

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



**La familia de *mir-58* y el correceptor SMA-10 como moduladores
de la señalización por TGF β en *Caenorhabditis elegans***

MARÍA PILAR DE LUCAS LÓPEZ

Madrid, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**La familia de *mir-58* y el correceptor SMA-10 como moduladores
de la señalización por TGF β en *Caenorhabditis elegans***

MARÍA PILAR DE LUCAS LÓPEZ

Licenciada en Biología

Directora de Tesis:

DRA. ENCARNACIÓN LOZANO PÉREZ

Instituto de Salud Carlos III

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Biología Celular de la Unidad Funcional de Investigación en Enfermedades Crónicas (UFIEC), en el campus de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Madrid, 2015



La Dra. Encarnación Lozano Pérez,

CERTIFICA que: **María Pilar de Lucas López**, licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación titulado: **“La familia de *mir-58* y el correceptor SMA-10 como moduladores de la señalización por TGF β en *Caenorhabditis elegans*”**

En mi opinión, este trabajo de investigación reúne todas las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Majadahonda (Madrid), a 15 de Mayo de 2015.

Fdo. DRA. ENCARNACIÓN LOZANO PÉREZ

Vº Bº del Tutor: DR. MIGUEL QUINTANILLA ÁVILA

AGRADECIMIENTOS



El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido financiado por:

- Proyecto PI080642 del Subprograma de proyectos de Investigación en Salud de las ayudas de la Acción Estratégica en Salud, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación tecnológica 2008-2011: **“Regulación de la ruta de TGF β por microRNAs en *Caenorhabditis elegans*”**.
Periodo: Enero 2008 – Diciembre 2011.
Investigador Principal: Encarnación Lozano.
- Proyecto PI110120 del Subprograma de proyectos de Investigación en Salud de las ayudas de la Acción Estratégica en Salud, en el marco del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación tecnológica 2008-2011: **Interacciones microRNA/TGF β en *Caenorhabditis elegans* (*cel-miR-58*) y humanos (*hsa-miR-450*)**.
Periodo: Enero 2012 – Diciembre 2014.
Investigador Principal: Encarnación Lozano.
- Contrato Laboral de Titulado Superior de Actividades Técnicas y Profesionales asociado al proyecto PI080642.
Periodo: Agosto 2009 – Mayo 2011.
- Beca Predoctoral FPU AP2009-3518. Financiada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.
Periodo: Mayo 2011 – Mayo 2015.

AGRADECIMIENTOS

Para poder llegar hasta aquí, el apoyo científico y personal de muchas personas ha sido imprescindible.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi directora de tesis, Dra. Encarnación Lozano, la confianza puesta en mí para poder desarrollar este trabajo y por haberme presentado a este pequeño y gran modelo que es *Caenorhabditis elegans*. También quiero agradecer a los compañeros que han ido pasando por el grupo de “gusanos”: al Dr. Alberto García Sáez por enseñarme a justificar cada resultado. A Ana Magro por su ayuda en mis primeras etapas con los nematodos y en las siguientes con todo lo demás. A las estudiantes que contribuyeron experimentalmente y a “reilusionarme” con la ciencia: Marta, Karima y Amaia. A Jéssica Diogo por amenizar el trabajo con su estancia.

Igualmente quiero agradecer al Dr. José María Rojas habernos acogido en su laboratorio todos estos años y haberme ayudado en muchos aspectos de este trabajo. Al Dr. Miguel Calero por su papel decisivo en la última etapa. A la Dra. Natalia Martínez por su ayuda a nivel personal y científico durante este periodo, que ha sido indispensable en numerosas ocasiones; mil gracias. Al Dr. José Luis Oliva por su apoyo y aprecio inestimables. A la Dra. Victoria López por sus consejos y ayuda en todos los aspectos. A la Dra. Berta Anta, porque su opinión científica siempre es un referente; ha sido un placer compartir la zona de poyata contigo. A Judit Castro, por lo grande que es y todo lo que me ha enseñado; mil gracias por todo. A la Dra. Carlota García Domínguez por todas sus contribuciones científicas y más allá de la ciencia; ha sido un placer conocerte. A la Dra. Lara Durá, compañera de situación, siempre dispuesta para echar un cable o unas risas. Al resto de la Unidad de Biología Celular de hoy y de ayer por contribuir al progreso científico de esta tesis y al mío como persona: Natasha, Teresa, Dani, Yolanda, Diana, Silvia, María Ángeles, Anabel, Carlos’ y Adrián. Muchas gracias a todos.

Al ISCIII y al Ministerio de Educación por subvencionar este trabajo y hacer posible mi papel en este campo de investigación. A la UFIEC por subvencionar este manuscrito y parte de los reactivos utilizados para desarrollar este trabajo.

Al Dr. Óscar Zaragoza por introducirme en el mundo de la inmunidad de *C. elegans* frente a *Candida*. A Lili, Ana, Luís y Rocío por compartir tantos ensayos de inmunidad con las levaduras.

Al laboratorio de Inmunología: Dr. Alfredo Toraño, Dra. Mercedes Domínguez, Dra. Inmaculada Moreno, José, Ana, Sole y Nacho. Gracias por ser un apoyo incondicional y amenizar la estancia.

A María Jesús y a Mónica por toda la ayuda prestada y su eficacia administrativa.

A los compañeros de los servicios de Genómica, Medios, Microscopía Confocal, Seguridad y Limpieza.

A mis jefes anteriores: Dr. Federico Navarro, Dr. Juan Carlos Gutiérrez y Dra. Ana Martín. Gracias por la oportunidad que me disteis y todo lo que me enseñasteis. A mis antiguos compañeros de laboratorio, ni os

imagináis todo lo que aprendí de vosotros y lo que os he echado de menos. Paco, Ruth, Andrea y Pili: mil gracias.

Me gustaría terminar mencionando a aquellos que no están y que siempre han confiado en mí: mis abuelos, Pilar y Ramón, y mi padre. Cada uno de ellos se fue en un momento diferente de mi formación, pero todos ellos han contribuido a que yo llegara hasta aquí. Siento que esta tesis haya llegado demasiado tarde y que mi padre no pueda estar presente en este momento. Si no hubiera sido por él, esta meta no habría sido posible. Este trabajo también es suyo.

También quiero hacer una mención especial a Álvaro y a mi madre por todo lo que han hecho por mí, sobre todo aguantarme y apoyarme en este último periodo, que ha sido especialmente duro; ni os imagináis todo lo que me habéis ayudado. A Cati y Armando, por acogerme como a una hija. A mi hermano, porque sus discusiones me han servido para seguir creciendo; aprovecha todo lo que vales. A la familia que ha estado y a la que se ha ido: todos me habéis enseñado algo. A las personas que me han brindado toda su ayuda cuando más la necesitaba: Fernando, Paloma y Luz. Gracias por haber estado ahí.

A los que os fuisteis y a los que quedáis, muchas gracias.

**El tiempo es la cosa más valiosa que una persona
puede gastar.**

Theophrastus (300-287 a.C.)

A mi padre

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

La señalización celular controlada por la superfamilia de “Transforming Growth Factor β ” (TGF β) tiene un papel clave tanto en el desarrollo embrionario como en la homeostasis celular de los tejidos adultos. Aunque el funcionamiento básico de las rutas de TGF β es conocido, no lo es tanto su modulación, por ejemplo por parte de los microRNAs o de diversos correceptores de membrana plasmática. Debido al protagonismo de las rutas de TGF β en numerosos procesos biológicos y patológicos, la investigación sobre los moduladores de TGF β comprende un campo importante, tanto desde un punto de vista biológico como biomédico. Como la señalización por TGF β está relativamente conservada evolutivamente, hemos elegido el nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental. En *C. elegans* existen dos rutas de TGF β conocidas: TGF β Sma/Mab, implicada en la adquisición del tamaño corporal, entre otros procesos; y TGF β Dauer, que regula la entrada en el estadio de resistencia conocido como dauer. Hemos encontrado dos nuevos reguladores de la señalización de TGF β : la familia de microRNAs de *mir-58* y el correceptor SMA-10.

En cuanto a la familia de *mir-58*, el mutante disponible para cuatro de los cinco miembros de esta familia de microRNAs es pequeño e incapaz de formar dauers. Nuestros resultados indican que la familia de *mir-58* inhibe, mediante su unión a los 3'UTRs, la expresión de los mRNAs de *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1*, todos ellos miembros clave y reguladores positivos, de las rutas TGF β Sma/Mab y/o TGF β Dauer. Hemos comprobado que, consistentemente con lo anterior, ambas rutas están sobreexpresadas en el mutante de la familia de *mir-58*. Experimentos epistáticos sugieren que la incapacidad de producir dauers de dicho mutante es debida a la sobreexpresión de TGF β Dauer. En cambio, aunque la familia de *mir-58* inhibe el crecimiento a través de TGF β Sma/Mab, estos microRNAs tienen un efecto predominantemente promotor del tamaño corporal de forma independiente a TGF β Sma/Mab. Asimismo, por lo que respecta a la regulación de la familia de *mir-58*, hemos observado que la expresión de dos de sus miembros, *mir-58* y *mir-80*, está, a su vez, positivamente controlada por TGF β Sma/Mab, creando así un bucle regulatorio negativo entre estos microRNAs y TGF β Sma/Mab.

También hemos encontrado que la proteína transmembrana SMA-10 participa de la ruta TGF β Sma/Mab como regulador positivo del tamaño corporal de *C. elegans*, aunque este resultado ha sido publicado de forma independiente durante el transcurso de esta tesis. Nuestro trabajo muestra que SMA-10 es un componente dispensable en la señalización por TGF β Sma/Mab: mientras que regula algunos fenotipos de la ruta como el tamaño corporal o el periodo reproductivo, no afecta a otros fenotipos regulados por TGF β Sma/Mab, como la longevidad o inmunidad. Finalmente, hemos descubierto que SMA-10 tiene un papel inmunoprotector, dependiente de la ruta de Insulina, actuando corriente arriba de su único receptor en nematodos, DAF-2.

ABSTRACT

Transforming Growth Factor β (TGF β) comprises a family of protein ligands involved in a wide range of animal processes, which play a key role in development and cellular homeostasis. Although the basic elements of the TGF β signaling pathway are well known, there are also many side regulators, such as microRNAs and transmembrane coreceptors, which need to be investigated. Since TGF β signaling is key to so many biological and pathological processes, it is important to study in detail those regulators. Given the relative evolutionary conservation of TGF β pathways, we have tried to discover new TGF β regulators using the model organism *Caenorhabditis elegans*. Two TGF β pathways are known in *C. elegans*: TGF β Sma/Mab, involved in many phenotypes such as body size, and TGF β Dauer, which controls the decision to enter an alternative larval stage known as dauer, designed to resist harsh environmental conditions. We have found two new TGF β regulators, the microRNA family *mir-58* and the transmembrane protein SMA-10.

It is known that a *mir-58* family mutant, which lacks four of its five members, is small and dauer defective. Our results show that *mir-58* family inhibits the expression of *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* and *daf-1* mRNAs through their 3'UTRs. All these mRNAs are key members, and positive regulators, of TGF β Sma/Mab and/or TGF β Dauer. In agreement, we have found that both TGF β pathways are upregulated in the *mir-58* family mutant. Our epistatic analyses suggest that the dauer defectiveness of the *mir-58* family mutant is caused by an overexpression of TGF β Dauer. In contrast, the small size of the *mir-58* family mutant is unrelated to TGF β Sma/Mab. We have discovered that, independently of the overall positive role on body size, *mir-58* family also shows an additional inhibitory role on growth, which depends on its interaction with TGF β Sma/Mab. Moreover, in relation to *mir-58* family regulation, we show that TGF β Sma/Mab, in turn, positively controls the expression of two members of this family, *mir-58* and *mir-80*. Therefore a negative feedback loop is present between those microRNAs and TGF β Sma/Mab.

We also found that the transmembrane protein SMA-10 is a positive regulator of *C. elegans* body size, although this result was published after we discovered it independently. Our research shows that SMA-10 is not an obligated member of the TGF β Sma/Mab signaling: while this coreceptor participates of some of the phenotypes controlled by that pathway, i.e. body size and reproductive span, it does not of other TGF β Sma/Mab functions, i.e. longevity and immunity. Additionally, we show that SMA-10 plays a new role in immunity, dependent on the insulin pathway and upstream of the insulin receptor DAF-2.

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	I
ÍNDICE	V
ABREVIATURAS	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. TGFβ (Transforming Growth Factor β)	1
1.1. Ruta TGFβ Sma/Mab	2
1.1.1. Control del tamaño por TGFβ Sma/Mab	4
1.1.2. TGFβ Sma/Mab controla la longevidad y la reproducción de forma independiente	5
1.1.3. TGFβ Sma/Mab y otras rutas involucradas en inmunidad	5
1.2. Ruta TGFβ Dauer	7
2. miRNAs	9
2.1. Biogénesis, modo de actuación y regulación	9
2.2. miRNAs en <i>C. elegans</i>	11
2.2.1. La familia de <i>mir-58</i>	11
3. TGFβ y miRNAs	13
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. MATERIALES	19
1.1. Cepas y condiciones de cultivo	19
1.2. Medios de cultivo y otras soluciones	20
1.3. Vectores de clonación	21
1.4. Cebadores	22
2. MÉTODOS	25
2.1. Combinación de cepas de <i>C. elegans</i>	25
2.2. Construcciones plasmídicas	25
2.2.1. Reporteros para la cuantificación de la capacidad inhibitoria entre la familia de <i>mir-58</i> y los 3'UTRs de sus genes diana	25
2.2.1.1. Ensayos de luciferasa	25
2.2.1.2. Ensayos <i>in vivo</i>	26
2.2.2. Sobreexpresión de genes	26

2.2.3. Reporteros de la actividad promotora de <i>sma-6</i> y <i>sma-10</i>	27
2.2.4. Reportero para la detección de núcleos hipodérmicos de <i>hyp 7</i>	27
2.3. Ensayos de la actividad 3'UTR-miRNA mediante luciferasa en células <i>HeLa</i>	27
2.4. Silenciamiento génico mediante RNAi	28
2.5. Obtención de transgénicos	29
2.6. Cuantificación de los niveles de fluorescencia	31
2.7. Determinación de la longitud máxima de los nematodos	31
2.8. Cuantificación de las células precursoras de la hipodermis y de los núcleos de <i>hyp 7</i>	32
2.9. Cuantificación de la ploidía	32
2.10. Ensayos de dauer	33
2.11. Caracterización morfológica de dauer	33
2.12. Cuantificación de mRNAs y miRNAs mediante qRT-PCR	33
2.13. Ensayos de longevidad	34
2.14. Análisis del periodo reproductivo	34
2.15. Ensayos de inmunidad	34
2.16. Búsqueda informática de genes diana de miRNAs	35
RESULTADOS	37
1. La familia de <i>mir-58</i> y TGFβ	37
1.1. Genes de las rutas TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer son posibles genes diana de <i>mir-58f</i>	37
1.2. Los receptores y ligandos de TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer están sobreexpresados en mutantes de <i>mir-58f</i>	38
1.3. ¿Están los receptores y ligandos de las rutas TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer regulados directamente por <i>mir-58f</i> ?	39
1.4. <i>mir-58f</i> y el control del tamaño corporal	42
1.4.1. Los mutantes de <i>mir-58f</i> tienen una elevada actividad de TGF β Sma/Mab	43
1.4.2. ¿La señalización a través de TGF β Sma/Mab explica el menor tamaño de los mutantes <i>mir-58f(-)</i> ?	44
1.4.3. <i>mir-58f</i> inhibe el tamaño de los nematodos a través de TGF β Sma/Mab	46
1.4.4. La regulación del tamaño por <i>mir-58</i> está dirigida por varios tejidos	47
1.4.5. ¿Tienen los mutantes <i>mir-58f(-)</i> alterados otros genes determinantes del tamaño corporal?	48
1.4.6. ¿Tienen los mutantes <i>mir-58f(-)</i> alterada la proliferación de las células precursoras de la hipodermis?	49
1.5. <i>mir-58f</i> y el control de entrada en dauer	50
1.5.1. Los mutantes <i>mir-58f(-)</i> tienen inducida la ruta TGF β Dauer	50

