiñen con DiI (ASI con muy poca intensidad de fluorescencia, por lo que se señala con un asterisco*, ADL, ASK, AWB, ASH y ASJ), mientras que en el anfídico derecho se visualizan 5. C y D: En vista lateral (LAT) se observa el anfídico derecho: las dendritas (C) y la disposición de sus somas (C y D); ASK, ADL y ASI* se ubican próximas entre sí y con disposición dorsal respecto a las demás, ASH y ASJ se disponen ventralmente y alineadas entre sí y AWB es de menor tamaño y se ubica en un plano en el medio de los otros dos conjuntos de neuronas. E y F: Se observan los dos fasmidos de la cola en vista lateral, con sus respectivas dendritas (E) y los cuerpos celulares ubicados detrás del recto a ambos lados de la cola (E y

F): PHAR y PHBR del fásmodo derecho, PHAL y PHBL del izquierdo. Escala: 10 μ m. Resultados similares se obtuvieron en los mutantes en el gen *pfk-1.1* (estirpe DCR3791).

Caracterización fenotípica de la estirpe DCR3791

Al trabajar con la estirpe mutante DCR3791 (*pfk-1.1(ola72)*) se observaron fenotipos no descritos previamente; concretamente se observaron diferencias respecto a la puesta de huevos entre los adultos mutantes y silvestres, tanto en condiciones normales como frente al procedimiento de *bleaching*. Por lo tanto, se procedió a realizar ensayos para describir dichos fenotipos.

Ensayo de caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos de la estirpe DCR3791

Con respecto al fenotipo asociado a la puesta de huevos, se observó que los adultos de la estirpe DCR3791 ponían una cantidad de embriones similar a la estirpe silvestre, sin embargo, no todos los embriones de la estirpe DCR3791 eran viables y por lo tanto las placas de dicha estirpe se veían enriquecidas en embriones sin eclosionar. Concretamente, 5 de cada 12 gusanos adultos de la estirpe mutante generaron progenie viable, a diferencia de la estirpe silvestre donde todos los adultos dieron lugar a progenie viable (**Tabla 5**). Otra observación realizada fue que en la estirpe DCR3791, fueron viables principalmente algunos de los huevos del primer día de puesta, y en casos aislados en algún día subsiguiente.

A pesar de la gran diferencia en la viabilidad entre las estirpes salvaje y mutante, se observó que el tiempo de puesta y el número de huevos producidos por la generación P0 y el tiempo de desarrollo de la generación F1 fueron muy similares entre las estirpes (**Tabla 5**).

Tabla 5: Resultados obtenidos en la suma de las 3 réplicas del experimento de caracterización del número de progenie y período de puesta de huevos. Para ambas estirpes, mutante en *pfk-1.1* y silvestre N2, se detalla: el tiempo de puesta de huevos de cada individuo de la generación P0 testeado (un total de 12 gusanos), el número de individuos P0 que producen al menos un huevo (F1) viable respecto al total de individuos estudiados (12), y el tiempo de desarrollo de la generación F1 desde embrión a adulto.

	Tiempo de puesta de huevos de P0	F1 viable	Tiempo de desarrollo de la F1
Individuos mutantes <i>pfk-1.1</i>	3 días	5/12	3 días
Individuos silvestres N2	4 días	12/12	3 días

Ensayo de caracterización de la viabilidad de la estirpe DCR3791 cuando es expuesta a la solución de *bleaching*

Frente al procedimiento de rutina de descontaminación de gusanos (denominado *bleaching*) se observó que la estirpe mutante en *pfk-1.1* era más sensible a la solución de *bleaching* (o solución de limpieza) que la estirpe silvestre, particularmente se vio afectada la viabilidad de la generación F1. Por lo tanto se realizó una caracterización de dicho fenotipo que se detalla a continuación.

El ensayo consistió en estudiar el desarrollo, fertilidad y progenie de gusanos de las estirpes mutante y silvestre aislados mediante la solución de *bleaching* y sin dicha solución. Brevemente, adultos grávidos de cada estirpe se expusieron a la solución de *bleaching*, (de esta manera se aíslan los embriones que están en el útero), y esos embriones aislados (generación P0) son los individuos que fueron estudiados en cuanto a su desarrollo y reproducción. Por otro lado, se colocaron adultos grávidos de ambas estirpes en placas para que depositaran huevos durante 2 h y luego se retiraron, los embriones producidos en ese tiempo (generación P0) son los individuos estudiados (referidos como embriones aislados por “puesta de huevos”) ([detalle en Metodología](#)).

Como resultado, se obtuvo que la mayoría de la progenie (generación F1) de los gusanos mutantes de la condición de *bleaching* era inviable a diferencia de la condición control sin *bleaching* (**Tabla 6**) (**Figura 27**). Concretamente, se obtuvo que en la condición de *bleaching* hubo progenie (F1) viable solamente en 3 de las 9 réplicas, a diferencia del control sin *bleaching*, donde 7 de las 9 réplicas presentaron F1 viable. Para la estirpe silvestre N2 la viabilidad de la generación F1 fue constante entre condiciones (**Tabla 6**).

Tabla 6: Resultados obtenidos en la suma de las 3 réplicas del experimento de evaluación del efecto de la solución de *bleaching* en la viabilidad de la generación F1. Para ambas estirpes (DCR3791 (mutante *pfk-1.1*) y silvestre N2) se detalla: el número de individuos P0 que producen al menos un huevo (F1) viable respecto al total de individuos estudiados (un total de 9 gusanos de la estirpe DCR3791 y 3 gusanos silvestres).

	F1 viable (P0 aislados por <i>bleaching</i>)	F1 viable (P0 aislados por puesta de huevos)
Individuos mutantes <i>pfk-1.1</i>	3/9	7/9
Individuos silvestres N2	3/3	3/3