1.5.2. La ausencia del receptor DAF-1 rescata el fenotipo de entrada en dauer en los mutantes <i>mir-58f(-)</i>	52
1.5.3. ¿Está reducida la actividad de la ruta de Insulina en <i>mir-58f(-)</i> ?.....	53
1.5.4. La sobreexpresión de <i>mir-58</i> en hipodermis restaura el fenotipo de entrada en dauer de <i>mir-58f(-)</i>	57
1.6. TGFβ Sma/Mab regula la expresión de <i>mir-58</i> y <i>mir-80</i>	58
2. SMA-10	61
2.1. SMA-10 contribuye al tamaño de <i>C. elegans</i> a través de TGFβ Sma/Mab	61
2.2. SMA-10 no regula la longevidad mediada por TGFβ Sma/Mab	63
2.3. SMA-10 controla el envejecimiento reproductivo a través de TGFβ Sma/Mab	64
2.4. SMA-10 tiene un papel independiente de la ruta TGFβ Sma/Mab en el control de la inmunidad	65
2.4.1. La expresión de SMA-10 en intestino o hipodermis es suficiente para conferir resistencia a <i>P. aeruginosa</i>	66
2.4.2. <i>P. aeruginosa</i> no induce la expresión de <i>sma-10</i>	67
2.4.3. SMA-10 modula la respuesta inmune a través de DAF-2	69
DISCUSIÓN	73
1. La familia de <i>mir-58</i> y TGFβ	73
1.1. <i>mir-58f</i> y TGFβ Sma/Mab	74
1.1.1. <i>dbl-1</i> , <i>sma-6</i> y <i>daf-4</i> son genes diana de <i>mir-58f</i>	74
1.1.2. El fenotipo de tamaño de <i>mir-58f(-)</i>	75
1.1.2.1. <i>mir-58</i> como modulador positivo del tamaño	76
1.1.2.2. <i>mir-80</i> como modulador positivo del tamaño	77
1.1.2.3. Genes diana que influyen en el tamaño de <i>mir-58f(-)</i>	78
1.2. <i>mir-58f</i> y TGFβ Dauer	79
1.2.1. <i>daf-1</i> también es un gen diana de la familia de <i>mir-58f</i>	79
1.2.2. La activación de TGFβ Dauer explica el fenotipo defectivo de entrada en dauer de <i>mir-58f(-)</i>	80
1.3. Bucle regulatorio entre TGFβ y la familia de <i>mir-58f</i>	81
2. SMA-10	82
2.1. SMA-10 como modulador facultativo de la ruta TGFβ Sma/Mab	82
2.1.1. Tamaño corporal	82
2.1.2. SMA-10 y el envejecimiento	83
2.2. SMA-10 como modulador negativo de la ruta de Insulina	84

CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO I	103
Parte I: Figuras y Tablas adicionales	103
Figuras	103
Tablas	108
Parte II: Alineamientos de la familia de <i>mir-58</i> con los 3'UTRs candidatos	112
1. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>dbl-1</i>	112
2. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>sma-6</i>	112
3. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>daf-4</i>	113
4. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>daf-1</i>	115
5. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>daf-7</i>	116
6. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>mcm-4</i>	117
7. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>cyb-1</i>	118
8. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>cyb-2.2</i>	118
9. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>daf-25</i>	119
10. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>daf-16</i>	119
11. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>ins-1</i>	120
12. Unión de la familia de <i>mir-58</i> al 3'UTR de <i>ins-17</i>	121
Parte III: Cepas generadas en este trabajo	122
ANEXO II	129
Publicaciones durante el periodo de tesis	129

ABREVIATURAS

3'UTR	región 3' no traducible – <i>3' untranslated region</i>
5'UTR	región 5' no traducible – <i>5' untranslated region</i>
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas – <i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
C	contenido de DNA de un núcleo haploide
cDNA	DNA complementario – <i>complementary DNA</i>
cel	Relativo a <i>Caenorhabditis elegans</i>
ceRNA	RNA endógeno competitivo – <i>competing endogenous RNA</i>
CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
cGMP	Guanosín Monofosfato cíclico – <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
Cr.	Cromosoma
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol – <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dme	Relativo a <i>Drosophila melanogaster</i>
dsRNA	RNA de cadena doble – <i>double-stranded RNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico – <i>deoxyribonucleic acid</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico – <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Receptor de EGF – <i>EGF Receptor</i>
F1	Primera generación filial
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos – <i>Fibroblast growth factor Receptor</i>
FUdR	5-fluoro-2'-deoxyuridina – <i>5-fluoro-2'-deoxyuridine</i>
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación– <i>Growth and differentiation factor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente – <i>Green fluorescent protein</i>
hsa	Relativo a <i>Homo sapiens</i>
Ig	Inmunoglobulina
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido – <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LRIG	LRRs y dominios tipo Ig – <i>LRRs and Ig-like domains</i>
LRR	Repeticiones ricas en leucinas – <i>leucine-rich repeats</i>
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos – <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MIF	Factor inhibidor mülleriano – <i>Müllerian inhibiting factor</i>
<i>mir-58f</i>	Familia de <i>mir-58</i>
miRISC	Complejo silenciador inducible por miRNA – <i>miRNA-mediated silencing complex</i>
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero – <i>messenger RNA</i>

ABREVIATURAS

MUT	mutado
n	tamaño de la muestra
NF-kB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas – <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGM	Medio de crecimiento de nematodos – <i>Nematode growth medium</i>
nt	nucleótido
<i>p</i>	probabilidad
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa – <i>Polymerase chain reaction</i>
Poli A	Poliadenosinas
pre-miRNA	miRNA precursor – <i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	miRNA primario – <i>primary miRNA</i>
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa – <i>Quantitative RT-PCR</i>
RFP	Proteína roja fluorescente – <i>Red fluorescent protein</i>
RGM	Molécula de Orientación Repulsiva – <i>repulsive guidance molecule</i>
RISC	Complejo Silenciador Inducible por RNA – <i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	RNA de interferencia – <i>RNA interference</i>
RT-PCR	Transcripción reversa y PCR – <i>Reverse Transcription-PCR</i>
TF	Factor de Transcripción – <i>Transcription Factor</i>
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante β – <i>Transforming Growth Factor β</i>
WT	silvestre – <i>wild type</i>

INTRODUCCIÓN

1. TGF β (Transforming Growth Factor β)

La superfamilia de factores de crecimiento TGF β es crucial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los metazoos^{213, 221}. Todos los componentes de la ruta gobernada por estos ligandos están altamente conservados en la evolución y regulan diversas funciones celulares como el crecimiento, adhesión, migración, apoptosis y diferenciación^{177, 221}. Alteraciones en la señalización a través de estas rutas son origen de diversas enfermedades, por lo que el estudio detallado de su funcionamiento es clave para combatirlas^{156, 177, 213, 221}.

Los ligandos TGF β son sintetizados como precursores, que han de ser procesados por proteasas para poder ser funcionales^{213, 221}. Forman dímeros que son reconocidos por un complejo receptor heterotetramérico localizado en la membrana plasmática, constituido por dos tipos de receptores serín treonín quinasa (tipo I y tipo II), aunque en algunos casos también pueden participar otros correceptores para regular la unión del ligando. Una vez que se une el factor de crecimiento, el receptor tipo II constitutivamente activo fosforila al de tipo I, activándolo y haciéndolo reconocible por sus substratos, los Smads regulados por receptores (R-Smads). Los R-Smads se activan mediante fosforilación y forman complejos heteroméricos con Co-Smads (Smads mediadores comunes), que entrarán en el núcleo para regular la transcripción (Figura I-1)^{66, 213, 221}.

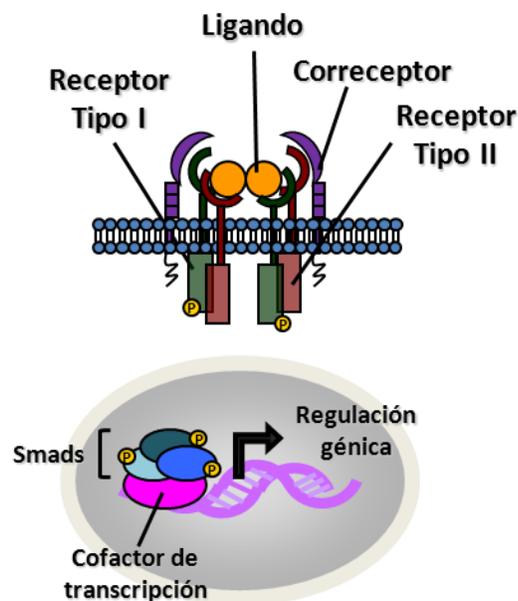


Figura I-1: Esquema de los componentes de la ruta de TGF β . Tras la unión de TGF β al complejo receptor de la membrana plasmática, se activan los factores de transcripción Smads que regulan la transcripción de genes en el núcleo.

El contexto tisular en el que se produce la señalización por TGF β es determinante para que se desencadenen respuestas celulares específicas. Por lo tanto, su señalización está estrechamente regulada a diferentes niveles^{59, 139, 177}. En un primer nivel, la variabilidad en la respuesta radica en la diversidad de

ligandos y su expresión diferencial. En humanos, la superfamilia de TGF β comprende más de 30 ligandos, que se pueden dividir en subfamilias en función de su similitud en secuencia y función: TGF β s, BMPs, GDFs, MIF, activinas o inhibinas^{139, 177}. Estos ligandos, una vez activos, también pueden estar secuestrados por otras proteínas que inhiben la unión al complejo receptor. A su vez, muchos de estos ligandos pueden asociarse con varios complejos receptores, compuestos por diferentes receptores de tipo I y II. En concreto, se han descrito siete receptores tipo I y cinco receptores tipo II en humanos, cuyos niveles de expresión determinan la presencia de cada uno de ellos en la membrana plasmática. Además, en la unión del ligando a su complejo receptor pueden intervenir correceptores que modulen específicamente esta interacción, como Betaglicano, Endoglina o RGM^{59, 177, 221}. Aunque los correceptores fueran definidos originalmente por su papel facilitador o promotor de la unión del ligando al complejo receptor, estudios recientes han añadido funciones adicionales como reguladores de la localización e internalización del complejo receptor o como antagonistas de la acción del ligando⁵⁹. Por último, esta regulación a nivel extracelular también está acompañada por una compleja regulación intracelular a nivel de Smads y pone de manifiesto la enorme complejidad de la señalización por la superfamilia de TGF β ^{59, 139, 177}.

La superfamilia de TGF β es menos numerosa en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*⁶⁶, lo que ofrece una ventaja experimental para su estudio. Además, desde que Sydney Brenner publicara otras ventajas de *C. elegans* como organismo modelo para la investigación²², este nematodo ha servido para identificar muchos componentes de rutas de señalización que posteriormente han sido validados en humanos^{25, 106, 161}. Su genoma codifica únicamente para cinco ligandos tipo TGF β , aunque sólo se ha descrito con detalle el mecanismo de señalización para dos de ellos: DBL-1 y DAF-7. Un tercer ligando, UNC-129, se une a un receptor de netrina (UNC-5) y no se han descrito ni receptores ni Smads convencionales. A los otros dos ligandos restantes, TIG-2 y TIG-3, todavía no se les ha asignado una función biológica⁶⁶. Las dos rutas de TGF β descritas en *C. elegans* para DBL-1 y DAF-7 son TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer, respectivamente.

1.1. Ruta TGF β Sma/Mab

La ruta TGF β Sma/Mab se describió originariamente como responsable del control del tamaño (Sma – *small*) y de la morfología de la cola de los machos (Mab – *Male abnormal*)^{146, 193}. Más tarde, se observó que esta ruta es pleiotrópica, con implicaciones en otros aspectos fundamentales de la biología del nematodo como la resistencia frente a infecciones de patógenos¹³⁶, la longevidad¹³⁴, la duración del periodo reproductivo¹³⁴ o el aprendizaje²³¹.

El ligando de la ruta TGF β Sma/Mab es DBL-1 y su complejo receptor está formado por un receptor de tipo I específico de la ruta, SMA-6¹¹³, y otro de tipo II, también común a la ruta TGF β Dauer, DAF-4⁴⁴. La señalización intracelular de TGF β Sma/Mab está gobernada por los factores de transcripción R-Smad SMA-2

y SMA-3 y el Co-Smad SMA-4¹⁷⁸ que, una vez activos en el núcleo, se unen a otros cofactores de transcripción (SMA-9, LIN-31, MAB-31) para regular la expresión génica⁶⁶.

La regulación de la transcripción del ligando DBL-1 de TGFβ Sma/Mab es una cuestión sólo parcialmente esclarecida. Kratsios y colaboradores han descrito que está regulada por el factor de transcripción UNC-3 en neuronas motoras¹¹², lo que está en concordancia con la función que ejerce TGFβ Sma/Mab en las sinapsis neuromusculares, observada por otros autores²⁰⁸. El factor de transcripción CEH-28 también regula la transcripción de DBL-1 en la neurona motora multifuncional de la faringe M4 (encargada de estimular su contracción muscular y de secretar moléculas de señalización¹⁷²) para controlar la morfología de las células glandulares adyacentes de la faringe¹⁷³. Además, la expresión de DBL-1 disminuye en el estadio de resistencia dauer¹²⁹, contribuyendo al drástico cambio metabólico y morfológico de estas larvas^{12, 48, 83, 216}. También la exposición a *P. aeruginosa* modula la expresión del ligando en las interneuronas AVA para mediar el aprendizaje de evasión frente al olor de bacterias patógenas²³¹. Aparte de estos trabajos que asignan una regulación directa del ligando DBL-1, se piensa que el control del tamaño a través de la ruta TGFβ Sma/Mab está regulado por la percepción de comida, aunque se desconoce el mecanismo molecular subyacente a este fenotipo¹⁹⁴. *C. elegans* reconoce una multitud de señales ambientales a través de neuronas sensoriales ciliadas⁹. Mutantes con defectos en los cilios, como los defectivos en *che-2*, tienen un fenotipo pequeño dependiente de la señalización por TGFβ Sma/Mab, según experimentos de epistasia^{52, 194}. En los cilios se concentran una gran cantidad de receptores, como la guanilatociclasa GCY-12⁵³, que utilizan cGMP como segundo mensajero⁹, siendo la proteína quinasa dependiente de cGMP, EGL-4, la responsable de transmitir la señal de GCY-12 y modular el tamaño de los nematodos a través de TGFβ Sma/Mab^{9, 52, 53, 75}.

Hasta la fecha se han identificado diferentes reguladores de TGFβ Sma/Mab extracelulares o transmembrana como LON-1^{135, 147}, LON-2⁶⁵, CRM-1⁵⁴ y ADT-2⁴⁷, así como dos correceptores: DRAG-1²⁰¹ y SMA-10⁶⁴.

DRAG-1 es el único ortólogo en nematodos de la familia de correceptores RGM humanos. Tian y colaboradores observaron que DRAG-1 actuaba como un correceptor facultativo de TGFβ Sma/Mab, ya que modulaba positivamente la señalización y el tamaño corporal, pero no influía sobre la morfología de la cola de los machos²⁰¹.

Al igual que ocurre con DRAG-1, SMA-10 es el único ortólogo de las proteínas LRIG en *C. elegans*⁶⁴. SMA-10 es una proteína anclada a la membrana plasmática, compuesta por quince repeticiones ricas en leucina (LRRs) y tres dominios de inmunoglobulina (Ig) en su parte extracelular⁶⁴. Las proteínas extracelulares que tienen LRRs están englobadas en una superfamilia de proteínas con diferentes funciones en el desarrollo del sistema nervioso y en inmunidad³⁸. Las LRRs son dominios que están presentes en diversas proteínas y su función consiste en establecer un marco estructural que permite la interacción entre diferentes proteínas¹⁰⁸.

En el genoma de *C. elegans* se han encontrado nueve proteínas extracelulares con LRRs, aparte de SMA-10³⁸. La superfamilia de proteínas con dominios de Ig es una de las más numerosas en *C. elegans* y posiblemente también en otros eucariotas multicelulares¹⁹⁶. Miembros de esta superfamilia están involucrados en diversas funciones como el reconocimiento intercelular y en el sistema inmune de organismos superiores¹⁹⁶. En el nematodo existen veintinueve proteínas con dominios de Ig localizadas en la superficie celular, como SMA-10²¹⁰, pero sólo tres (IGLR-1, IGLR-2, IGLR-3) combinan las LRRs con la presencia de algún dominio de Ig³⁸. Sin embargo, sólo se le ha asignado una función biológica a SMA-10^{64, 224}.

Las proteínas humanas LRIG actúan como reguladores de receptores con actividad tirosina quinasa, como EGFR y FGFR¹⁸⁵, actuando como genes supresores de tumores en algunos tipos de cáncer⁷⁰. Sin embargo, su relación con TGF β sólo se ha descrito, de momento, en *C. elegans*. Así, su ortólogo SMA-10 actúa como modulador positivo de TGF β Sma/Mab, contribuyendo al control del tamaño corporal, pero no al desarrollo de la cola de los machos⁶⁴. Sin embargo, se desconoce si SMA-10 contribuye a otros fenotipos controlados por TGF β Sma/Mab.

En cuanto a los genes diana de TGF β Sma/Mab, existen varios trabajos en los que se ha analizado la actividad transcripcional de la ruta, mediante el análisis de “arrays” de expresión en diferentes mutantes de TGF β Sma/Mab. Entre los genes controlados por esta vía de señalización se encuentran genes involucrados en control del tamaño, la inmunidad, el ciclo celular y la reproducción^{123, 133, 145, 175}. Además, se ha observado que el receptor específico tipo I SMA-6 es un gen diana positivamente regulado por la propia ruta, lo que origina un bucle regulatorio positivo de TGF β Sma/Mab^{145, 175}.

1.1.1. Control del tamaño por TGF β Sma/Mab

La señalización de TGF β Sma/Mab depende de la dosis del ligando DBL-1. DBL-1 es secretado en ciertas neuronas, como las de la cuerda nerviosa ventral^{146, 193}, desde donde difunde hasta la hipodermis, donde se une al complejo receptor formado por SMA-6 y DAF-4 para ejercer su función.

La hipodermis es el órgano responsable de controlar el tamaño corporal a través de TGF β Sma/Mab²¹⁴. La hipodermis o epidermis de *C. elegans* está formada por el sincitio principal (hyp 7) y células hipodérmicas más pequeñas en la cabeza y cola de los nematodos³. hyp 7 es un sincitio poliploide que envuelve el cuerpo de los nematodos y que, entre otras funciones, almacena nutrientes e interviene en la formación de la cutícula³ (Figura I-2). El contenido en DNA de los núcleos de la hipodermis determina el tamaño corporal del animal⁴⁹ y se ha sugerido que TGF β Sma/Mab contribuye al crecimiento, precisamente, a través de la modulación de la ploidía de sus núcleos^{49, 131}.

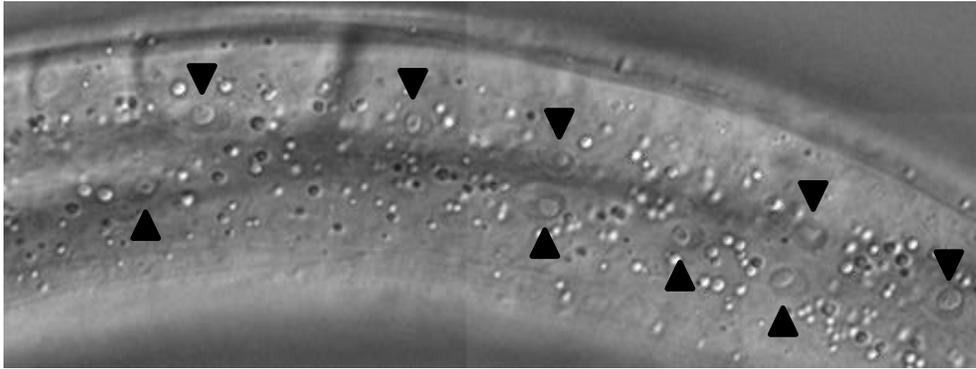


Figura I-2: Hipodermis de *C. elegans*. Foto con óptica Nomarski de hyp 7 en la cepa silvestre N2. Las puntas de flecha indican los núcleos hipodérmicos.

Adicionalmente, los estudios de expresión génica en mutantes de TGF β Sma/Mab indican que esta ruta regula también la síntesis de colágenos de la cutícula y otros genes involucrados en el metabolismo, como ligandos de las rutas de Insulina o de Hedgehog, que también están implicadas en el control del tamaño en nematodos^{123, 133, 175}.

1.1.2. TGF β Sma/Mab controla la longevidad y la reproducción de forma independiente

Los mutantes de TGF β Sma/Mab son ligeramente más longevos y tienen un periodo reproductivo más extenso que los nematodos silvestres de la cepa N2, por lo que esta ruta promueve el envejecimiento somático y reproductivo de *C. elegans*.

La observación de que los mutantes de TGF β Sma/Mab son más longevos que los silvestres no se descubrió hasta que se crecieron con bacterias muertas por calor o con FUdR (que previene la síntesis de DNA y por tanto el crecimiento bacteriano) en las placas^{134, 136, 190}. Esto parece ser debido a que la bacteria estándar de cultivo de *C. elegans*, *E. coli* OP50, tiene un cierto efecto patogénico sobre los mutantes al no poder degradarla eficientemente^{167, 190}, por tener comprometida la expresión de enzimas digestivas^{123, 175}. En este sentido, la inadecuada digestión del alimento podría suponer una restricción calórica en los mutantes de TGF β Sma/Mab, que podría explicar su aumento en longevidad¹⁹⁰.

Aparte, esta ruta de TGF β promueve el cese del periodo reproductivo en *C. elegans*, modulando la proliferación y calidad de las células germinales^{133, 134}. Luo y colaboradores demostraron que TGF β Sma/Mab regula la longevidad y la reproducción de forma independiente, en contraposición al resto de rutas que controlan el envejecimiento reproductivo y somático de forma conjunta¹³⁴.

1.1.3. TGF β Sma/Mab y otras rutas involucradas en inmunidad

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en los que las infecciones se combaten mediante dos tipos de respuesta inmune, innata y adaptativa, *C. elegans* sólo posee una respuesta inmune innata controlada por varias vías de señalización¹⁸⁷.

INTRODUCCIÓN

La ruta TGF β Sma/Mab está implicada en la inmunidad de *C. elegans* frente a diversos patógenos y esta función en inmunidad por TGF β está conservada en *Drosophila* y en humanos⁶⁶. Entre las bacterias con capacidad patogénica están *Serratia marcescens*¹³⁶, *Pseudomonas aeruginosa*¹¹⁴, *Salmonella entérica*^{167, 197}, *Escherichia coli*^{118, 136, 167, 190, 197} o *Enterococcus faecalis*¹⁹⁷. Entre los hongos que desencadenan una respuesta inmune por esta ruta se encuentra *Candida krusei* y el hongo nematofágico *Demechria conidiospora*²³⁶.

La resistencia a los diferentes patógenos a través de esta ruta de TGF β parece deberse a que TGF β Sma/Mab regula directamente la expresión de diferentes moléculas con efecto antimicrobiano como lisozimas, lectinas, lipasas o caenecinas^{123, 136, 145, 175}.

Como ocurre en otros organismos, aparte de TGF β Sma/Mab, hay otras rutas que controlan la inmunidad de *C. elegans*. El reconocimiento de patógenos en vertebrados se lleva a cabo a través de receptores que reconocen patrones de los microorganismos, siendo los receptores tipo Tol unos de los más predominantes⁴¹. Sin embargo, los mutantes del único ortólogo presente en *C. elegans*, TOL-1, presentan una susceptibilidad variable frente a diferentes patógenos^{170, 197} y parece que tiene un papel importante en la respuesta evasiva de los nematodos¹⁷⁰.

Tanto en animales como en plantas, muchos receptores de reconocimiento de patógenos tienen regiones con LRRs, como FSHR-1¹⁶⁹. Esta proteína se requiere en el intestino para la defensa frente a patógenos como *P. aeruginosa*. El trabajo de Powell y colaboradores sugiere que FSHR-1 está involucrado en la respuesta inmune de forma independiente a las señalizaciones por *p38* MAPK e Insulina¹⁶⁹.

La ruta de *p38* MAPK es una vía de señalización conservada evolutivamente y de gran importancia en la regulación de la inmunidad innata en *C. elegans* y mamíferos¹⁸⁴. La cascada de señalización de *p38* MAPK en *C. elegans*, NSY-1–SEK-1–PMK-1, está regulada por la proteína adaptadora con dominios Toll/IL-1 TIR-1 y es importante en la lucha contra bacterias y hongos¹⁸⁴.

La ruta de Insulina en *C. elegans* también está involucrada en la resistencia frente a patógenos^{100, 202}, aunque también regula otros aspectos como la entrada en dauer, la respuesta a estrés o la longevidad^{48, 100, 202}. La ruta de Insulina está controlada por 40 péptidos similares a insulina divididos en agonistas (DAF-28, INS-4, INS-6) y antagonistas (INS-1, INS-17, INS-18) de la ruta, en función de la regulación que ejercen sobre el receptor DAF-2^{48, 85}. Cuando se activa por los agonistas, DAF-2 transduce la señal de fosforilación mayoritariamente hasta el factor de transcripción FOXO DAF-16, el cual, fosforilado, queda retenido en el citoplasma^{48, 100, 202}. Por el contrario, cuando DAF-2 está inactivo, DAF-16 permanece defosforilado, permitiendo su entrada en el núcleo y la regulación de genes involucrados en diversos fenotipos como la inmunidad^{48, 100, 202}. Como consecuencia, los mutantes de DAF-2 son más resistentes a infecciones que los nematodos silvestres, mientras que los mutantes de DAF-16 son, en general, más sensibles^{100, 202}.

El factor de transcripción NF- κ B es clave para transducir la señal de infección en vertebrados e insectos, pero está ausente en *C. elegans*¹⁸⁴. Entre los factores de transcripción que regulan la respuesta inmune en nematodos se encuentra BAR-1, el ortólogo de β -catenina, que aunque interactúe con la ruta de Insulina⁴³, tiene un efecto independiente a ésta y regula al factor de transcripción EGL-5. Los ortólogos de EGL-5 en humanos modulan la expresión de NF- κ B tras la infección por *S. aureus*⁹⁰.

1.2. Ruta TGF β Dauer

Como cualquier ser vivo, *C. elegans* es capaz de detectar los cambios ambientales y adaptarse a ellos^{12, 16, 48}. En un ambiente favorable, los nematodos tienen activado el programa de desarrollo reproductivo, de tal manera que, desde la eclosión del huevo, pasan por cuatro estadios larvarios (L1-L4) hasta alcanzar la madurez sexual en el adulto (Figura I-3)⁴⁸. Sin embargo, cuando las larvas L1 se encuentran en condiciones ambientales adversas (falta de alimento, elevadas temperaturas o alta densidad poblacional), los nematodos entran en el estadio de resistencia dauer (Figura I-3)⁸³. La diapausa de dauer presenta grandes cambios metabólicos y morfológicos^{12, 48, 83, 216}. En concreto, las larvas dauer están constreñidas radialmente, presentan unas protuberancias denominadas *alae* en su endurecida cutícula y tienen todos los orificios sellados, por lo que son muy resistentes a todo tipo de estrés^{48, 83}.

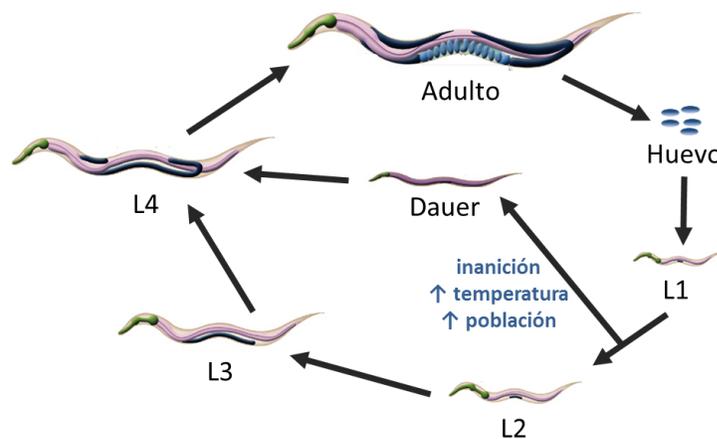


Figura I-3: Ciclo de vida de *C. elegans*. En condiciones favorables *C. elegans* pasa por cuatro estadios larvarios antes de llegar a adulto. En condiciones desfavorables puede adaptarse entrando en el estadio de resistencia dauer. Esquema modificado de *Wormatlas*⁴.

La detección de los cambios ambientales que desencadenan la entrada en dauer se produce a través de receptores en neuronas sensoriales ciliadas que, a través de la señalización por cGMP, regulan la actividad de las rutas de Insulina y TGF β Dauer⁴⁸.

Los mutantes de la ruta TGF β Dauer, la segunda ruta conocida de TGF β en *C. elegans*, fueron descubiertos por su papel en la regulación de la entrada en el estadio de resistencia dauer⁶⁶. Esta vía de señalización depende de la secreción del ligando DAF-7¹⁷⁴ por parte de dos neuronas sensoriales (ASI) y su

INTRODUCCIÓN

expresión está regulada positivamente por la comida y negativamente por la feromona de dauer y las altas temperaturas^{174, 179}. DAF-7 difunde desde las neuronas ASI para unirse en sus tejidos diana (como interneuronas o intestino) al complejo receptor, formado por DAF-1 (receptor tipo I)⁵⁶ y DAF-4 (receptor tipo II)⁴⁴, que fosforilará los R-Smads DAF-8¹⁵⁸ y DAF-14⁸⁹. Estos R-Smads dimerizan para, una vez en el núcleo, desplazar al complejo formado por el Co-Smad inhibitorio DAF-3¹⁶³ y el ortólogo de Sno/Ski DAF-5 en la regulación de los genes diana³⁰.

Al igual que DAF-7, DAF-28 (uno de los péptidos agonistas de Insulina) está regulado negativamente por la densidad poblacional y la falta de comida, así como positivamente por la actividad de TGFβ Dauer y la señalización por cGMP^{122, 129, 159}. Basándose en ensayos de epistasia, se había postulado que las rutas TGFβ Dauer e Insulina controlan de forma independiente la entrada en dauer. De hecho, la entrada en dauer de forma constitutiva de los mutantes de los componentes de TGFβ Dauer es anulada completamente por mutaciones en *daf-3*, mientras que la de los mutantes de Insulina lo es por mutaciones en *daf-16*^{1, 88}. Además, también se había observado que las mutaciones que inducen una entrada constitutiva en dauer en los componentes de ambas rutas son anuladas por la eliminación del receptor ortólogo de vitamina D DAF-12^{1, 83, 88}. Por lo tanto, estas interacciones posicionaron a DAF-12 corriente abajo de TGFβ Dauer e Insulina. Sin embargo, el análisis de la expresión génica de mutantes de TGFβ Dauer reveló que esta ruta regulaba positivamente, y a varios niveles, la ruta de Insulina¹²⁹. Posteriormente se ha confirmado que la ruta TGFβ Dauer modula directamente a la de Insulina^{151, 159, 183} y que ambas comparten genes diana comunes¹⁸³. Estos hallazgos indican que la regulación de la entrada en dauer no sólo se coordina por la regulación de la actividad de DAF-12 por ambas rutas, sino que ambas están comunicadas para ejecutar la respuesta coordinada de todo el organismo^{8, 48, 129}.

Aparte de regular la decisión de entrada en dauer, esta ruta de TGFβ está implicada en otros fenotipos importantes cuando el alimento escasea, como el control del metabolismo de lípidos⁶⁰, el control de la proliferación de la línea germinal^{31, 158} y varios aspectos del comportamiento: dispersión para la búsqueda de nuevas fuentes de comida¹⁴³, quiescencia²²⁸ y modulación de la tasa de alimentación^{60, 228}.