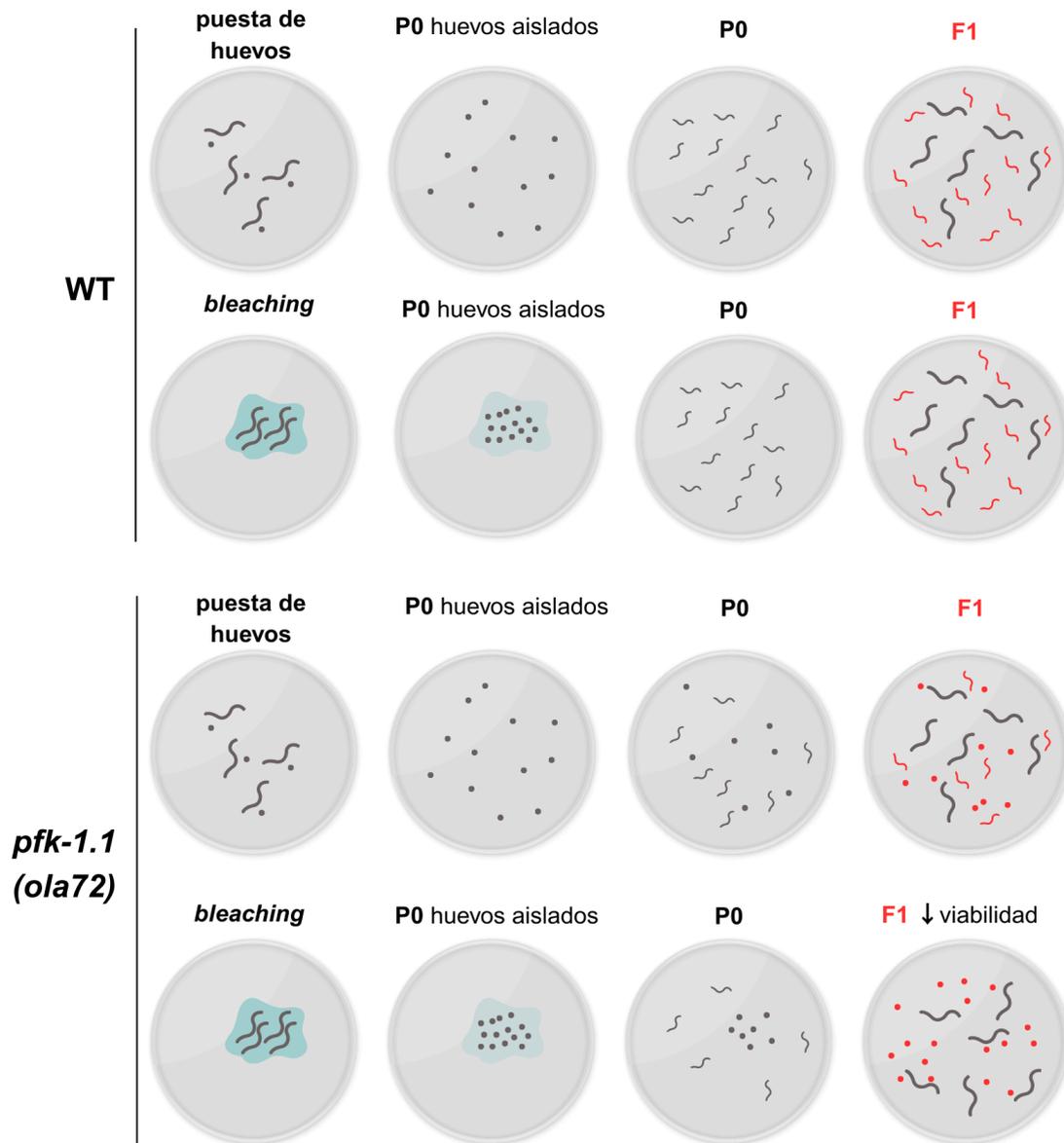


Figura 27: Esquema representativo de los resultados obtenidos en el ensayo de *bleaching*. En las primeras dos filas se representan las condiciones de “puesta de huevos” y *bleaching* en la estirpe silvestre (WT), en ambos casos todos los embriones (P0) eclosionan, se desarrollan y dan lugar a progenie F1 completamente viable. En las últimas dos filas se representan las mismas dos condiciones para la estirpe mutante *pfk-1.1(ola72)*. En los dos casos los huevos P0 son aislados y sólo una proporción de ellos eclosiona. Cuando P0 se desarrolla a adulto y se reproduce generando la generación F1, se observa que en ambas condiciones la generación F1 viable es menor que en la estirpe silvestre. Adicionalmente, se observa una diferencia entre condiciones: en la condición de *bleaching* el número de F1 viable es menor que en la condición control.

A continuación, se incluyen resultados de experimentos que forman parte de procedimientos de rutina en el trabajo con este tipo de estirpes de gusanos y al mismo tiempo aportan a la formación de la estudiante en el contexto del desarrollo de una tesina de grado. Sin embargo, no constituyen resultados informativos respecto a la pregunta biológica que se busca responder.

Confirmación de genotipo de estirpes N2 y DCR3791 mediante PCR y secuenciación

Para confirmar el genotipo de las estirpes N2 y DCR3791 se realizaron PCRs, utilizando como molde ADN genómico de un conjunto de gusanos de cada estirpe.

Con el programa descrito ([detalle en Metodología](#)) se llevó a cabo la amplificación de la secuencia de interés de 430 pb a partir de ADN genómico de un conjunto de gusanos de cada estirpe. Dentro del amplicón se encuentra la posición nucleotídica que es sustituida en la estirpe mutante en *pfk-1.1* (DCR3791). Se trata de un cambio de una guanina por una adenina en la posición 1685 del marco abierto de lectura, que da lugar a una mutación de cambio de sentido (tGc/tAc; C/Y, alelo *ola72*). El producto de la amplificación se corrió en un gel de agarosa y se obtuvo una banda nítida del tamaño esperado para ambas estirpes, y una banda tenue de amplificación inespecífica de aproximadamente 75 pb como se observa en la **Figura 28**.

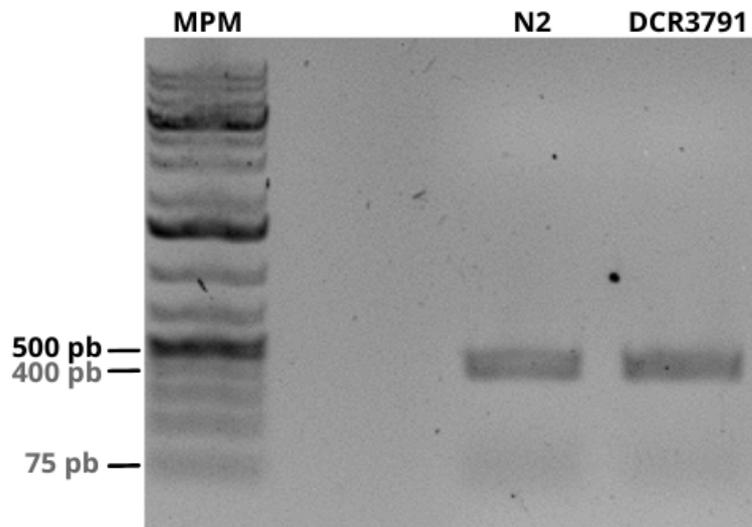


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de amplificación por PCR del fragmento de 430 pb que contiene la sustitución nucleotídica del alelo *ola72*, para la estirpe mutante DCR3791 y la salvaje N2.

El ADN purificado a partir del gel de agarosa fue secuenciado en la empresa Macrogen por el método Sanger, y se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas con el genoma salvaje de *C. elegans* publicado en *wormbase.org* (genoma *WBcel235*). De esta manera se corroboró la identidad de las estirpes, como se observa en la **Figura 29**.