La ruta TGFβ Dauer está autorregulada positivamente de forma directa, al ser DAF-3 un represor de la transcripción de *daf-7* y *daf-8*¹⁵⁸. Además, como TGFβ Dauer regula la expresión de receptores ambientales^{129, 152}, puede que también se autorregule indirectamente.

2. miRNAs

Los miRNAs son RNAs de cadena sencilla no codificantes de 20-22 nucleótidos que se describieron por primera vez en *C. elegans* en 1993^{117, 218}. Posteriormente, se ha descubierto que están presentes en los genomas de todos los organismos eucariotas. Estas pequeñas moléculas de RNA están implicadas en numerosos procesos biológicos, por lo que su desregulación ha sido detectada en múltiples afecciones humanas, como enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer^{2, 37}.

De forma general, los miRNAs ejercen su acción uniéndose a la región 3' no traducible (3'UTR) de los mRNA diana, pero en algunos casos también se ha observado que pueden asociarse al mRNA en la zona codificante y en la región 5' no traducible (5'UTR). Mediante su unión, normalmente reprimen la expresión de los genes diana, induciendo su degradación o inhibiendo su traducción^{2, 203}, aunque se ha descrito algún caso en el que incluso pueden activar la traducción²⁰⁹. Asimismo, también se ha comprobado que son capaces de regular la transcripción mediante la unión directa al DNA^{166, 204, 206}.

2.1. Biogénesis, modo de actuación y regulación

Los miRNAs difieren de los genes codificantes de proteínas por su tamaño, procesamiento y porque su secuencia no será traducida en ningún péptido. Sin embargo, comparten con los genes la regulación tanto a nivel de promotor como a través de sus regiones no codificantes (5'UTR y 3'UTR). Pueden presentarse en el genoma de forma individual o en grupos, asumiendo en esta última situación una regulación conjunta^{6, 10}.

En la gran mayoría de los casos, los miRNAs son transcritos por la RNA-Polimerasa II. La transcripción produce una molécula de RNA, denominada miRNA primario (pri-miRNA), a la que se le añade en el extremo 5' la protección de 7-metilguanilato (m7G) y en el extremo 3' la cola de poliadenosinas (poli A), características de los mRNAs. El pri-miRNA ha de ser reconocido en el núcleo por el complejo microprocesador de la endonucleasa Drosha, para ser procesado y dar lugar al miRNA precursor (pre-miRNA). El pre-miRNA forma una horquilla de unas 60 pb y su salida del núcleo está mediada por Exportina 5. En el citoplasma es reconocido por el complejo multiproteico gobernado por la endonucleasa Dicer, la cual liberará el dúplex formado por el miRNA maduro/guía y su miRNA complementario/pasajero (que se piensa también pudiera tener actividad). El dúplex es reconocido por la proteína Argonata, que selecciona preferentemente el miRNA guía para entrar a formar parte del complejo ribonucleoproteico miRISC (Figura I-4)^{203, 225}.

La unión de los miRNAs a los mRNAs tiene lugar dentro del miRISC y, generalmente, induce la degradación de los mRNAs o inhibe la traducción de los mismos, lo que conlleva una regulación negativa de esos genes diana¹⁰². La hibridación de estas dos moléculas de RNA se produce, en términos generales, por la complementariedad de la región "seed" (nucleótidos 2-7 de miRNA) al mRNA^{11, 203}. En función de la

INTRODUCCIÓN

conservación de esta región “seed” se han propuesto diferentes familias de miRNAs⁸⁷. Pero también parecen ser importantes otros sitios suplementarios o compensatorios en la región 3' del miRNA, sobre todo cuando el emparejamiento de la región “seed” al mRNA no es perfecta^{11, 200}. Se piensa que estas regiones en el 3' del miRNA pudieran tener importancia cuando se requiere especificidad por parte de un miembro de una familia de miRNAs, porque es esta parte en la que difieren¹¹.

El apareamiento impreciso entre miRNAs y mRNAs permite que un único miRNA regule potencialmente a cientos de genes diferentes^{102, 180}. También se ha descrito que un único mRNA puede ser regulado por varios miRNAs, poniendo de manifiesto el enorme potencial regulatorio de los miRNAs, así como su complejidad^{6, 37, 102}.

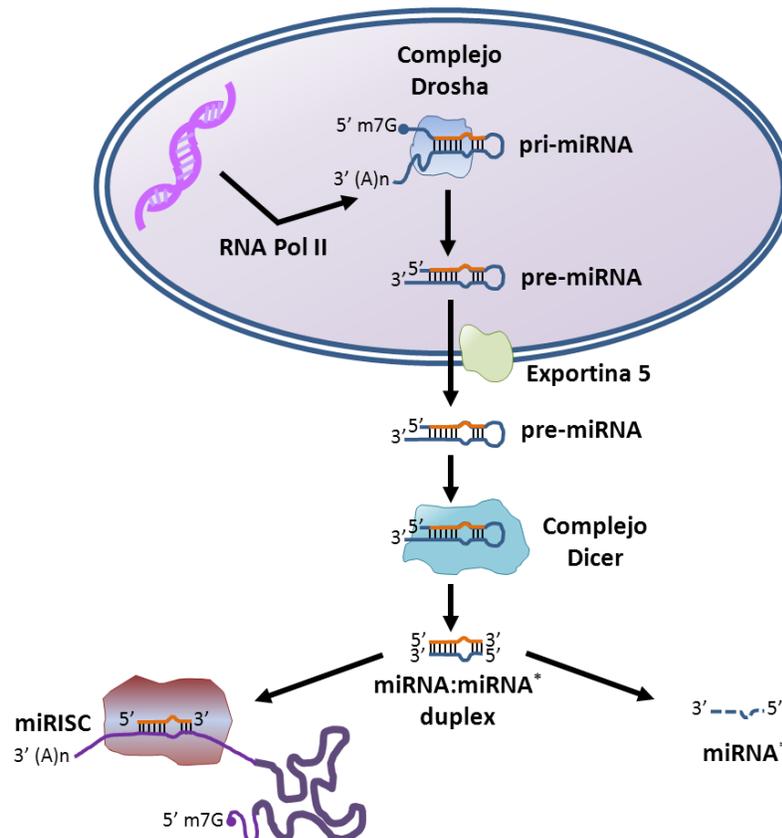


Figura I-4: Biogénesis de los miRNAs. Para que un miRNA pueda unirse a los mRNAs dentro del RISC, debe ser procesado por dos complejos enzimáticos. Descrito con más detalle en el texto.

En cuanto a la regulación de los miRNAs, el procesamiento de pri-miRNAs por Drosha o de pre-miRNAs por Dicer puede promoverse o inhibirse en función de las proteínas que se asocien con ellas en sus complejos enzimáticos. La actividad de Dicer también puede ser alterada para originar diferentes isoformas de miRNAs (isomiRs), que se unirán a otras regiones diana para regular un conjunto diferente de mRNAs²²⁵. Además, la unión del miRNA a su mRNA diana también influye sobre la actividad de los miRNAs, bloqueando su salida del miRISC y, por tanto, protegiendo al propio miRNA de ser degradado por exoribonucleasas^{27, 28}.

Junto a estas regulaciones, los RNAs endógenos competitivos (ceRNAs) están emergiendo como moléculas que actúan como esponjas de miRNAs, constituyendo un control postranscripcional adicional¹⁰². Los ceRNAs utilizan lugares de reconocimiento de los miRNAs que compiten con los de los mRNAs diana^{39, 102}. Teniendo en cuenta la gran estabilidad de los miRNAs, se postula que las esponjas podrían servir más eficazmente (que una degradación específica de un miRNA) para inhibirlos³⁹. Se han descrito varios tipos de ceRNAs: RNAs codificantes, pseudogenes, RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y RNAs circulares (circRNAs)¹⁰².

Hasta la fecha se han identificado en *C. elegans* 250 miRNAs, mientras que en humanos el número asciende a 1881, según datos de miRBase versión 21^{61, 62, 110, 111}. Sin embargo, en la complejidad de su regulación están implicadas muchas más moléculas, cuyo estudio será necesario para comprender mejor la función de los miRNAs. Asimismo, según miRTarBase versión 4, sólo se han identificado en humanos 4806 interacciones miRNA-mRNA validadas por consistentes evidencias experimentales, mientras que para *C. elegans* sólo se han detectado 40⁸². Por lo tanto, la validación de los genes diana de los miRNAs es igualmente imprescindible para entender la función de los miRNAs.

2.2. miRNAs en *C. elegans*

Desde su descubrimiento en los laboratorios dirigidos por Ambros y Ruvkun^{117, 218}, los miRNAs se han convertido en un importante campo de estudio en este organismo modelo, ocupando *C. elegans* una posición central en la investigación sobre los miRNAs¹⁰⁴. Para su estudio en el nematodo existe una amplia colección de mutantes de miRNAs, pero su examen superficial reveló que la delección de la mayoría de miRNAs de forma individual no comprometía el desarrollo ni la viabilidad de los mutantes¹⁴⁴. Aunque la eliminación de familias enteras de miRNAs haya reportado únicamente efectos por parte de la mitad de las familias de miRNAs⁵, podría ser más fácil encontrar genes diana de las familias en estos mutantes mediante ensayos a gran escala, como el estudio de su expresión génica. En *C. elegans*, también se ha estudiado la expresión de los miRNAs en diferentes condiciones de estrés^{36, 101} y se han generado cepas sensibles para desenmascarar la contribución de los miRNAs a diferentes fenotipos, con la finalidad de identificar sus genes diana^{20, 198}.

2.2.1. La familia de *mir-58*

En *C. elegans* la familia de *mir-58* está compuesta por cinco miembros en base a la conservación de la región “seed” y tiene ortólogos en *D. melanogaster* y, posiblemente, también en humanos, aunque en este último caso la conservación de la región “seed” no es completa (Figura I-5)⁸⁷.

cel-miR-58	UGAGAUCGUUCAGUACGGCAAU
cel-miR-80	UGAGAUCAUUAGUUGAAAGCCGA
cel-miR-81	UGAGAUCAUUCGUGAAAGCUAGU
cel-miR-82	UGAGAUCAUUCGUGAAAGCCAGU
cel-miR-1834	AGAGAUCAACCAUUGAGAUCCAA
dme-bantam	UGAGAUCAUUUUGAAAGCUGAUU
hsa-miR-143	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-450b	UUGGGAUCAUUUUGCAUCCAAU

Figura I-5: Alineamiento de la familia de *mir-58* en *C. elegans*, *D. melanogaster* y *H. sapiens*. Señalados en negro aparecen los nucleótidos de la región “seed” compartidos por los miRNAs.

mir-58 es uno de los miRNAs más abundantes en las células de *C. elegans* y se expresa uniformemente durante todo el desarrollo, por lo que se ha postulado que podría actuar como un miRNA “housekeeping”^{91, 101, 103, 125, 220}. Además, en nematodos estériles aparece sobreexpresado, lo que parece sugerir la existencia de una regulación negativa por parte de la línea germinal²²⁰. *mir-58* se localiza en el intrón del gen Y67D8A.1, aunque su transcripción es independiente de la de Y67D8A.1. *mir-58* se expresa en casi todos los tejidos del nematodo, salvo en el sistema nervioso y en las células precursoras de los núcleos hipodérmicos⁹¹. A pesar de sus altos niveles de expresión, que decrecen con la edad de los nematodos¹³², los mutantes de *mir-58* no presentan cambios fenotípicos aparentes^{144, 198}. De momento, sólo se ha demostrado que los mutantes de *mir-58* son menos longevos que los nematodos silvestres¹⁸. En cuanto a sus genes diana, ninguno ha sido validado *in vivo* hasta la fecha: en experimentos *in vitro* se observó que *mir-58* promovía la deadenilación de los 3’UTRs de *egl-1* y *toh-1*²²⁰ y mediante ensayos proteómicos a gran escala o con tecnología CLIP-Seq se han propuesto varios candidatos^{63, 98, 99, 235}.

mir-80 también es un miRNA abundante y de expresión constante durante el desarrollo^{101, 103, 125}. Se expresa de forma ubicua, incluyendo neuronas²¹¹. Recientemente, se ha observado que sus mutantes son más longevos que los nematodos silvestres^{132, 211} y que los nematodos adultos disminuyen la expresión de *mir-80* con la edad¹³². Vora y colaboradores han demostrado que la expresión de *mir-80* está regulada positivamente por la comida y postulan que regula la restricción nutricional a través de la modulación de los niveles de *cbp-1*²¹¹. CBP-1 es una acetiltransferasa requerida para aumentar la longevidad asociada a la restricción calórica, lo que explicaría que en ausencia de *mir-80* aumentarían los niveles de CBP-1, incrementando la longevidad de los mutantes de *mir-80*^{132, 211}.

mir-81 y *mir-82* se encuentran embebidos en el gen T07D1.2, *mir-81* en el último intrón, mientras que *mir-82* se localiza dentro del primer intrón. El único alelo mutante descrito para estos miRNAs elimina tanto a *mir-81* como a *mir-82*. Sin embargo, los dobles mutantes no presentan ningún fenotipo aparente^{132, 144}, aunque tengan unos niveles de expresión considerables y constantes durante el desarrollo de nematodos silvestres^{101, 103, 125} y que disminuyen en adultos con la edad^{36, 132}. El análisis de sus regiones 5’ flanqueantes determinó que *mir-81* se expresa en neuronas de la cabeza a partir del estadio L1¹³⁸ y que *mir-82* tiene un

espectro más amplio de expresión, que también incluye neuronas^{91, 138}. En 2013 Than y colaboradores corroboraron la expresión de *mir-81* en neuronas mediante inmunoprecipitación¹⁹⁸. Además, al someter a los mutantes *mir-81/mir-82(nDf54)* a un fondo genético sensible, observaron que la falta de estos miRNAs modulaba positivamente la entrada en el estadio de resistencia dauer y que este efecto era dependiente de cGMP¹⁹⁸.

mir-1834 fue descubierto en 2008⁵¹ y parece ser un miRNA con un bajo nivel de expresión^{103, 217}, que va en aumento a lo largo del desarrollo y que en machos es menor¹⁰³.

En cuanto a los mutantes de la familia de *mir-58* (carecen de *mir-58*, *mir-80*, *mir-81* y *mir-82*), Álvarez-Saavedra y Horvitz observaron que eran viables, pero presentaban varios fenotipos: eran lentos/inactivos, pequeños, no depositaban huevos correctamente y eran incapaces de entrar en dauer⁵. Según estos autores, la expresión de *mir-80* rescata todos los fenotipos, mientras que la expresión individual de cada uno de los miembros de la familia, salvo *mir-81*, revierte el fenotipo de entrada en dauer⁵. Estos datos están en consonancia con el trabajo de Than y colaboradores, donde se sugiere el papel inhibidor de la entrada en dauer de *mir-81/82*¹⁹⁸, en contraposición al papel inductor del resto de miembros de la familia⁵. Como conclusión de estos estudios^{5, 198}, se infiere que miembros de una misma familia de miRNAs pueden tener papeles opuestos en la regulación de un mismo fenotipo, lo que complica la identificación de las funciones para cada uno de los miembros de una misma familia. Recientemente, se ha descrito que esta familia está involucrada en la regulación en el intestino de *C. elegans* del gen *pmk-2*, una *p38* MAPK involucrada en la inmunidad, añadiendo una nueva función a la familia de miR-58¹⁵⁷.

3. TGFβ y miRNAs

La capacidad de modular la señalización de TGFβ por miRNAs es un descubrimiento relativamente nuevo. Recientemente, se ha demostrado en humanos que los miRNAs pueden regular la señalización de TGFβ actuando sobre sus ligandos, receptores y Smads (Tabla I-1), así como también inhibiendo los genes diana de la ruta^{23, 155}.

Además, la señalización por TGFβ también puede controlar la expresión de los miRNAs a nivel transcripcional y postranscripcional. Los factores de transcripción Smads son capaces de regular la transcripción de miRNAs de forma directa, mediante unión a la región promotora^{15, 23}, o indirecta, como en el caso de *mir-143* a través de un complejo transcripcional mediado por miocardina³². Asimismo, los Smads también promueven la maduración de los pri-miRNAs por Drosha, mediante la unión a la región consenso CAGAC de los miRNAs^{34, 35}.