Figura 29. Alineamiento de los productos de secuenciación de la estirpe silvestre N2 y la estirpe mutante en *pfk-1.1* (DCR3791) con el genoma de *C. elegans*. A: a la izquierda se encuentra una fracción del alineamiento entre la secuencia del producto de amplificación de N2 y el genoma salvaje de *C. elegans*, en

verde se marca la base guanina que se mantiene en los dos casos y a la derecha se encuentra el cromatograma ampliado en esa región. **B:** a la izquierda se encuentra una fracción del alineamiento entre la secuencia del producto de amplificación de DCR3791 y el genoma salvaje de *C. elegans*, en amarillo se marca la posición de la sustitución nucleotídica, se observa la transición de una guanina del genoma salvaje a una adenina en la secuencia del mutante, a la derecha se encuentra el cromatograma ampliado en esa región.

Discusión

La cilia primaria, organelo encargado de la comunicación de la célula con su entorno, cumple funciones que se presume tienen un alto y fluctuante consumo energético. Lo más aceptado es que mitocondrias ubicadas en la base de la cilia primaria abastecen su demanda energética. Sin embargo, es cuestionable si la velocidad de difusión del ATP desde la base provee todos los requerimientos energéticos de la cilia. Dado que una forma rápida de generar ATP, descrita en regiones distales de axones de motoneuronas de *C. elegans* es la glucólisis aeróbica, en este trabajo se plantea si dicho fenómeno puede ser relevante en la cilia primaria.

Concretamente en esta tesis se propusieron dos abordajes para determinar la existencia de glucólisis en la cilia primaria de *C. elegans*. Por un lado, se planteó determinar la localización subcelular de la enzima fosfofructoquinasa-1 en neuronas ciliadas de *C. elegans*, y por otro lado estudiar fenotipos morfológicos de un conjunto de neuronas ciliadas, en gusanos mutantes en el gen que codifica para la PFK-1.1 (*pfk-1.1*), utilizando el compuesto DiI.

Determinación de la localización subcelular de la enzima PFK-1.1 en neuronas ciliadas de *C. elegans*

Para abordar este objetivo, se generó una línea transgénica (estirpe IH42) mediante microinyección de una construcción que incluye los exones e intrones del gen *pfk-1.1* fusionado al reportero *mScarlet* bajo el promotor del gen *tsp-6*, (gen que se expresa en neuronas anfídicas y fasmídicas) (*pfk-1.1::mScarlet*). La estirpe generada presentó expresión homogénea de *pfk-1.1::mScarlet* en las dendritas y axones de las neuronas, mientras que algunos somas presentaron expresión subcelular localizada, y otros expresión homogénea (**Figura 23**). Por otro lado, para determinar la localización subcelular de PFK-1.1 se generó una nueva estirpe transgénica que coexpresa la construcción de interés y una construcción marcadora de la cilia primaria (*bbs-1::gfp*). En esta nueva estirpe (IH45), se pudo observar la colocalización de ambas proteínas reporteras en la región de la cilia que correspondería al compartimento de la membrana periciliar o PCMC (**Figura 24**).

El PCMC está delimitado en su base por uniones adherentes en forma de cinturón, entre la neurona y la célula de soporte *sheath* contigua, contribuyendo así a la compartimentalización o separación de esta región con la dendrita (Blacque y Sanders, 2014). El PCMC se encuentra enriquecido en proteínas asociadas a la señalización sensorial, actuando como reservorio de moléculas que aún no han ingresado a la cilia (Blacque y Sanders, 2014). En dicha región también se expresan genes involucrados en secreción, endocitosis y en el transporte intraflagelar, facilitando el rápido acceso a la cilia de las moléculas de señalización tras una estimulación sensorial (Blacque y Sanders, 2014). La composición proteica del PCMC está implicada en funciones específicas que lo diferencian del resto de la dendrita, por lo tanto, la localización de la PFK-1.1 allí podría ser relevante para cumplir alguna de dichas funciones. En este sentido, dado que el PCMC está involucrado en procesos endocíticos y en el tráfico de proteínas hacia la cilia, una posible función de la glucólisis en esta región podría estar relacionada con la disponibilización rápida de ATP para abastecer esos procesos; ante un estímulo sensorial se tienen que transportar rápidamente las proteínas hacia la membrana ciliar. Como se mencionó en la introducción, en *C. elegans* se ha documentado *in vivo* la formación del metabolón glucolítico en el botón presináptico de motoneuronas, asociado a la transmisión sináptica, y específicamente, a la endocitosis de vesículas sinápticas. En condiciones de estrés energético o de hipoxia, la inhibición de la glucólisis afecta el ciclo vesicular sináptico, con consecuencias en la recuperación sináptica y finalmente en la locomoción del organismo (Jang et al., 2016). Si bien muchos procesos celulares dependen de ATP, no todos son igualmente vulnerables a la disminución de sus niveles. La endocitosis de vesículas sinápticas es un proceso particularmente sensible al ATP y a perturbaciones metabólicas, en comparación con otros procesos como la exocitosis (Rangaraju et al., 2014). Teniendo en cuenta esto, dentro de las funciones en las que el PCMC estaría implicado, la endocitosis podría ser un proceso que dependa de la glucólisis.

Las proteínas endocíticas del PCMC de *C. elegans* desempeñan un papel clave en la homeostasis de la membrana ciliar y periciliar, así como en el transporte eficiente de proteínas hacia la cilia. La alteración de genes endocíticos modifica el largo de la cilia y el volumen de la membrana del organelo, la dinámica del transporte de proteínas transmembrana ciliares y del IFT (Kaplan et al., 2012).

Las ciliias de *C. elegans* liberan vesículas extracelulares (EV), desde la punta y la base ciliar. La formación de EVs ocurre por brotación desde la membrana ciliar y no se han observado cuerpos multivesiculares dentro de las ciliias, lo que indica que son microvesículas derivadas de la membrana celular y no exosomas derivados del sistema endosomal (Wang et al., 2024). En este contexto se podría pensar que, como la producción de vesículas extracelulares no depende de la endocitosis, este proceso no sería tan vulnerable a la disminución de ATP como sí lo sería el tráfico de vesículas hacia la cilia y desde la región intraciliar hacia la base. Por lo tanto, la ocurrencia de glucólisis en el PCMC y eventualmente la formación de un metabolón podrían estar más vinculadas a la endocitosis.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, lo más aceptado es que existen mitocondrias próximas a la base de la cilia que son responsables de la síntesis del ATP (Fluegge et al., 2012; Moruzzi et al., 2022). En *C. elegans* está reportado que hay mitocondrias desde la región distal de dendritas de neuronas anfídicas, hasta la base de la cilia, pero no es claro qué ocurre con el PCMC ya que no se enfocan en caracterizar la expresión en esa región (Renken et al., 2024). El PCMC tiene un tamaño de $\sim 0.5 \mu\text{m}^2$ (Blacque y Sanders, 2014), y las mitocondrias de neuronas de *C. elegans* tienen un largo de 1,3–2,4 μm y un diámetro de 0,18–0,24 μm dependiendo del tipo neuronal (Riboul et al., 2024); teniendo en cuenta estos valores el área mínima de una mitocondria sería de $\sim 0,7 \mu\text{m}^2$, por lo tanto es improbable que se ubiquen mitocondrias en el PCMC. Esto se diferencia de lo que ocurre en el *knob* de neuronas olfativas de vertebrados, donde hay de 2 a 3 mitocondrias (Villar et al., 2020).