Tipo de componente de TGFβ	Gen diana	miRNA	Referencia
Ligando	TGFβ1	miR-744	23
Receptor	AcvR1B/ALK4	miR-210	23
	TGFβR2	miR-21, miR-106b, miR-93, miR-17-5p, miR-20, miR-204, miR-590, miR-20a, miR-145	23, 232
	BMPR2	miR-21	23
Correceptor	TGFβR3/Betaglicano	miR-21	23
Smad	SMAD1	mir-155, miR-26, miR-199a, miR-26a	23
	SMAD2	miR-141, miR-155, miR-200a, miR-200c, miR-30d, miR-30e	23, 155
	SMAD3	miR-140, miR-23b, miR-27b, miR-24	23
	SMAD4	miR-23b, miR-27b, miR-24, miR-130, miR-146a, miR-146b-5p, miR-18, miR-224, miR-130a	23, 155
	SMAD5	miR-23b, miR-27b, miR-24, miR-124, miR-155, miR-224	23, 155
	SMAD7	miR-21	23, 155

Tabla I-1: Componentes de TGFβ regulados por miRNAs en humanos. Tabla adaptada de Butz *et al.*, 2012.

En *D. melanogaster*, *bantam*, el único ortólogo de la familia de *mir-58* de *C. elegans* (Figura I-5) y primer miRNA en describirse en este artrópodo¹⁹, promueve el crecimiento⁷⁴. En este organismo se ha descrito que la expresión de *bantam* está regulada por varias vías de señalización^{17, 73, 153}. Entre ellas, la ruta de TGFβ gobernada por el ligando Dpp promueve directamente su transcripción a través del Smad Mad¹⁵³.

En humanos, *mir-143*, uno de los posibles ortólogos de la familia de *mir-58* de *C. elegans* (Figura I-5), ha sido relacionado por numerosos autores con la señalización por TGFβ. La expresión de *mir-143* se induce al aumentar la cantidad de TGFβ1 en diferentes tipos celulares, como fibroblastos¹⁴⁹, células musculares lisas^{32, 130} o condrocitos⁷⁹, para promover, en general, un estado diferenciado. Además, estudios a gran escala con tecnología CLIP-Seq sugieren que miR-143 puede unirse a los receptores tipo I TGFβR1¹⁰⁷ y BMPR1B²²² en células embrionarias de riñón HEK293 y en células epiteliales *HeLa*, respectivamente. Aparte de estos trabajos que relacionan a miR-143 con las rutas canónicas de TGFβ, también se ha descrito que miR-143 puede regular la expresión de ERK5, y posiblemente de ERK1/2, quinasas involucradas en la señalización no canónica mediada por TGFβ¹⁵⁵.

En *C. elegans*, aunque se han estudiado en profundidad muchos aspectos de las dos rutas canónicas de TGFβ, TGFβ Sma/Mab y TGFβ Dauer, todavía no se ha descrito ninguna interacción entre ellas y los miRNAs. Como la señalización de las rutas de TGFβ está relativamente conservada evolutivamente y su estrecha regulación es determinante para definir respuestas biológicas específicas en los diferentes tejidos y

tipos celulares que los componen, parece plausible que los miRNAs también estén modulando la señalización por TGF β en *C. elegans*.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta Tesis doctoral están dirigidos a comprender la modulación que ejercen dos tipos de moléculas, los miRNAs de la familia de *mir-58* y el correceptor SMA-10, sobre la señalización por TGF β , en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*. Los objetivos concretos fueron los siguientes:

1. Estudiar la posible regulación de la expresión génica entre la familia de miR-58 y las rutas de TGF β (Sma/Mab y Dauer).
2. Analizar si SMA-10 es un componente constitutivo de la ruta de TGF β Sma/Mab.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Cepas y condiciones de cultivo

En la Tabla M-1 se muestra un listado de las cepas de *C. elegans* utilizadas en esta tesis e información sobre ellas, incluido el origen de las mismas.

Nomenclatura cepas		Gen	Símbolo	Alelo	Cr	Mutación	Origen
Tesis	CGC						
N2	N2 (Bristol)					-	CGC
<i>dbl-1(nk3)</i>	NU3	T25F10.2	<i>dbl-1</i>	<i>nk3</i>	V	delección de 5595 pb	CGC
<i>sma-6(wk7)</i>	LT186	C32D5.2	<i>sma-6</i>	<i>wk7</i>	II	puntual, Y72*	CGC
<i>daf-4(m63)</i>	DR63	C05D2.1	<i>daf-4</i>	<i>m63</i>	III	desconocida	CGC
<i>dbl-1(ctIs40)</i>	BW1940			<i>ctIs40</i>	X	inserción <i>dbl-1</i>	CGC
<i>daf-1(m213)</i>	DR609	F29C4.1	<i>daf-1</i>	<i>m213</i>	IV	puntual, P545S	CGC
<i>daf-3(ok3610)</i>	RB2589	F25E2.5	<i>daf-3</i>	<i>ok3610</i>	X	delección de 342 pb	CGC
<i>daf-8(++)</i>	DR2490					inserción $P_{daf-8}::GFP::daf-8$	D.L. Riddle ¹⁵⁸
<i>daf-4(pwIs922)</i>				<i>pwIs922</i>		inserción $P_{vha-6}::daf-4::GFP$	R.W. Padgett ⁵⁸
<i>mir-58(n4640)</i>	MT15024	Y67D8A.4	<i>mir-58</i>	<i>n4640</i>	IV	delección de 785 pb	CGC
<i>mir-80(nDf53)</i>	MT13949	K01F9.3	<i>mir-80</i>	<i>nDf53</i>	III	delección de 727 pb	CGC
<i>mir-81/82(nDf54)</i>	MT13954	T07D1.6	<i>mir-81</i>	<i>nDf54</i>	X	delección de 6288 pb	CGC
		T07D1.7	<i>mir-82</i>				
<i>mir-58f(-)</i>	MT15563	Y67D8A.4	<i>mir-58</i>	<i>n4640</i>	IV	delección de 785 pb	CGC
		K01F9.3	<i>mir-80</i>	<i>nDf53</i>	III	delección de 727 pb	
		T07D1.6	<i>mir-81</i>	<i>nDf54</i>	X	delección de 6288 pb	
		T07D1.7	<i>mir-82</i>				
$P_{mir-58}::GFP$	EUB0032					inserción $P_{mir-58}::GFP$	M. Isik ⁹¹
<i>daf-2(e1370)</i>	CB1370	Y55D5A.5	<i>daf-2</i>	<i>e1370</i>	III	puntual, P1465S	CGC
$P_{sod-3}::GFP$	CF1553			<i>mulS84</i>		inserción $P_{sod-3}::GFP$	CGC
$P_{sod-3}::GFP$; <i>daf-2(e1370)</i>	CF1580	Y55D5A.5	<i>daf-2</i>	<i>e1370</i>	III	puntual, P1465S inserción $P_{sod-3}::GFP$	CGC
$P_{sod-3}::GFP$; <i>daf-16(mu86)</i>	CF1874	R13H8.1	<i>daf-16</i>	<i>mu86</i>	I	delección 10980 pb inserción $P_{sod-3}::GFP$	CGC
<i>sma-10(ok2224)</i>	RB1739	T21D12.9	<i>sma-10</i>	<i>ok2224</i>	IV	delección de 906 pb	CGC
<i>eat-2(ad465)</i>	DA465	Y48B6A.4	<i>eat-2</i>	<i>ad465</i>	II	puntual, W107*	CGC
<i>tol-1(nr2033)</i>	IG10	C07F11.1	<i>tol-1</i>	<i>nr2033</i>	I	delección de 1289 pb	CGC
<i>fshr-1(ok778)</i>	RB911	C50H2.1	<i>fshr-1</i>	<i>ok778</i>	V	inserción de 393 pb y delección de 3224 pb	CGC
<i>sek-1(km4)</i>	AU37	R03G5.2	<i>glp-4</i>	<i>bn2</i>	I	desconocida	CGC
			<i>sek-1</i>	<i>km4</i>	X	delección de 2084 pb	
<i>bar-1(ga80)</i>	EW15	C54D1.6	<i>bar-1</i>	<i>ga80</i>	X	puntual, Q97*	CGC
<i>daf-16(mu86)</i>	CF1038	R13H8.1	<i>daf-16</i>	<i>mu86</i>	I	delección de 10980 pb	CGC
<i>daf-16(zIs356)</i>	TJ356	R13H8.1	<i>daf-16</i>	<i>zIs356</i>	IV	Inserción $P_{daf-16}::daf-16a/b::GFP$	CGC
$P_{lon-1}::GFP$						inserción $P_{lon-1}::GFP$	N. Ueno ¹⁴⁷
$P_{SCM}::GFP$	JR667	M142.1	<i>unc-119</i>	<i>e2498</i>	III	inserción Tc1	CGC
				<i>wIs51</i>	V	inserción $P_{SCM}::GFP$	

Tabla M-1: Cepas de *C. elegans* utilizadas en este trabajo. Se muestra la nomenclatura de las cepas utilizadas en este trabajo (Tesis) y la correspondiente asignada por el CGC o laboratorio de origen. También se indica el gen afectado con su símbolo y el alelo utilizado, la localización cromosómica, una breve descripción de la mutación y el origen de procedencia de las cepas.

Las cepas y transgénicos de *C. elegans* generados en este trabajo se muestran en la Parte III del Anexo I.

Todas las cepas se crecieron a 20 °C en placas de NGM en condiciones estándar¹⁹², a no ser que se especifiquen otras condiciones.

Las cepas bacterianas que se han utilizado, con sus características, se muestran en la Tabla M-2. Se crecieron a 37 °C a 150 rpm durante 16-18 horas.

Especie	Cepa	Utilidad	Medio de cultivo	Origen
<i>E. coli</i>	OP50	Mantenimiento	LB	CGC
<i>E. coli</i>	HT115 (DE3)	RNAi	LB	CGC
<i>S. marcescens</i>		Inmunidad	LB	Microbiología III (UCM)
<i>P. aeruginosa</i>	PA14	Inmunidad	King's Broth	J.J. Ewbank

Tabla M-2: Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo. Se muestra la especie y la cepa utilizada, el uso que se le ha dado, el medio de cultivo para su crecimiento y su procedencia.

1.2. Medios de cultivo y otras soluciones

NGM (*Nematode Growth Medium*): 3 g/L NaCl (*Merck*), 17 g/L Agar (*Sigma*), 2,5 g/L Bacto™ Peptone (*BD*), 1 mM CaCl₂ (*Calbiochem*), 5 mg/L Colesterol (*Alfa Aesar*), 1 mM MgSO₄ (*Sigma*), 25 mM KPO₄ (*Sigma*).

M9 Buffer: 3 g/L KH₂PO₄ (*Sigma*), 6 g/L Na₂HPO₄ (*Sigma*), 5 g/L NaCl (*Merck*), 1 mM MgSO₄ (*Sigma*).

Placas para aislamiento de RNA de *C. elegans*: 3 g/L NaCl (*Merck*), 10 g/L Agarosa (*Sigma*), 10 g/L Bacto™ Peptone (*BD*), 1 mM CaCl₂ (*Calbiochem*), 5 mg/L Colesterol (*Alfa Aesar*), 1 mM MgSO₄ (*Sigma*), 25 mM KPO₄ (*Sigma*).

Placas para RNAi: 3 g/L NaCl (*Merck*), 17 g/L Agar (*Sigma*), 2,5 g/L Bacto™ Peptone (*BD*), 1 mM CaCl₂ (*Calbiochem*), 5 mg/L Colesterol (*Alfa Aesar*), 1 mM MgSO₄ (*Sigma*), 25 mM KPO₄ (*Sigma*), 25 mg/L Carbenicilina (*Sigma*), 1mM IPTG (*Sigma*).

Solución de Carnoy: 60% Etanol 100% (*Panreac*), 30% Ácido acético glacial (*Panreac*) y 10% Cloroformo (*Merck*).

SKP (*Slow Killing Plates*): 3 g/L NaCl (*Merck*), 20 g/L Agar (*Sigma*), 3,5 g/L Bacto™ Peptone (*BD*), 1 mM CaCl₂ (*Calbiochem*), 5 mg/L Colesterol (*Alfa Aesar*), 1 mM MgSO₄ (*Sigma*), 25 mM KPO₄ (*Sigma*).

King's Broth: 20 g/L Bacto Proteose Peptone (*BD Diagnostics*), 1,5 g/L KH₂PO₄, 15 mL/L glicerol (*Sigma*), 6 mM MgSO₄ (*Sigma*), 100 mg/L Rifampicina (*Sigma*).

LB (*Lysogeny Broth*): 10 g/L NaCl (*Merck*), 10 g/L Bacto Triptona (*Conda*), 5 g/L Extracto de levadura (*Oxoid*).

1.3. Vectores de clonación

Los plásmidos utilizados para analizar la regulación de los 3'UTRs por parte de la familia de miRNAs de *mir-58* fueron psiCHECK-2 (*Promega*) en células *HeLa* y p374⁹⁶ en *C. elegans* (Figura M-1).

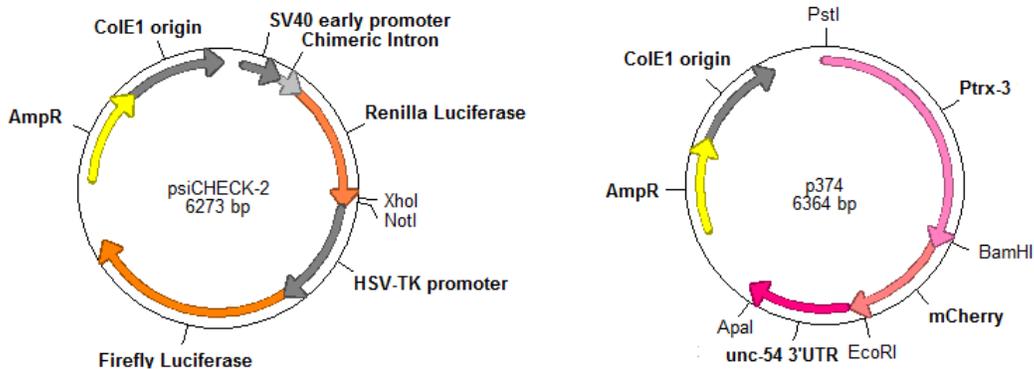


Figura M-1: Esquema de los vectores psiCHECK-2 y p374. Se indican las características más importantes.

Para sobreexpresar genes en *C. elegans* se utilizaron los plásmidos pPD95.75 y pPD49.83 del kit de Andrew Fire (*Addgene*) (Figura M-2).

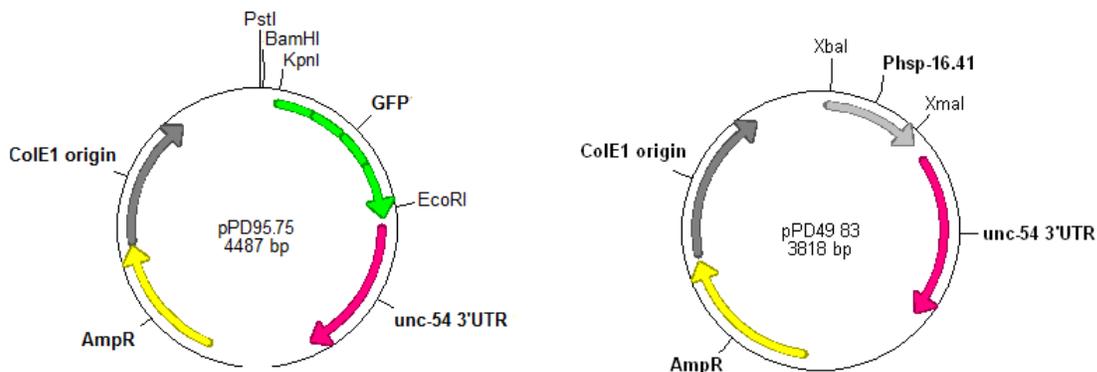


Figura M-2: Esquema de los vectores pPD95.75 y pPD49.83. Se indican las características más importantes.