Por su parte, en el soma de algunas neuronas la expresión de PFK-1.1 fue punteada. En el trabajo de Jang et al. (2016) describen que en normoxia, la PFK-1.1 se localizó de forma punteada en algunos somas y de forma difusa en las neuritas. Además reportan que bajo estrés energético ocurrió la relocalización de la PFK-1.1 a lo largo de las neuritas a un patrón agrupado, principalmente cerca de los sitios sinápticos. Por lo tanto, en el presente trabajo, la expresión punteada observada en somas, tanto en hipoxia como con la fosforilación oxidativa inhibida, podría deberse a la agregación de la proteína por sobreexpresión y no estaría asociado a la formación de un metabolón.

Por último, en cilias móviles se ha descrito la ocurrencia de glucólisis. En *Chlamydomonas reinhardtii* en el axonema del flagelo se han identificado la enzima glucolítica aldolasa y todas las enzimas de la fase generadora de energía (Pazour et al., 2005). En el flagelo de espermatozoides de mamíferos han sido descritas todas las enzimas de la glucólisis, asociadas a la vaina fibrosa, una estructura de anclaje para las enzimas en la pieza principal del espermatozoide (Amaral, 2022). Por su parte, en las cilias primarias de las neuronas olfativas de mamíferos, se ha reportado la presencia de la primera enzima de la vía (HXK), y dos enzimas de la fase de recompensa (GAPDH y PYK) (Villar et al., 2017). Teniendo en cuenta la variabilidad de los ejemplos mencionados, la no localización de PFK-1.1 dentro del axonema, no implica que no pudiera ocurrir allí la fase de generación de energía. Podría ser

que la fase preparatoria de la glucólisis ocurriese en el PCMC y que la fructosa 1, 6-bifosfato difunda hacia el axonema, y allí continúe su procesamiento por las enzimas de la fase de generación de energía.

Evaluación de la integridad estructural de la cilia mediante tinción con DiI en la estirpe WT y mutante en *pfk-1.1* (DCR3791)

Como un abordaje para el estudio de la integridad estructural de la cilia primaria en gusanos silvestres y mutantes en *pfk-1.1* se realizó la tinción de los animales con DiI. La no incorporación de dicho compuesto indica problemas en la ciliogénesis y en consecuencia el mal funcionamiento de la cilia primaria. Los resultados obtenidos indican que no hay fenotipos anormales en la incorporación del DiI en el organismo mutante en el gen *pfk-1.1* (**Figura 25**), esto sugiere que la estructura de la cilia no tiene alteraciones que comprometan su exposición al ambiente, en ausencia de dicha enzima funcional.

C. elegans posee dos genes parálogos, *pfk-1.1* y *pfk-1.2*, los cuales codifican para isoformas de la enzima fosfofructoquinasa-1. Dentro de la información reportada acerca del gen *pfk-1.1* es el patrón de expresión, el cual se expresa en tejidos larvarios y en la línea germinal proximal, hipodermis, neuronas, células musculares y faringe del adulto (Sternberg et al., 2024). Por su parte, el gen *pfk-1.2* ha sido reportado como necesario para la fertilidad y el correcto desarrollo del tamaño corporal. Adicionalmente se ha descrito un enriquecimiento de los transcritos de *pfk-1.2* durante la espermatogénesis (Sternberg et al., 2024).

En este trabajo, con respecto al número de neuronas teñidas por individuo, no se encontraron diferencias entre estirpes (mutantes DCR3791 versus salvajes) (**Figura 25**). Dado que no se mantuvieron constantes los parámetros de adquisición de las imágenes, como por ejemplo la intensidad del láser, no se puede concluir acerca del grado de incorporación de la tinción y por lo tanto si ambas estirpes tienen o no incorporación diferencial de la tinción.

Caracterización fenotípica de la estirpe DCR3791

Otro resultado obtenido en este trabajo fue la determinación de que la estirpe mutante en *pfk-1.1* tiene un éxito reproductivo menor en relación al de la estirpe salvaje. Particularmente se encontró una disminución en la viabilidad de los huevos, 5 de cada 12 adultos produce prole viable (**Tabla 5**). Adicionalmente, frente al procedimiento de descontaminación denominado “*bleaching*” se exagera el número de embriones inviables en la estirpe mutante; aquellos embriones aislados por *bleaching* al llegar a adultos ponen huevos con una viabilidad menor a la obtenida para la misma estirpe en condiciones normales (**Tabla 6 y Figura 27**). Por otra parte, en esta misma estirpe mutante, el tiempo de desarrollo y el número de huevos puestos fueron iguales al silvestre.

Como se describió en Metodología, la estirpe DCR3791 tiene una mutación de cambio de sentido en el gen *pfk-1.1*, que codifica para un cambio de cisteína a tirosina en el dominio regulatorio C-terminal de la proteína, adyacente a un sitio conservado de unión alostérica de fructosa 2, 6-bifosfato (UniProt Consortium, 2025). Ya que en la bibliografía no se encontraron reportes sobre el efecto de esta mutación, se hipotetiza que son varios los posibles efectos sobre la proteína; regulatorios, estructurales o estéricos. La naturaleza de dicha mutación, sugiere que la actividad de la enzima se podría ver afectada, ya que la sustitución de la cisteína por un aminoácido aromático, podría tener un efecto estérico en la estructura de la proteína, por ejemplo que el anillo aromático afecte la correcta unión del activador fructosa 2, 6-bifosfato, impidiendo la transición de la forma inactiva al tetrámero activo. Otro posible efecto sería que la formación de un puente disulfuro clave en la estabilidad estructural de la proteína sea impedido por la sustitución aminoacídica. Dado que está reportado que el gen *pfk-1.1* se expresa, entre otros tejidos, en la gónada, el alelo mutante en dicho tejido podría explicar el fenotipo de disminución del éxito reproductivo observado en la estirpe DCR3791. De hecho, en dos trabajos de genómica funcional en *C. elegans*, emplean RNAi dirigidos a *pfk-1.1* y reportan el fenotipo de muerte durante el desarrollo embrionario (Maeda et al., 2001; Sönnichsen et al., 2005). Dentro de la gónada, *pfk-1.1* se expresa en la línea germinal proximal, donde ocurre la maduración tardía de los ovocitos (Altun y Hall, 2009a). En nuestros resultados, algunos de los embriones DCR3791 de los primeros 2 días de puesta de huevos son viables, a diferencia de la estirpe salvaje, que

produce embriones viables durante 4 días. Esto sugiere que el fenotipo de baja viabilidad resulta de una afectación de la gónada del parental y no del embrión *per se*, ya que si fuese del embrión, se esperaría que el patrón de viabilidad se mantuviese en todos los días de puesta. Adicionalmente, ya que el número de huevos puestos y el tiempo de desarrollo de la estirpe DCR3791 no varían en gran medida respecto a la estirpe salvaje en condiciones normales, se puede especular sobre qué proceso podría estar afectado en el mutante previo a la embriogénesis. En los gusanos hermafroditas que se reproducen sólo por autofecundación, el número de embriones es determinado por el número de espermatozoides almacenados en la espermateca (las 300 primeras células germinales se diferencian en espermatozoides) (Ward et al. 1981). Por lo tanto, al no verse afectado el número de embriones generados, podemos descartar que la PFK-1.1 mutante esté asociada a una alteración en la producción de espermatozoides. Sumado a esto, está descrito que la expresión de la isoenzima PFK-1.2 ocurre durante la espermatogénesis (Sternberg et al., 2024), lo que explicaría la correcta formación de los espermatozoides en DCR3791 (silvestre para *pfk-1.2*).

Por otro lado, con respecto al efecto de la solución de *bleaching* sobre la estirpe mutante, se observó que los embriones aislados por *bleaching* (generación P0), tienen un patrón de viabilidad igual a la condición *sin bleaching*, sin embargo dan lugar a una progenie con una gran disminución de su viabilidad. En cambio, cuando los embriones fueron aislados sin *bleaching*, tuvieron una proporción de viabilidad y un desarrollo normal (**Figura 27 y Tabla 6**).

En las primeras etapas del desarrollo embrionario, antes de que el genoma del embrión comience a expresarse completamente, su fenotipo es determinado por el genotipo del hermafrodita parental que deposita en el óvulo ARN mensajero y proteínas codificadas por sus “genes maternos” durante la ovogénesis (Bowerman, 1998). Dentro de las moléculas que se acumulan en los ovocitos están las enzimas de la mayoría de las vías metabólicas, necesarias para el *housekeeping* de los primeros ciclos celulares del embrión (fenómeno ampliamente reportado en humanos y ratones). En los clivajes tempranos del desarrollo, el piruvato es el sustrato preferido, mientras que luego del estadio de 8 células, momento en el que aumentan los requerimientos energéticos para el desarrollo del embrión, el sustrato

preferido pasa a ser la glucosa (El Mouatassim et al., 1999). En *C. elegans*, predomina el ciclo del ácido cítrico en etapas tempranas y tardías del desarrollo, mientras que la glucólisis aeróbica parece no ser utilizada en las etapas tempranas previas a la gastrulación (Hada et al., 2019). En el desarrollo embrionario de *D. melanogaster* aumenta la expresión de genes glucolíticos a mitad de la embriogénesis, y se atenúa la actividad mitocondrial (Tennessen et al., 2014). Lo reportado para distintos linajes eucariotas, parece indicar que las transiciones metabólicas secuenciales y el uso eficiente de las reservas de nutrientes para sostener el desarrollo embrionario es conservado desde la mosca hasta humanos. Por lo tanto, si bien es poca la información que hay sobre el metabolismo embrionario de *C. elegans*, se puede asumir que sigue los patrones observados en otros organismos.

Una posible explicación de los resultados obtenidos podría ser que la estirpe DCR3791 al expresar el alelo mutante de *pfk-1.1* dé lugar a una fracción de proteínas que forme el tetramero funcional y una fracción que no. Por lo tanto, en condiciones óptimas, se observa que una fracción reducida de los huevos es viable; estos serían aquellos que tienen cantidad suficiente de la enzima funcional PFK-1.1 materna para avanzar en la etapa del desarrollo embrionario que requiere de glucólisis. Sin embargo, en condiciones de estrés como es la exposición a *bleaching*, se pueden generar respuestas celulares adaptativas, de estrés al daño oxidativo y al ambiente hiperosmótico y cuando estos procesos ocurren durante el desarrollo temprano pueden tener efectos a largo plazo en la vida del organismo. Por lo tanto, en el escenario de que la PFK-1.1 mutante sea inestable en condiciones normales, una condición de estrés podría tener un impacto en la estabilidad de la interacción del activador con su sitio de unión en la PFK-1.1 mutante, y aumentar la proporción de proteína en estado inactivo, ya que la fructosa 2, 6-bisfosfato es necesaria para estabilizar la forma activa y aumentar la afinidad por el sustrato. En este contexto, durante la maduración de los ovocitos se incorporaría la enzima glucolítica PFK-1.1 mutante materna inactiva y luego de la fecundación y tras el desarrollo temprano de los embriones, estos se arrestan en la etapa en que el metabolismo depende principalmente de la glucólisis. Siguiendo esta lógica, otra condición de estrés que podría impedir alcanzar la conformación activa de PFK-1.1 mutante en condiciones normales de crecimiento, serían los productos generados por el envejecimiento de la gónada. Durante la maduración de los primeros ovocitos (primeros dos días de puesta), el entorno celular de la gónada sería propicio para que PFK-1.1 mutante alcance su conformación activa. Sin

embargo, en la medida en que en la gónada se acumulen productos (con el envejecimiento) que cambien el medio extracelular, podría tener consecuencias en los ovocitos y que se altere su producción de PFK-1.1.

En línea con lo anterior, el hecho de que los embriones expuestos al *bleaching* no mueran y sí haya un impacto en la viabilidad de la siguiente generación, podría deberse a que esos embriones presentan PFK-1.1 materna en su conformación tetramérica activa, y completan su desarrollo embrionario con estas reservas. Una vez que comienzan a expresar su genoma, luego de ser expuestos a *bleaching*, aumenta la probabilidad de que PFK-1.1 se encuentre en su forma inactiva.

Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la localización subcelular de PFK-1.1 en la cilia de neuronas, particularmente dentro del subcompartimento de la membrana periciliar. Por otro lado, con respecto a la estructura y funcionalidad de la cilia primaria en la estirpe mutante en el gen *pfk-1.1* (estirpe DCR3791), concluimos que el alelo mutante no afecta la capacidad de la cilia de incorporar la tinción con el compuesto DiI y esto sugiere que la estructura de la cilia no tiene alteraciones que comprometan su exposición al ambiente. Sin embargo, los resultados sugieren que el alelo mutante de *pfk-1.1* tiene un impacto en el organismo que se evidencia con el fenotipo de disminución en el éxito reproductivo de la estirpe DCR3791.

Es una perspectiva de este trabajo generar una línea transgénica que exprese *pfk-1.1::mScarlet* bajo el mismo promotor que el reportero de cilia, para que la expresión coincida en las mismas neuronas y así sea posible observar más eventos de colocalización por individuo estudiado. Para confirmar que la glucólisis ocurre dentro del PCMC, además de inferir por la morfología de la región, se puede generar una estirpe marcadora del subcompartimento ciliar en lugar de usar un marcador de toda la cilia, empleando proteínas endocíticas o de secreción que se encuentran enriquecidas allí; y evaluar en esta zona la expresión de PFK-1.1.