Para expresar la proteína reportera GFP en los núcleos hipodérmicos se utilizó el plásmido L4455 del kit de Andrew Fire (*Addgene*) (Figura M-3).

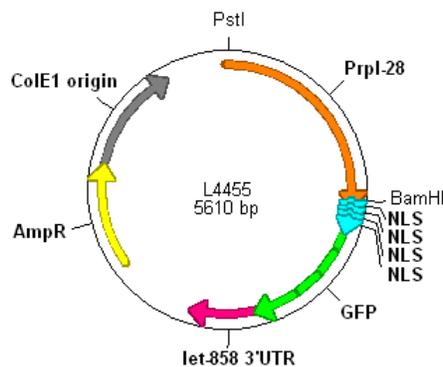


Figura M-3: Esquema del vector L4455. Se indican las características más importantes.

1.4. Cebadores

Los cebadores utilizados para genotipar las cepas de *C. elegans* se muestran en la Tabla M-3.

Gen	Símbolo	Alelo	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
T25F10.2	<i>dbl-1</i>	<i>nk3</i>	MS7	CATGGACAAACATCGGGGA
			MS11	CGTGTACACAAATCTGTTCG
			T25F10.2F	CGACTCTGTGCGGACAATA
			T25F10.2R	AAGCATCGTAGCCCTCTGAA
F29C4.1	<i>daf-1</i>	<i>m213</i>	daf-1F	CGGAGATCTTTGAGACGCGGATG
			daf-1R	CTCGGTCCACAATAGGAGCC
F25E2.5	<i>daf-3</i>	<i>ok3610</i>	RB2589F	AAGAAGAATGATCTCCAGAACC
			RB2589R1	TTCTCAACATTAGGCAATCAAC
			RB2589R2	AAAATTATTAGCTCTCGGCTGG
Y67D8A.4	<i>mir-58</i>	<i>n4640</i>	MT15024F2	GTACACCGCTCTTGC
			MT15024R3	AGATCAAGACCGTACTC
			MT15024R4	CAGTTGTCCTTCAATCG
K01F9.3	<i>mir-80</i>	<i>nDf53</i>	MT13949F	TGGGCAACAACTCATTTTCG
			MT13949R1	ATTCTGAACAATCCGCAAGC
			MT13949R2	AATCCGCTTCCAATCGTTTCG
T07D1.6	<i>mir-81</i>	<i>nDf54</i>	MT13954F2	GTATATGTCCACTCTCTCG
			MT13954R4	TGCAATCCGAAGATGG
T07D1.7	<i>mir-82</i>		MT13954R5	AATTGACGGTAGAGTGG
Y55D5A.5	<i>daf-2</i>	<i>e1370</i>	CB1370F	CGACAACCTGATCATTATATC
			CR1370R	CTGTCAAGATTGGAGATTTCCG
R13H8.1	<i>daf-16</i>	<i>mu86</i>	daf-16F	AGAAGACGACGACAAGACAG
			daf-16R1	TCGAGAGCAGATTCTAGGAG
			daf-16R86	TCGAGAGGTTGATTGAGTTC
T21D12.9	<i>sma-10</i>	<i>ok2224</i>	RB1739F1	ATCATGGCTCGCATCGTGGGA
			RB1739F2	GAAGATCAAGGAGCATAACAC
			RB1739R1	CTTCTTCCACTACCCCGAAA
Y48B6A.4	<i>eat-2</i>	<i>ad465</i>	eat-2F	TGATCACCTAGTTGTCTGG
			eat-2R	AGTGTAGAGGTAAGTATGG
C07F11.1	<i>tol-1</i>	<i>nr2033</i>	tol-1F	CGATTGCTGTTCTCCTCTGTG
			tol-1R	CCTCGTGAATAATGGAAACTCG
C50H2.1	<i>fshr-1</i>	<i>ok778</i>	fshr-1F	GGGATTGATTGTGTCTCAATTGC
			fshr-1R1	AGGTGTTGAGAATGATAGAAG
			fshr-1R2	ACCATGACGCTCCACCTC
R03G5.2	<i>sek-1</i>	<i>km4</i>	sek-1F1	CATCCATACACTAGAATAAGTG
			sek-1F2	GTGAAGTGTGCTTAAATTGC
			sek-1R	CAGATGCTAATAAACTACTTGAAC
C54D1.6	<i>bar-1</i>	<i>ga80</i>	bar-1F	TCTTACATTATCCTGATCTTC
			bar-1R	ACAGGGAGCAACACACCTCGAG

Tabla M-3: Cebadores usados para genotipar las cepas mutantes. Se muestra para cada gen y alelo las secuencias de los cebadores utilizados para genotipar las cepas de *C. elegans*.

Para amplificar y mutar los 3'UTRs de *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4*, *daf-1* y *daf-7* se utilizaron los oligonucleótidos de la Tabla M-4.

Gen	Símbolo	Longitud 3'UTR	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
T25F10.2	<i>dbl-1</i>	470 nt	dbl-1UTRF dbl-1UTRR dbl-1UTRmutF dbl-1UTRmutR	GTACCCGCTTCTATGTCGC TCAAATACCAAAATGTT ATATTTGATGAGATAGTTTTGTGTC GACACAAAACATATCTCATCAAATAT
C32D5.2	<i>sma-6</i>	216 nt	sma-6UTRF sma-6UTRR sma-6UTRmutF sma-6UTRmutR	CCCCTTTCTGATCTTAC TACAGGTCTGGAACAAT TTAAAGCGATGAGTCTAATAATTTCC GGAAATTATTAGACTCATCGCTTTAA
C05D2.1	<i>daf-4</i>	476 nt	daf-4UTRF daf-4UTRR daf-4UTRmut1F daf-4UTRmut1R daf-4UTRmut2F daf-4UTRmut2R daf-4UTRmut3F daf-4UTRmut3R	CTATTCATTCAAATCTAACATT AAGAAACATTATTTAATTTTAA CCCCTAATGATGAGAAATTTGAGACAACC GGTTGTGCTCAAATTCTCATCATTAGGGG CTCTTCCAAAATCTCTGATGAGTTGCATTGTCTC GAGACAATGCAACTCATCAGAGATTTTGGAAAGAG CATTCACTATATTCATTGATGAGTGATAACTTTGTATTGG CCAATACAAAGTTATCACTCATCAATGAATATAGTGAATG
F29C4.1	<i>daf-1</i>	455 nt	daf-1UTRF daf-1UTRR daf-1UTRmut1F daf-1UTRmut1R daf-1UTRmut2F daf-1UTRmut2R	AGCCCATTTTATCTTCCGTTCC AAATTTTTATTTTCATTTTC CCCCCATATCGATGATGAGATTTCTCTTCC GGAAGAGAAATCTCATCATCGATATGGGGG CTGTACCATGATGAGAAGTGTTTTTG CAAAAACACTTCTCATCATGGTACAG
B0412.2	<i>daf-7</i>	489 nt	daf-7UTRF daf-7UTRR daf-7UTRmut1F daf-7UTRmut1R daf-7UTRmut2-3F daf-7UTRmut2-3R	ATTCCACTCCGATTGTCAC ATAATTTATTCCTCAATCACAGTG GAATCAAATTCATGATGAGAACCCCGTAGTC GACTACGGGGTTCTCATCATGAATTTTGATTC CTGTCCGGTGAGCTTTCCCTCGATGAGATCCCAG CTGGGATCTCATCGAGGGAAAGCTCACCGACAG

Tabla M-4: Cebadores usados para amplificar y mutar los 3'UTR. Se indica para cada gen y alelo las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar y mutar los 3'UTR y su longitud. En rojo aparecen señaladas las bases mutadas en los 3'UTRs. En los cebadores UTRF y UTRR se ha omitido la parte del oligonucleótido correspondiente a los sitios de restricción XhoI en UTRF (5'-GAGACTCGAG-3') y NotI en UTRR (5'-GAGAGCGGCCGC-3') para su clonaje en psi-CHECK-2 y los sitios EcoRI en UTRF (5'-GAGAGAATTC-3') y ApaI en UTRR (5'-GAGAGGGCCC-3') para su clonaje en p374. En el caso del clonaje del 3'UTR de *daf-4* en p374 se utilizaron los sitios de restricción ApaI para ambos cebadores UTRF y UTRR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para amplificar las regiones 5' flanqueantes de los diferentes genes se utilizaron los cebadores de la Tabla M-5.

Gen	Símbolo	Longitud región 5'	Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Ref.
T25F10.2	<i>dbl-1</i>	2842 nt	Pdbl-1F3 Pdbl-1R3	GAGACTGCAGTTCATCCATCAACTGTCCATTC GAGAGGATCCAGTTGAGTTGGGCGCATCAGGC	
C32D5.2	<i>sma-6</i>	3093 nt	Psm-6F Psm-6R	CTTCACTGCAGCAACG GAGAGGATCCATAAATCTGAAATTTGCAAATAAATTG	227
C05D2.1	<i>daf-4</i>	3424 nt	Pdaf-4F Pdaf-4R	GAGACTGCAGAAGTAGGCAATCGGCAATAATGG GAGAGGATCCCTGAAAATTGAAGGTAGTTGAATTATTG	67
F29C4.1	<i>daf-1</i>	2505 nt	Pdaf-1F Pdaf-1R	GAGACTGCAGAAACTGTGGCCTAGTTCTGC GAGAGGATCCAATTTATTTCCCAAGAGTTTAGTTCATC	67
Y67D8A.4	<i>mir-58</i>	1655 nt	Pmir-58F Pmir-58R	GAGACTGCAGTTAAGGTAATACCGAATTTGGCTC GAGAGGATCCATCGGGGGATAGGTCGAGAGG	
K01F9.3	<i>mir-80</i>	1683 nt	Pmir-80F Pmir-80R	GAGACTGCAGGGAATGAATCATTGGTAGACTGTGG GAGAGGATCCGAAAAAGGAATAAGCACAAAAAGTTGG	
F46C8.6	<i>dpy-7</i>	610 nt	Pdpy-7F Pdpy-7R	GAGACTGCAGGAAATGGTGAGTGTTCGAGCTC GAGAGGATCCCTTATCTGGAACAAAATGTAAGAATATTC	57
R12A1.4	<i>ges-1</i>	1302 nt	Pges-1F Pges-1R	GAGACTGCAGTTGGCATGAATACAGTGAACACAG GAGAAAGCTTGAATCAAAGATAAGATATGTAATAGATTTTGAAGC	
T21D12.9	<i>sma-10</i>	1605 nt	Psm-10F Psm-10R	GAGACTGCAGGATGGAGGTTTTACGGTTTTCCG GAGAGGATCCGTCCACATTTTGTACAGAAAACC	
T18D3.4	<i>myo-2</i>	1156 nt	Pmyo-2F Pmyo-2R	GAGACTGCAGTCGAGGCATTTGAATTGGGG GAGAGGATCCCGAGGGTTAAATGAAAAGTGGTGG	154

Tabla M-5: Cebadores utilizados para amplificar las regiones 5' flanqueantes. Se indica para cada gen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar las regiones 5' flanqueantes y su longitud. Las secuencias correspondientes a sitios de restricción se muestran en azul.

Para sobreexpresar genes se utilizaron los cebadores de la Tabla M-6.

Gen	Símbolo	Longitud amplicón	Cebadores	Secuencia (5' → 3')
Y67D8A.4	<i>mir-58</i>	3115 nt	mir-58OEF mir-58OER5	TTAAGGTAATACCGAATTTGGCTC CCCAGGTAAGTCTTCAAGTGC
Y67D8A.4	<i>pre-mir-58</i>	97 nt	premir-58F premir-58R	GAGAGGTACCCTCGTCATATCCATTGCCCTAC GAGAGAATTCCTACTAGCTCAGTCCATTGCCG
K01F9.3	<i>mir-80</i>	2736 nt	mir-80OEF mir-80OER2	GGAATGAATCATTGGTAGACTGTGG CAGGAGAATGTGATCCGAACC
C32D5.2	<i>sma-6</i>	2868 nt	sma-6BamH1F sma-6UTR _{Ap} R	GAGAGGATCCATGAACATCACCTTTATATTTATT GAGAGGGCCCTACAGGTCTGGAACAATG
F29C4.1	<i>daf-1</i>	7676 nt	Pdaf-1XbaF daf-1(ΔUTR)XmaR	GAGATCTAGAAAACCTGTGGCCTAGTTCTGC GAGACCCGGGCTAACCAAGAAGAAGTGGGCGTG
T21D12.9	<i>sma-10</i>	5324 nt	sma-10F sma-10R	GAGAGGATCCATGATTGTATATTGCCTATTACTAC GAGAGGGCCCTTAAACAATTATAAGTATTACTTTTCATTCCG

Tabla M-6: Cebadores utilizados para la sobreexpresión de genes. Se indica para cada gen las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar las diferentes regiones y su longitud. Las secuencias correspondientes a sitios de restricción se muestran en azul.

2. MÉTODOS

2.1. Combinación de cepas de *C. elegans*

La combinación de diferentes cepas se realizó en el laboratorio mediante cruzamientos entre hermafroditas y machos de cada una de ellas. El genotipo de las cepas se confirmó mediante PCR y electroforesis, salvo cuando se trató de alelos que presentaban mutaciones puntuales. En este caso, se verificaron mediante secuenciación del DNA. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla M-3.

2.2. Construcciones plasmídicas

2.2.1. Reporteros para la cuantificación de la capacidad inhibitoria entre la familia de *mir-58* y los 3'UTR de sus genes diana

2.2.1.1. Ensayos de luciferasa

Para cuantificar la capacidad de represión de los diferentes miembros de la familia de *mir-58* sobre los genes *dbl-1*, *daf-7*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1* (ver apartado 2.3), se clonaron sus 3'UTRs silvestres y mutados detrás del gen de la luciferasa de *Renilla* en el vector psiCHECK-2 (*Promega*) entre los sitios de restricción para las enzimas XhoI y NotI (Figura M-1). En primer lugar, los 3'UTRs silvestres se amplificaron mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa N2 con los cebadores UTRF y UTRR, los cuales contienen en los extremos bases adicionales correspondientes a los sitios de corte para las enzimas XhoI y NotI (Tabla M-4). Los 3'UTRs mutados se obtuvieron por mutagénesis dirigida mediante superposición de productos de PCR con los cebadores correspondientes⁷⁶ (Tabla M-4). Los cebadores contenían tres nucleótidos mutados correspondientes a la unión del miRNA en las posiciones 2-4 de la región "seed" (nucleótidos en rojo en Tabla M-4 y línea roja en la Parte II del Anexo I). Los fragmentos mutados resultantes se purificaron con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)* y se utilizaron como molde para obtener el 3'UTR mutado completo mediante PCR con los cebadores de los extremos (UTRF y UTRR) de la Tabla M-4. Los productos de PCR de los 3'UTRs silvestres y mutados se clonaron mediante el método T/A en el vector pTZ57R/T, con el kit *InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)*, o en pGEM-T (*Promega*) y se transformaron en *E. coli* DH5 α . Se purificó el DNA plasmídico de las colonias positivas y se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y NotI. Los fragmentos digeridos se separaron mediante electroforesis y se purificaron con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)* para ligarlos con *T4 DNA Ligase (Promega)* al vector de expresión psiCHECK-2. En todos los casos se comprobó mediante secuenciación que las construcciones generadas eran las correctas.