Adicionalmente, es importante describir la localización subcelular de la PFK-1.1 en condición de normoxia. Una manera de generar un ambiente con disponibilidad de oxígeno durante la adquisición de imágenes, es utilizar placas con fondo de vidrio, y depositar el gusano dentro de una gota de agarosa, evaluando la disponibilidad de oxígeno con el indicador redox resazurina (compuesto que emite fluorescencia bajo luz amarilla-verde al ser reducido) (O'brien et al., 2000). Para mantener la disponibilidad de O₂ durante la adquisición de imágenes también se pueden usar chips de microfluídica, que permiten controlar factores ambientales e inmovilizar los gusanos sin usar agentes químicos. Otra condición relevante para estudiar la localización de PFK-1.1 usando microchips, es estimular las cilias con señales sensoriales, regulando la concentración del odorante empleado. Esto permitiría

evaluar si, en condiciones de gran actividad ciliar, existe una variación en el patrón de expresión de la enzima.

Otra alternativa para determinar si hay glucólisis en la cilia, sería utilizar microscopía de dos fotones. Esta técnica es comúnmente empleada para estudiar el metabolismo celular *in vivo*. En este caso, se puede medir la autofluorescencia del NADH, cuyo tiempo de vida media varía según si está unido a enzimas o libre. Esto se evalúa con la técnica Phasor FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), que permite determinar la proporción relativa entre NADH libre y unido. Un alto índice de NADH libre/unido caracteriza un fenotipo glucolítico y condiciones reductoras (Stringari et al., 2012).

Para investigar si la glucólisis es necesaria en el tráfico de vesículas en la cilia primaria, se podría estudiar si la estirpe DCR3791 tiene afectada la dinámica del PCMC. Para ello, se podrían cruzar la estirpe DCR3791 con una estirpe con reportero de cilia (por ejemplo *bbs-1::gfp*), y estudiar mediante microscopía confocal la estructura de las cilias fasmídicas (cilias con estructura *single rod* y disposición fácilmente distinguible) y compararla con la estirpe silvestre. Un fenotipo que evidencia si el proceso de endocitosis en el PCMC está afectado, es la expansión de la membrana (Kaplan et al., 2012). Esta aproximación serviría como un primer paso para determinar si existe un vínculo entre la endocitosis y la glucólisis en el PCMC y también para continuar la descripción estructural de la cilia en mutantes en *pfk-1.1*.

Para evaluar si en la proximidad o dentro del PCMC existen mitocondrias, se podría utilizar un marcador de mitocondrias (como la tinta fluorescente MitoTracker) y estudiarlo en la estirpe que expresa el marcador de cilia *bbs-1::gfp*.

Para investigar la eventual formación de un metabolón glucolítico en el PCMC, se analizará otras enzimas glucolíticas. Es esencial emplear técnicas de microscopía que permitan resolver estos condensados con el mínimo fotodaño y fotoblanqueo, y que permitan el seguimiento temporal de los procesos, por ejemplo *light-sheet microscopy* (Olarte et al., 2018). Esta técnica también podría ser útil para caracterizar la endocitosis en el PCMC en los mutantes en *pfk-1.1*, siguiendo en time-lapse la dinámica de proteínas asociadas a vesículas. Un ejemplo es RAB-5, cuya dinámica ya ha sido descrita, proteína que emerge del PCMC y se transporta

a lo largo de las dendritas hacia el soma, reflejando el transporte de endomembranas en *C. elegans* (Kaplan et al., 2012).

Por último, para confirmar que el fenotipo de menor éxito reproductivo del mutante DCR3791 es causado por la mutación de interés, es necesario hacer el rescate del fenotipo silvestre en la estirpe mutante. Para ello, se inyectará en la estirpe mutante una construcción con *pfk-1.1* salvaje junto a una construcción que codifique un marcador de selección. Si los organismos que incorporen las construcciones, recuperan la viabilidad de su progenie a niveles silvestre, se confirma que el fenotipo observado se debe al gen de interés.

Referencias bibliográficas

Acevedo, C., Blanchard, K., Bacigalupo, J., y Vergara, C. (2019). Possible ATP trafficking by ATP-shuttles in the olfactory cilia and glucose transfer across the olfactory mucosa. *FEBS letters*, 593(6), 601-610. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13346>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2009a). Introduction. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2009b). Pericellular structures. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.20>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2009c). Alimentary system, overview. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.2>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2009d). Epithelial system, hypodermis. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.13>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2010a). Nervous system, general description. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.18>

Altun, Z. F., y Hall, D. H. (2010b). Nervous system, neuronal support cells. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.19>

Amaral, A. (2022). Energy metabolism in mammalian sperm motility. *WIREs Mechanisms of Disease*, 14(5), e1569. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1569>

Bargmann, C. I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>

Benmerah, A. (2013). The ciliary pocket. *Current opinion in cell biology*, 25(1), 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.10.011>

Blacque, O. E., y Sanders, A. A. (2014). Compartments within a compartment: what *C. elegans* can tell us about ciliary subdomain composition, biogenesis, function, and disease. *Organogenesis*, 10(1), 126-137. <https://doi.org/10.4161/org.28830>

Blacque, O. E., Reardon, M. J., Li, C., McCarthy, J., Mahjoub, M. R., Ansley, S. J., Badano, J. L., Mah, A. K., Beales, P. L., Davidson, W. S., Johnsen, R. C., Audeh, M., Plasterk, R. H. A., Baillie, D. L., Katsanis, N., Quarmby, L. M., Wicks, S. R., y Leroux, M. R. (2004). Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes & Development*, 18(13), 1630–1642. <https://doi.org/10.1101/gad.1194004>

Bogucka, K., y Wojtczak, L. (1966). Effect of sodium azide on oxidation and phosphorylation processes in rat-liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 122(3), 381–392. [https://doi.org/10.1016/0926-6593\(66\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0926-6593(66)90031-2)

Bowerman, B. (1998). 3 Maternal Control of Pattern Formation in Early *Caenorhabditis elegans* Embryos. *Current topics in developmental biology*, 39, 73-117. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60453-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60453-6)

C. elegans Sequencing Consortium. (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>

Campos, M., y Albrecht, L. V. (2024). Hitting the sweet spot: How glucose metabolism is orchestrated in space and time by phosphofructokinase-1. *Cancers*, 16(1), 16. <https://doi.org/10.3390/cancers16010016>

Corsi, A. K., Wightman, B., y Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1>

Cox, G. N., Laufer, J. S., Kusch, M., y Edgar, R. S. (1980). Genetic and phenotypic characterization of roller mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 95(2), 317–339. <https://doi.org/10.1093/genetics/95.2.317>

Doroquez, D. B., Berciu, C., Anderson, J. R., Sengupta, P., y Nicastro, D. (2014). A high-resolution morphological and ultrastructural map of anterior sensory cilia and glia in *Caenorhabditis elegans*. *eLife*, 3. <https://doi.org/10.7554/elife.01948>

- Durbin, R. M. (1987). *Studies on the development and organisation of the nervous system of Caenorhabditis elegans* (Disertación doctoral). University of Cambridge. <https://www.wormatlas.org/Durbin/durbinthesis.pdf>
- Edelmann, A., Kirchberger, J., Heinisch, J. J., y Kopperschläger, G. (2002). C-terminal modification of 6-phosphofructo-1-kinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its influence on enzyme structure and activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 295(4), 992-999. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00773-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00773-8)
- Edelstein, A. D., Tsuchida, M., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R.D., Stuurman, N. (2014). Advanced methods of microscope control using μ Manager software, *J. Biol. Methods*. 1 1–10. <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>
- El Mouatassim, S., Hazout, A., Bellec, V., y Menezo, Y. (1999). Glucose metabolism during the final stage of human oocyte maturation: genetic expression of hexokinase, glucose phosphate isomerase and phosphofructokinase. *Zygote*, 7(1), 45-50. <https://doi.org/10.1017/S0967199499000386>
- Evans, T. C. (Ed.). (2006). Transformation and microinjection. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.108.1>
- Fluegge, D., Moeller, L., Cichy, A. et al. Mitochondrial Ca²⁺ mobilization is a key element in olfactory signaling. *Nature Neuroscience* 15, 754–762 (2012). <https://doi.org/10.1038/nn.3074>
- Fry, A. M., Leaper, M. J., y Bayliss, R. (2014). The primary cilium: guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis*, 10(1), 62-68. <https://doi.org/10.4161/org.28910>
- Fuller, G. G., y Kim, J. K. (2021). Compartmentalization and metabolic regulation of glycolysis. *Journal of Cell Science*, 134(20). <https://doi.org/10.1242/jcs.258469>
- Gazzerro, E., Andreu, A. L., y Bruno, C. (2013). Neuromuscular disorders of glycogen metabolism. *Current neurology and neuroscience reports*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0333-0>

Goldhammer, A. R., y Paradies, H. H. (1979). Phosphofruktokinase: Structure and function. *Current Topics in Cellular Regulation*, 15, 109–139. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-152815-7.50007-7>

Hada, K., Hirota, K., Inanobe, A., Kako, K., Miyata, M., Araoi, S., Matsumoto, M., Ohta, R., Arisawa, M., Daitoku, H., Hanada, T., y Fukamizu, A. (2019). Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(9), 3091-3099. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004726>

Hammarlund, M., Hobert, O., Miller, D. M., y Sestan, N. (2018). The CeNGEN project: the complete gene expression map of an entire nervous system. *Neuron*, 99(3), 430-433. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.042>

Hobson, R. J., Yook, K. J., y Jorgensen, E. M. (2017). Genetics of neurotransmitter release in *Caenorhabditis elegans*. En M. K. Crowder (Ed.), *Reference module in life sciences* (pp. 1–13). Elsevier.

Hong, H., Chen, H., Zhang, Y., Wu, Z., Zhang, Y., Zhang, Y., Hu, Z., Zhang, J. V., Ling, K., Hu, J., y Wei, Q. (2021). DYF-4 regulates patched-related/DAF-6-mediated sensory compartment formation in *C. elegans*. *PLOS Genetics*, 17(6), e1009618. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009618>

Inglis, P. N., et al. (2007). The sensory cilia of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.126.2>

Jang, S., Nelson, J., Bend, E., Rodríguez-Laureano, L., Tueros, F. G., Cartagena, L., Underwood, K., Jorgensen, E., y Colón-Ramos, D. A. (2016). Glycolytic enzymes localize to synapses under energy stress to support synaptic function. *Neuron*, 90(2), 278–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.011>

Jang, S., Xuan, Z., Lagoy, R. C., Jawerth, L. M., González, I. J., Singh, M., Prashad, S., Kim, H. S., Patel, A., Albrecht, D. R., Hyman, A. A., y Colón-Ramos, D. A. (2020).

Phosphofructokinase relocalizes into subcellular compartments with liquid-like properties in vivo. *Biophysical Journal*, 120(7), 1170–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.002>

Jin, M., Fuller, G. G., Han, T., Yao, Y., Alessi, A. F., Freeberg, M. A., Roach, N. P., Moresco, J. J., Karnovsky, A., Baba, M., Yates, J. R., Gitler, A. D., Inoki, K., Klionsky, D. J., y Kim, J. K. (2017). Glycolytic enzymes coalesce in G bodies under hypoxic stress. *Cell Reports*, 20(4), 895–908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.082>

Johnson, J. L. F., y Leroux, M. R. (2010). cAMP and cGMP signaling: sensory systems with prokaryotic roots adopted by eukaryotic cilia. *Trends in cell biology*, 20(8), 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.05.005>

Kaplan, O. I., Doroquez, D. B., Cevik, S., Bowie, R. V., Clarke, L., Sanders, A. A., ... y Blacque, O. E. (2012). Endocytosis genes facilitate protein and membrane transport in *C. elegans* sensory cilia. *Current Biology*, 22(6), 451-460. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.060>

Lambert, T. J. (2019). FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nature methods*, 16(4), 277-278. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>

Li, Y., Rivera, D., Ru, W., Gunasekera, D., y Kemp, R. G. (1999). Identification of allosteric sites in rabbit phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*, 38(49), 16407-16412 <https://doi.org/10.1021/bi9917611>

Liberti, M. V., y Locasale, J. W. (2016). The Warburg effect: how does it benefit cancer cells?. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>

Lim, C. (2023). The effects of glycolytic mutations in *Drosophila melanogaster* muscle development (Tesis de licenciatura, CUNY Bernard M. Baruch College). *CUNY Academic Works*. https://academicworks.cuny.edu/bb_etds/182

Lints, R., y Hall, D. H. (2009a). Reproductive system, germ line. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.23>

Lints, R., y Hall, D. H. (2009b). Male introduction. *WormAtlas*.
<https://doi.org/10.3908/wormatlas.2.1>

Long, H., y Huang, K. (2020). Transport of ciliary membrane proteins. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 381. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00381>

Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, Sugimoto A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Current Biology*. 11(3), 171-176.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00052-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00052-5)

Marchal, I., y Tursun, B. (2021). Regulation of synaptic transmission by presynaptic autophagy and its impact on neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 771687. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.771687>

Mercey, O., Mukherjee, S., Guichard, P., y Hamel, V. (2024). The molecular architecture of the ciliary transition zones. *Current Opinion in Cell Biology*, 88, 102361. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2024.102361>

Mizeracka, K., y Heiman, M. G. (2015). The many glia of a tiny nematode: studying glial diversity using *Caenorhabditis elegans*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(2), 151-160. <https://doi.org/10.1002/wdev.171>