2.2.1.2. Ensayos *in vivo*

Para analizar los 3'UTRs de los posibles genes regulados por la familia de *mir-58* en *C. elegans*, se utilizó el vector p374⁹⁶, en el que se sustituyó la región 5' flanqueante de *trx-3* por la de cada gen en particular, digeridas con PstI y BamHI (Figura M-1). Las regiones 5' flanqueantes de los genes se amplificaron por PCR a partir del DNA genómico de la cepa N2 utilizando los cebadores de la Tabla M-5, que contienen en su extremo 5' bases adicionales correspondientes a los sitios de corte para las enzimas PstI y BamHI. Los fragmentos correspondientes a los 3'UTRs de cada uno de los genes de interés se amplificaron a partir del DNA genómico de la cepa N2 mediante PCR, utilizando los cebadores UTRF y UTRR de la Tabla M-4, y se reemplazaron por el 3'UTR de *unc-54* mediante la digestión con EcoRI y ApaI, salvo para el 3'UTR de *daf-4*, que se digirió con EcoRI por presentar el 3'UTR un sitio de restricción para ApaI. Como en el apartado anterior, los productos de PCR se subclonaron primero en un vector comercial (pGEM-t o pTZ57R/T) y los clones positivos se digirieron con las enzimas correspondientes, se purificaron y se ligaron al vector de expresión. Los 3'UTRs mutados se generaron de la misma forma que en el apartado 2.2.1.1. y se introdujeron en el vector p374 de forma análoga a los 3'UTRs silvestres. Las nuevas construcciones se secuenciaron para verificar que la secuencia era la correcta en todos los casos.

2.2.2. Sobreexpresión de genes

Para sobreexpresar *sma-6* con su 3'UTR silvestre, se amplificó por PCR una región genómica que contenía la región codificante (desde el codón ATG iniciador) y el 3'UTR completo con los cebadores descritos en la Tabla M-6. El amplicón se subclonó por ligación T/A en el vector pTZ57R/T, se cortó con las enzimas BamHI y ApaI y se purificó para introducirlo en el vector p374 (Figura M-1) de forma similar a los amplicones de los apartados anteriores. Una vez comprobado que la secuencia era la correcta, se digirió el vector con las enzimas PstI y BamHI para introducir la secuencia 5' flanqueante de *sma-6* (obtenida previamente en el apartado 2.2.1.2.). La mutagénesis de los nucleótidos del 3'UTR, correspondientes a la unión del miRNA en las posiciones 2-4 de la región "seed", se realizó sobre este vector con el kit *GENEART® Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)*, usando los cebadores *sma-6UTRmutF* y *sma-6UTRmutR* (Tabla M-4).

daf-1 fue amplificado con su región 5' flanqueante, pero sin su 3'UTR, con los cebadores de la Tabla M-6 y fue insertado de forma similar al amplicón de *sma-6* en el vector pPD49.83 (*Addgene*, Figura M-2), entre los sitios de restricción XbaI y XmaI.

Para sobreexpresar *mir-58* y *mir-80* con sus regiones 5' flanqueantes y 3'UTRs, se amplificaron los fragmentos genómicos utilizando los cebadores de la Tabla M-6 y se introdujeron en el vector de clonación pCR2.1 (*Invitrogen*) con el kit TOPO® TA Cloning® (*Invitrogen*)⁵.

Para la sobreexpresión de *mir-58* en diferentes tejidos, se amplificaron las secuencias del pre-miRNA con los oligonucleótidos de la Tabla M-6 y se intercambiaron con la secuencia codificante para GFP del vector de expresión pPD95.75 (*Addgene*, Figura M-2), comprendida entre los sitios de restricción KpnI y EcoRI, de forma similar a lo descrito previamente para otros miRNAs¹⁸. En la Tabla M-5 se muestran los cebadores para amplificar las diferentes regiones 5' flanqueantes, que se introdujeron entre los sitios reconocidos por PstI y BamHI (salvo para la región 5' flanqueante de *ges-1*, que se utilizaron los sitios de restricción PstI y HindIII), de forma similar a la descrita en el apartado 2.2.1.2. La región 5' flanqueante de *rpl-28* se obtuvo de la digestión del vector L4455 (*Addgene*, Figura M-3).

Para sobreexpresar *sma-10* se amplificó el gen por PCR, desde el inicio de la secuencia codificante hasta el final del 3'UTR, con los cebadores de la Tabla M-6 y se introdujo entre los sitios de restricción BamHI y ApaI en el vector pPD95.75 (Figura M-2), de forma similar al amplicón de *sma-6*. Las secuencias 5' flanqueantes específicas de tejido, así como la del propio gen *sma-10*, se insertaron entre las dianas de las enzimas de restricción PstI y BamHI, amplificadas previamente con los cebadores de la Tabla M-5.

Todas las construcciones se secuenciaron para verificar que eran las correctas.

2.2.3. Reporteros de la actividad promotora de *sma-6* y *sma-10*

La región 5' flanqueante de *sma-6* se amplificó con los cebadores de la Tabla M-5 y se intercambió por la región 5' flanqueante de *trx-3* del vector p374 (Figura M-1), digiriendo con PstI y BamHI, de forma análoga a la descrita anteriormente (apartado 2.2.1.2.).

Para amplificar la región 5' flanqueante de *sma-10*, se utilizaron los cebadores de la Tabla M-5 y se introdujo en el vector pPD95.75 entre los sitios de restricción de PstI y BamHI (Figura M-2), de forma similar al apartado 2.2.1.2.

2.2.4. Reportero para la detección de núcleos hipodérmicos de *hyp 7*

La región 5' flanqueante de *dpy-7* se amplificó mediante PCR con los cebadores de la Tabla M-5 y se clonó en el vector L4455, de forma análoga a la descrita para otras regiones similares (apartado 2.2.1.2.), reemplazando la región 5' flanqueante de *rpl-28* tras digerir ambas moléculas con las enzimas de restricción PstI y BamHI.

2.3. Ensayos de la actividad 3'UTR-miRNA mediante luciferasa en células *HeLa*

Se crecieron células *HeLa* a 37 °C con CO₂ al 5% en medio DMEM (*Lonza*) suplementado con suero fetal bovino al 10% (*Hyclone*), 4 mM de Glutamina (*Lonza*) y 200 U/ml de Penicilina/Estreptomina (*Lonza*).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células por pocillo. 24-48 horas después se transfectaron, por triplicado y con *Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*, 150 ng del reportero de luciferasa con los 3'UTRs de los genes que se iban a comprobar (ver apartado 2.2.1.1) y 50 nmol de los miRNAs sintéticos (*miRIDIAN, Dharmacon*). Las células se incubaron durante 48 horas antes de proceder a su lisado y posteriormente se cuantificó la actividad de ambas luciferasas con el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)* en el luminómetro *Infinite M200 (TECAN)*. La actividad luciferasa de *Renilla* fue normalizada con la actividad luciferasa de *Firefly* como control de transfección. El efecto de los diferentes miRNAs sintéticos de la familia de *mir-58* sobre los 3'UTRs de los diferentes genes de estudio se analizó relativizando el valor normalizado de la actividad luciferasa de *Renilla* al valor obtenido con el miRNA sintético control miR-67 para cada tipo de 3'UTR.

Las gráficas relacionadas con los ensayos de luciferasa presentadas en esta tesis corresponden a un único experimento, siempre representativo de dos o más réplicas experimentales.

2.4. Silenciamiento génico mediante RNAi

En *C. elegans* es relativamente sencillo reprimir la expresión de genes mediante RNAi a través del alimento. Para ello, se alimentan los nematodos con bacterias *E. coli* transformadas con un plásmido que tiene un fragmento del gen a inactivar, embebido entre dos promotores inducibles por tetraciclina. En presencia de este antibiótico se induce, en las bacterias, la expresión de dsRNA del fragmento del gen que se quiere silenciar. El RNA de doble cadena del gen de interés, que generan estas bacterias, difunde desde el intestino de los nematodos para formar un híbrido en los diferentes tejidos con el mRNA del mismo gen endógeno. Finalmente, ambos RNAs serán degradados por la maquinaria celular de silenciamiento génico (RISC)⁵⁰.

Para reprimir la expresión de *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* o *sma-10*, nematodos sincronizados en el estadio L4 fueron alimentados con la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) transformada con plásmidos de RNAi de cada uno de los genes anteriormente mencionados. Los plásmidos de RNAi de *daf-4* y *sma-10* se obtuvieron de *Source BioScience*. El plásmido de *sma-6* contiene un fragmento de este gen, que amplificamos por PCR con los cebadores 5'-CAGCTGTACACGGAAGTGG-3' y 5'-TCAACTTTACGCTGCGATTG-3' e insertamos en el vector L4440 (*Addgene*). Los clones bacterianos se cultivaron durante 16 horas a 37 °C y 150 rpm en LB suplementado con 200 mg/mL de ampicilina (*Sigma*) y 12,5 mg/mL de tetraciclina (*Sigma*). De este cultivo se repartieron 120 µL por placa P-60 de NGM con 1mM IPTG y 25 µg/mL de carbenicilina y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente antes de que se pusieran las larvas L4. Como el efecto del silenciamiento génico se observa más claramente en la F1, la progenie fue separada individualmente en placas con RNAi y el tamaño máximo de los adultos de la progenie fue analizado como se describe en el

apartado 2.7. de esta sección. Los ensayos se realizaron, al menos, por duplicado, con un mínimo de 15 individuos por cepa.

2.5. Obtención de transgénicos

Los animales transgénicos se generaron por microinyección de hermafroditas adultas en las gónadas^{141, 142}, como se describe brevemente a continuación. Hermafroditas adultas de unas 75 horas de edad fueron inmovilizadas sobre agarosa al 2% ligeramente rehidratada y localizada encima de un cubreobjetos, dentro de una gota de aceite de microinyección (*Halocarbon Oil Series HC-700, Halocarbon Products Corporation*) para ralentizar su desecación. En el microscopio (*AXIO Observer.A1, Zeiss*) se colocó la hermafrodita de tal forma que el sincitio de una de sus gónadas estuviera en un ángulo de unos 45° con la aguja de microinyección, previamente cargada con la mezcla de DNAs a microinyectar. Las agujas de microinyección se generaron con la máquina *Flaming/Brown Micropipette Puller P97 (Sutter Instruments)* a partir de capilares *BF100-50-10 (Sutter Instrument)* y se acoplaron al microinyector de *Eppendorf*, que está compuesto por una máquina de vacío (*FemtoJet*) y un brazo de microinyección (*Inyekt Man NI 2*). La microinyección de la mezcla de DNAs se realizó dentro del sincitio de la gónada, que se hincha cuando se ha introducido la mezcla de DNAs correctamente. La hermafrodita microinyectada se recuperó del cubreobjetos añadiendo una gota de M9, lo que permite que se despegue de la agarosa, y se transfirió a otra gota de M9 en una placa de NGM para favorecer su recuperación. Al día siguiente se observó la descendencia de las hermafroditas microinyectadas para confirmar el éxito del proceso: como se ha añadido un vector que expresa GFP a la mezcla de microinyección ($P_{sca-1}::GFP$, vector pGK10²³⁷), la presencia de progenie fluorescente es indicativa de una microinyección satisfactoria. Para no dañar a los transgénicos, éstos se individualizaron cuando han alcanzado, al menos, el estadio L4. La selección de los transgénicos se realizó en base a la expresión de GFP y a su capacidad para desarrollarse en presencia de higromicina. La selección por resistencia a higromicina se llevó a cabo en placas de NGM suplementadas con higromicina B (*Sigma*) a 200 mg/L y es debida a que la mezcla de microinyección contiene el vector pHygroSfi (regalo del Dr. J. Pérez-Martín).

De la progenie de las hermafroditas microinyectadas, se seleccionaron varias líneas transgénicas independientes en base a una fluorescencia estable de GFP. Los nematodos seleccionados se mantuvieron a 15 °C en placas de NGM con higromicina B (*Sigma*) a 200 mg/L. Para el análisis de la expresión de $P_{sma-10}::GFP$ y para la sobreexpresión de *dbl-1* en la cepa EUB0032, se utilizaron $P_{myo-3}::RFP$ (vector pPD185.114 a 50 ng/μL) y $P_{trx-3}::mCherry$ (vector p374), respectivamente, como marcadores fluorescentes de microinyección. Para conferir mayor estabilidad a los “arrays” extracromosómicos, se añadió *1Kb DNA ladder*

MATERIALES Y MÉTODOS

(Invitrogen) a 80 ng/ μ L en todas las mezclas de microinyección^{5, 18}. En la Tabla M-7 se muestran las concentraciones de los diferentes componentes que constituyeron las mezclas que se microinyectaron.

En los ensayos para evaluar la regulación *in vivo* que los miRNAs de la familia de *mir-58* ejercen sobre los 3'UTRs de los genes de las rutas de TGF β , se microinyectaron nematodos de la cepa silvestre N2. Los "arrays" extracromosómicos de varias líneas transgénicas independientes se transfirieron al fondo genético *mir-58f(-)*, mediante dos cruces sucesivos entre machos procedentes de la cepa N2 con hermafroditas de la cepa MT15563. Para el resto de "arrays" extracromosómicos, cuya expresión quería compararse entre diferentes fondos genéticos, sólo hizo falta un cruce con hermafroditas de la cepa a analizar^{229, 233}.

Nombre	Plásmido	pHygroSfi	p374	pGK10
P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR_{dbl-1}WT	60 ng/ μ L	40 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR_{dbl-1}MUT	60 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{sma-6}WT	50 ng/ μ L	50 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{sma-6}MUT	50 ng/ μ L	50 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-4}::mCherry::3'UTR_{sma-6}WT	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-4}::mCherry::3'UTR_{sma-6}MUT	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-4}::mCherry::3'UTR_{daf-4}WT	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-4}::mCherry::3'UTR_{daf-4}MUT	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-1}::mCherry::3'UTR_{daf-1}WT	60 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{daf-1}::mCherry::3'UTR_{daf-1}MUT	60 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{unc-54}	50 ng/ μ L	50 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
mir-58++	20 ng/ μ L ⁵	50 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
mir-80++	50 ng/ μ L ⁵	50 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
WRM0624CB02: fósmino <i>dbl-1</i>	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	40 ng/ μ L	-
Control mCherry	-	30 ng/ μ L	50 ng/ μ L	-
Control GFP	-	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
<i>sma-6</i>++ 3'UTR WT	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
<i>sma-6</i>++ 3'UTR MUT	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{dpy-7}::4xNLS::GFP::3'UTR_{unc-54}	50 ng/ μ L	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-
<i>daf-1</i>++ (Δ3'UTR)	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{mir-58}::pre-mir-58	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{mir-80}::pre-mir-58	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{rpl-28}::pre-mir-58	20 y 100 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{dpy-7}::pre-mir-58	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{ges-1}::pre-mir-58	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{sma-10}::<i>sma-10</i>	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{myo-2}::<i>sma-10</i>	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{dpy-7}::<i>sma-10</i>	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{trx-3}::<i>sma-10</i>	20 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	20 ng/ μ L
P_{sma-10}::GFP:3'UTR_{unc-54}	50 ng/ μ L	30 ng/ μ L	-	-

Tabla M-7: Concentraciones de las mezclas de microinyección utilizadas para obtener transgénicos.

2.6. Cuantificación de los niveles de fluorescencia

A la hora de cuantificar la fluorescencia de los animales, tuvimos en cuenta las siguientes consideraciones: 1) Se ha postulado que, al microinyectar una determinada mezcla de DNAs, los “arrays” extracromosómicos, que se forman en el núcleo del gameto, contienen un porcentaje de cada plásmido proporcional a la concentración introducida de cada uno de ellos¹⁴². 2) Observamos que había pequeñas variaciones en los niveles de fluorescencia de GFP y mCherry entre los individuos procedentes de una misma hermafrodita microinyectada, por lo que se trató a cada uno de los descendientes como líneas (cepas) independientes. 3) Además, observamos que los niveles de las dos proteínas fluorescentes variaban en la misma proporción entre individuos de una misma línea, como ya se había observado con anterioridad¹⁸¹. Por esta razón, para comparar los niveles de fluorescencia de los reporteros entre cepas transgénicas, se utilizaron los niveles del marcador $P_{sca-1}::GFP$ como normalizador de cada “array” extracromosómico (cepa transgénica).

Para cuantificar la fluorescencia de los nematodos en el estadio deseado, se pusieron en portaobjetos sobre agarosa al 5% y se utilizó 10 mM ácido sódico (NaN_3) en M9 para anestesiarlos¹⁸². La emisión de fluorescencia de GFP y mCherry se capturó individualmente durante un tiempo concreto, que se mantuvo igual para cada “array” extracromosómico. Para fotografiar las larvas en el estadio L4, se utilizó la videocámara *DFC360FX (Leica)* acoplada al estereomicroscopio *M165FC (Leica)*, mientras que las larvas en el estadio L2 se fotografiaron en el microscopio *AxioZeiss Imager.A1 (Zeiss)* con la cámara *Axiocam Mrm (Zeiss)*.