Müller M, Mentel M, van Hellemond JJ, Henze K, Woehle C, Gould SB, Yu R, van der Giezen M, Tielens AGM, Martin WF.2012.Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(2), 444-495. <https://doi.org/10.1128/mnbr.05024-11>

Moruzzi N, Valladolid-Acebes I, Kannabiran SA, Bulgaro S, Burtscher I, Leibiger B, Leibiger IB, Berggren PO, Brismar K (2012). Mitochondrial impairment and intracellular reactive oxygen species alter primary cilia morphology. *Life Science Alliance* 5(12). <https://doi.org/10.26508/lsa.202201505>

Musumeci O, Bruno C, Mongini T, Rodolico C, Aguenouz M, Barca E, Amati A, Cassandrini D, Serlenga L, Vita G, Toscano A. (2012). Clinical features and new molecular

findings in muscle phosphofructokinase deficiency (GSD type VII). *Neuromuscular Disorders*, 22(4), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.10.022>

Nechipurenko, I. V., y Sengupta, P. (2017). The rise and fall of basal bodies in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cilia*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s13630-017-0053-9>

Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan Learning.

Nikonorova, I. A., Wang, J., Cope, A. L., Tilton, P. E., Power, K. M., Walsh, J. D., Akella, J. S., Krauchunas, A. R., Shah, P., y Barr, M. M. (2022). Isolation, profiling, and tracking of extracellular vesicle cargo in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 32(10), 1924–1936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.005>

O'brien, J., Wilson, I., Orton, T., y Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry*, 267(17), 5421-5426.

Oikonomou, G., y Shaham, S. (2011). The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*, 59(9), 1253–1263. <https://doi.org/10.1002/glia.21084>

Olarte, O. E., Andilla, J., Gualda, E. J., y Loza-Alvarez, P. (2018). Light-sheet microscopy: a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 10(1), 111-179. <https://doi.org/10.1364/AOP.10.000111>

Olivier-Mason, A., Wojtyniak, M., Bowie, R. V., Nechipurenko, I. V., Blacque, O. E., y Sengupta, P. (2013). Transmembrane protein OSTA-1 shapes sensory cilia morphology via regulation of intracellular membrane trafficking in *C. elegans*. *Development*, 140(7), 1560-1572. <https://doi.org/10.1242/dev.086249>

Pazour, G. J., Agrin, N., Leszyk, J., y Witman, G. B. (2005). Proteomic analysis of a eukaryotic cilium. *The Journal of Cell Biology*, 170(1), 103-113. <http://www.jstor.org/stable/3658264>

Potter, M., Newport, E., y Morten, K. J. (2016). The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions*, 44(5), 1499-1505. <https://doi.org/10.1042/bst20160094>

Renken, C. J., Kim, S., Wu, Y., Hammarlund, M., y Yogev, S. (2024). Cytoplasmic ribosomes hitchhike on mitochondria to dendrites. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.13.612863>

Riboul, D. V., Crill, S., Oliva, C. D., Restifo, M. G., Joseph, R., Joseph, K., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H., Fily, Y., y Macleod, G. T. (2024). Ultrastructural analysis reveals mitochondrial placement independent of synapse placement in fine caliber *C. elegans* neurons. *Journal of Comparative Neurology*, (12), 10969861. <https://doi.org/10.1002/cne.70002>

Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 9 676–682. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Serre, M. C., y Garel, J. R. (1990). Role of the C-terminal region in the allosteric properties of *Escherichia coli* phosphofructokinase-1. *European journal of biochemistry*, 189(3), 487-492. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15513.x>

Sönnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.-M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., ... Echeverri, C. J. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434, 462–469 (2005). <https://doi.org/10.1038/nature03353>

Sternberg, P. W., Van Auken, K., Wang, Q., Wright, A., Yook, K., Zarowiecki, M., Arnaboldi, V., Becerra, A., Brown, S., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Cho, J., Davis, P., Diamantakis, S., Dyer, S., Grigoriadis, D., Grove, C. A., Harris, T., Howe, K., ... Stein, L. (2024). *WormBase 2024: Status and transitioning to Alliance infrastructure*. *Genetics*, 227(1), iyae050. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae050>

Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* (2006), *WormBook*, <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>

Stratagene. (2004). *XL1-Blue competent cells: Manual* (Rev. #074003). Stratagene.

Stringari, C., Nourse, J. L., Flanagan, L. A., y Gratton, E. (2012). Phasor Fluorescence Lifetime Microscopy of Free and Protein-Bound NADH Reveals Neural Stem Cell Differentiation Potential. *PLoS ONE*, 7(11), e48014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048014>

Sulston, J., y Hodgkin, J. (1988). Methods. En W. W. Wood (Ed.), *The Nematode Caenorhabditis elegans* (587-606). Cold Spring Harbor Laboratory.

Tennessen, J. M., Bertagnolli, N. M., Evans, J., Sieber, M. H., Cox, J., y Thummel, C. S. (2014). Coordinated metabolic transitions during *Drosophila* embryogenesis and the onset of aerobic glycolysis. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(5), 839-850. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010652>

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). *Vybrant™ DiI Cell-Labeling Solution*. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V2288>

Traut, T. W. (2008). *Allosteric Regulatory Enzymes*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-72891-9>

Turani, O. (2020). Receptores *cys-loop* de *Caenorhabditis elegans*: búsqueda de nuevos fármacos. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional del Sur. <http://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/5577>

The UniProt Consortium. (2025). UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025, *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D609–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1010>

Villar, P. S., Delgado, R., Vergara, C., Reyes, J. G., y Bacigalupo, J. (2017). Energy requirements of odor transduction in the chemosensory cilia of olfactory sensory neurons rely on oxidative phosphorylation and glycolytic processing of extracellular glucose. *The Journal of Neuroscience*, 37(23), 5736–5743. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2640-16.2017>

Villar, P. S., Vergara, C., y Bacigalupo, J. (2020). Energy sources that fuel metabolic processes in protruding finger-like organelles. *FEBS Journal*, 288(12), 3799–3812. <https://doi.org/10.1111/febs.15620>

- Wang, J., Silva, M., Haas, L. A., Morsci, N. S., Nguyen, K. C. Q., Hall, D. H., y Barr, M. M. (2014). *C. elegans* ciliated sensory neurons release extracellular vesicles that function in animal communication. *Current Biology*, 24(5), 519-525. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.002>
- Ward, S., Argon, Y., y Nelson, G. A. (1981). Sperm morphogenesis in wild-type and fertilization-defective mutants of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 91(1), 26-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.1.26>
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., y Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* (The mind of a worm). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1165), 1–340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Wolkow, C. A., y Hall, D. H. (2015). Introduction to the Dauer Larva, overview. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.3.10>
- Zecchin, A., Stapor, P. C., Goveia, J. y Carmeliet, P. (2015). Metabolic pathway compartmentalization: An underappreciated opportunity? *Current Opinion in Biotechnology* 34, 73–81 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.02>