La intensidad media de fluorescencia de cada individuo se determinó a partir del área de cada animal, medida con el programa *ImageJ (National Institutes of Health)*. A este valor se le restó el nivel de fluorescencia basal, debido básicamente al fondo inespecífico generado por la muestra, y se normalizaron los valores de mCherry dividiéndolos por los de GFP. Los valores mCherry/GFP obtenidos de cada individuo se relativizaron a la media de este mismo valor en nematodos control, de tal manera que calculamos los valores de inducción o represión en los diferentes fondos genéticos con respecto al control. En el caso del análisis del reportero de *daf-8* ($P_{daf-8}::GFP::daf-8$) y de los reporteros de los promotores P_{sod-3} , P_{mir-58} y P_{sma-10} , la intensidad media de la fluorescencia de GFP del área de cada individuo se relativizó directamente a la media de este valor en nematodos con fondo genético silvestre (en el caso de P_{sma-10} expuestos a OP50). Para analizar si las diferencias entre los diferentes fondos genéticos de estos valores de fluorescencia eran significativas, se aplicó el estadístico t de Student.

2.7. Determinación de la longitud máxima de los nematodos

Para determinar la longitud máxima de los animales, se sincronizó una población de nematodos y se fotografiaron individualmente en el estereomicroscopio *MZ7₅* con la cámara *JVC KY-F550 (JVC Professional)*

Europe Ltd.) en intervalos de 24 horas a partir de las 85 horas tras la eclosión. La longitud de los animales se midió con el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health*). Para determinar la longitud máxima con precisión, se tomaron por individuo los valores de dos-tres días consecutivos, en los que la media de la longitud de la cepa fue máxima, para hacer el promedio de ellos. Las longitudes máximas relativas se obtuvieron dividiendo estos valores individuales máximos promedio entre el valor medio que se obtuvo de la población con fondo genético silvestre o de referencia. Se utilizó el estadístico t de Student para determinar si las diferencias de tamaño entre las diferentes cepas eran significativas. Las longitudes, que se presentan en esta tesis, corresponden a la media de, al menos, dos experimentos individuales, con un mínimo de 20 individuos por cepa.

2.8. Cuantificación de las células precursoras de la hipodermis y de los núcleos de hyp 7

Para cuantificar el número de células precursoras de la hipodermis, se cruzó el transgénico JR667 ($P_{SCM}::GFP$) con la cepa MT15024 (*mir-58(n4640)*). Se fotografiaron, al menos, 13 individuos adultos de JR667 y de *mir-58(n4640);P_{SCM}::GFP* con la cámara *DFC360FX* (*Leica*) acoplada al estereomicroscopio *M165FC* (*Leica*), para contar las células que expresaban GFP.

Para comparar el número de núcleos de hyp 7 entre N2 y *mir-58f(-)*, se microinyectaron ambas cepas con el marcador de núcleos hipodérmicos $P_{dpy-7}::4xNLS::GFP$ (Tabla M-7) y se utilizó el estereomicroscopio *M165FC* (*Leica*) para contar los núcleos de 18 animales de cada cepa. Sólo se contabilizaron los núcleos hipodérmicos de un lado de los animales, excluyendo los núcleos dorsales y ventrales.

2.9. Cuantificación de la ploidía

Una vez que los individuos alcanzaron su tamaño máximo, se fijaron con solución de Carnoy durante, al menos, 24 horas⁴⁹. Tras tratarlos 30 minutos con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol, *Sigma*) a una concentración de 100 ng/mL en PBS¹⁸², se observaron al microscopio *AxioZeiss Imager.A1* (*Zeiss*) y se fotografiaron los núcleos hipodérmicos de hyp 7 y de la cuerda nerviosa ventral con la cámara *Axiocam Mrm* (*Zeiss*). El área y la intensidad media de fluorescencia de los núcleos se determinaron con el programa *ImageJ* (*National Institutes of Health*). Se estimó el contenido en DNA de los núcleos diploides haciendo la media del producto del área y la intensidad media de fluorescencia en los núcleos de la cuerda ventral. La ploidía del sincitio hipodérmico hyp 7 se obtuvo dividiendo el producto del área y la intensidad media de fluorescencia de sus núcleos por la estimación del contenido en DNA de un núcleo haploide^{49, 131, 194}. Para analizar si las diferencias de ploidía hipodérmica entre cepas eran significativas, se aplicó el estadístico t de Student. Los datos de ploidía, que se presentan en esta tesis, corresponden a la media de, al menos, dos experimentos, con un mínimo de 6 individuos por cepa.

2.10. Ensayos de dauer

Para estudiar la entrada en dauer por una elevada temperatura, se sincronizó una población de nematodos mediante el método de puesta de huevos (20-40 hermafroditas ponen huevos durante 4-6 horas a 20 °C y, posteriormente, las hermafroditas son eliminadas de la población) y, tras tres días, se analizó visualmente la presencia de larvas dauer en la placa crecida a una determinada temperatura (20 °C, 22,5 °C o 25 °C). En los ensayos de entrada en dauer de transgénicos, se utilizaron placas con higromicina para seleccionar la progenie que porta el “array” extracromosómico.

En los análisis de entrada en dauer por inanición, se pusieron 4 hermafroditas grávidas por placa y se dejaron las placas a 15 °C durante 20 días para que la población descendiente se quedara sin comida. Los nematodos se recogieron de las placas con 1% SDS y se dejaron 30 minutos tras los cuales se cuantificaron las larvas que se movían, por triplicado.

2.11. Caracterización morfológica de dauer

Para describir morfológicamente las larvas arrestadas por aumento de temperatura, se anestesiaron con 25 mM acida sódica (NaN₃) en M9¹⁸² y se fotografiaron con el objetivo 63x en el microscopio confocal DMI 6000 (Leica).

2.12. Cuantificación de mRNAs y miRNAs mediante qRT-PCR

El RNA total de las poblaciones sincronizadas se extrajo con el kit *miRNeasy* (Qiagen). Para la retrotranscripción del mRNA, se utilizó el kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). La RT-PCR a tiempo real se llevó a cabo en el termociclador *7500 Fast* (Applied Biosystems), utilizando sondas *TaqMan* (*mRNA Assays*, Applied Biosystems) para cuantificar los niveles de cDNA. Para los ensayos de los genes modulados por la familia de *mir-58*, se utilizaron los genes *crn-1* y *cey-1* como controles endógenos, ya que sus proteínas no variaron en otros estudios realizados en mutantes *mir-58(n4640)*⁹⁹. Para el análisis de las muestras del apartado de *sma-10*, se utilizaron *ama-1*⁴⁵ y *hrs-1*¹⁷⁵, al ser genes propuestos por otros autores como genes control, ya que no varían como consecuencia de la actividad de la ruta TGFβ Sma/Mab.

Para analizar los niveles de miRNAs, también se utilizaron ensayos de *TaqMan* (*microRNA Assays*, Applied Biosystems), tanto para la retrotranscripción como para la RT-PCR a tiempo real. La determinación de los miRNAs más estables entre cepas, para utilizarlos como miRNAs control, se llevó a cabo utilizando los programas *Genorm*²⁰⁷ y *Normfinder*⁷. En la ruta TGFβ Sma/Mab los miRNAs más estables fueron *mir-47* y *mir-81*, mientras que para la de TGFβ Dauer fueron *mir-81* y *mir-82*.

Las gráficas de qRT-PCR presentadas en esta tesis corresponden a la media de, al menos, tres réplicas biológicas y, en cada una de las réplicas, se analizaron las muestras por triplicado. Para normalizar entre

réplicas biológicas del mismo estadio larvario o condición experimental, se cambiaron los valores umbral (*Threshold*) de cada gen, asignados por el programa *7500 software v2.0.6 (Applied Biosystems)* para cada qRT-PCR, por la media de estos valores. Los nuevos datos Ct (ciclo umbral – *cycle Threshold*), que se obtuvieron con el programa *7500 software v2.0.6 (Applied Biosystems)*, se analizaron con el software REST¹⁶⁵. Este programa usa el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para calcular los cambios relativos de los transcritos y realiza un test de aleatorización (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test*[®]) para asignar la significancia entre genes y cepas.

2.13. Ensayos de longevidad

El estudio de la longevidad se llevó a cabo a 20 °C en placas de NGM sembradas con OP50 y suplementadas con 50 µM FUdR, para evitar el desarrollo de la progenie y evitar el matricidio¹³⁴. Se transfirieron por placa 10 individuos en estadio L4 y este momento se definió como tiempo 0 del experimento (t_0). Los animales que explotaron por la vulva o salieron del agar se incluyeron en el análisis como individuos censurados. Se utilizó el programa *Prism5 (Graphpad)* para generar las curvas de supervivencia y calcular los tiempos de vida media. Para analizar si las diferencias de longevidad entre cepas eran significativas (valores $p < 0,01$), se utilizó el método *log-rank (Mantel-Cox)*. Los ensayos se realizaron por duplicado con, al menos, 30 individuos por cepa. Las curvas de longevidad presentadas en esta tesis corresponden a un único experimento, siempre representativo de varias réplicas experimentales.

2.14. Análisis del período reproductivo

La capacidad de reproducción de las diferentes cepas se estudió a 20 °C en placas de NGM sembradas con OP50. 30 nematodos por cepa se individualizaron en el estadio L4 y se transfirieron diariamente de placa hasta que terminó su período reproductivo. Las placas se mantuvieron a 15 °C durante 2-3 días para cuantificar la progenie viable diaria por individuo. Aquellos individuos que murieron por matricidio, explotaron por la vulva o se escaparon fueron censurados en el análisis. Se utilizó el programa *Prism5* de forma similar al apartado 2.13. Los ensayos se realizaron por duplicado con, al menos, 30 individuos por cepa. Los datos de capacidad reproductiva presentados en esta tesis corresponden a un único experimento, siempre representativo de varias réplicas experimentales.

2.15. Ensayos de inmunidad

Para analizar la resistencia a *S. marcescens*, se transfirieron 10 individuos en estadio L4 (t_0) por placa de NGM sembrada con este patógeno^{136, 170} y se incubaron a 20 °C. Se observaron los individuos en intervalos de 24 horas. Los ensayos se realizaron con 30 individuos por cepa.

Los ensayos de inmunidad con *P. aeruginosa* PA14 se llevaron a cabo en placas SKP a 25 °C de forma análoga a otros autores^{168, 170, 195}, poniendo también 10 larvas L4 por placa (t_0). La supervivencia de cada animal se analizó cada 6-8 horas. Los ensayos se realizaron con, al menos, 40 individuos por cepa.

Se transfirieron los individuos vivos cada 48 horas a nuevas placas hasta que finalizó su período reproductivo, para evitar confundirlos con su descendencia. Los animales que explotaron por la vulva, murieron por matricidio o salieron del agar se incluyeron en el análisis como individuos censurados. En estos ensayos también se utilizó el programa *Prism5* con los mismos fines que en el apartado 2.13. Las curvas de supervivencia presentadas en esta tesis corresponden a un único experimento, siempre representativo de varias réplicas experimentales.

2.16. Búsqueda informática de genes diana de miRNAs

Los genes diana teóricos de la familia de *mir-58* se buscaron en 7 bases de datos: mirZ⁶⁹, mirWiP⁶⁸, Microcosm/miRBase^{42, 61, 62}, TargetScanWorm^{93, 119}, PicTar¹¹⁵, microRNA.org^{13, 14, 42, 97} y mirSOM⁷¹. Se crearon bases de datos en *Access (Microsoft)* para cruzar la información de las bases de datos online y se seleccionaron aquellos genes que, al menos, aparecían en tres de ellas.

Las bases de datos de los genes seleccionados, candidatos a ser regulados por los miRNAs, se cruzaron a su vez con otras bases de datos para encontrar genes involucrados en el control de tamaño (*Wormbase*: fenotipo largo (*lon*)).

RESULTADOS

1. La familia de *mir-58* y TGF β

Hasta el estudio de Álvarez-Saavedra y Horvitz⁵, ningún mutante de miRNAs en *C. elegans* había mostrado alteraciones en el tamaño corporal, fenotipo dependiente de TGF β Sma/Mab⁵. Sin embargo, los mutantes de la familia de *mir-58* (en adelante *mir-58f(-)*) resultaron ser pequeños y, además, incapaces de entrar en el estadio de resistencia dauer⁵, fenotipo dependiente de TGF β Dauer. Ambos fenotipos podrían explicarse si la familia de *mir-58* (en adelante *mir-58f*) alterase la señalización a través de TGF β . Por lo tanto, nos preguntamos si estos miRNAs podrían regular ambas rutas de TGF β .

1.1. Genes de las rutas TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer son posibles genes diana de *mir-58f*

Para identificar potenciales genes regulados por miRNAs concretos, hay disponibles herramientas informáticas que predicen con una alta probabilidad la unión entre un miRNA y un gen. Cada uno de estos programas informáticos utiliza parámetros y algoritmos específicos y diferentes^{11, 137, 164, 200}.

Tras buscar en siete de estos programas genes probables de ser regulados por los cinco miembros de la familia de *mir-58* (*mir-58*, *mir-80*, *mir-81*, *mir-82* y *mir-1834*), se identificaron los genes de los ligandos de las dos rutas de TGF β más conocidas en el nematodo, *dbl-1* (TGF β Sma/Mab) y *daf-7* (TGF β Dauer), así como de los receptores de ambas rutas, *daf-1*, *daf-4* y *sma-6* (Tabla R-1). Todos estos genes tienen en sus 3'UTRs secuencias con complementariedad parcial a los miRNAs de *mir-58f* (Parte II del Anexo I).

Base de Datos	<i>sma-6</i>	<i>dbl-1</i>	<i>daf-1</i>	<i>daf-4</i>	<i>daf-7</i>
PicTar	X	miR-58;80-82	X	X	X
mirZ	miR-58	miR-58;80-82	X	X	X
mirWIP	miR-58;80-82	miR-58;80-82	miR-58;80-82	miR-58;80-82	miR-58;80-82
mirSOM	miR-58	miR-80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834
TargetScanWorm	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834
microRNA.org	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834	miR-58;80-82; miR-1834
Microcosm/ miRBase	miR-58	X	miR-80-82	miR-80	X

Tabla R-1: Resumen de resultados de la búsqueda de genes diana de *mir-58f* relacionados con las rutas TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer. Se muestran las predicciones de las diferentes bases de datos para cada gen. La X indica que para ese gen, en esa base de datos, no se han encontrado predicciones de regulación por algún miembro de *mir-58f*.

Aunque estos cinco genes de las rutas de TGF β son candidatos a ser genes diana de *mir-58f in silico*, por las predicciones de cuatro programas informáticos, es necesario comprobar si estas interacciones pronosticadas suceden *in vivo*, ya que estos programas predicen falsos positivos con cierta frecuencia.

1.2. Los receptores y ligandos de TGFβ Sma/Mab y TGFβ Dauer están sobreexpresados en mutantes de *mir-58f*

Para averiguar si *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4*, *daf-1* y *daf-7* están regulados por *mir-58f* *in vivo*, se midieron los niveles de mRNA de estos genes en dos fondos genéticos: animales silvestres N2 y animales mutantes que no expresan cuatro de los cinco miembros de *mir-58f*, los mutantes *mir-58f(-)*. Se eligieron tres estadios larvarios diferentes, L1 y L2 por ser clave para TGFβ Dauer⁸³ y L4 por ser determinante para TGFβ Sma/Mab^{133, 175}. También se analizaron los niveles de expresión de estos genes en poblaciones no sincronizadas, que denominamos estadio mixto porque están formadas por una mezcla de estadios del desarrollo, excluyendo larvas dauer. El estudio de estas muestras de estadio mixto permite detectar si la regulación de *mir-58f* sobre estos componentes de TGFβ se produce en otro momento de su ciclo vital diferente a L1, L2 o L4.

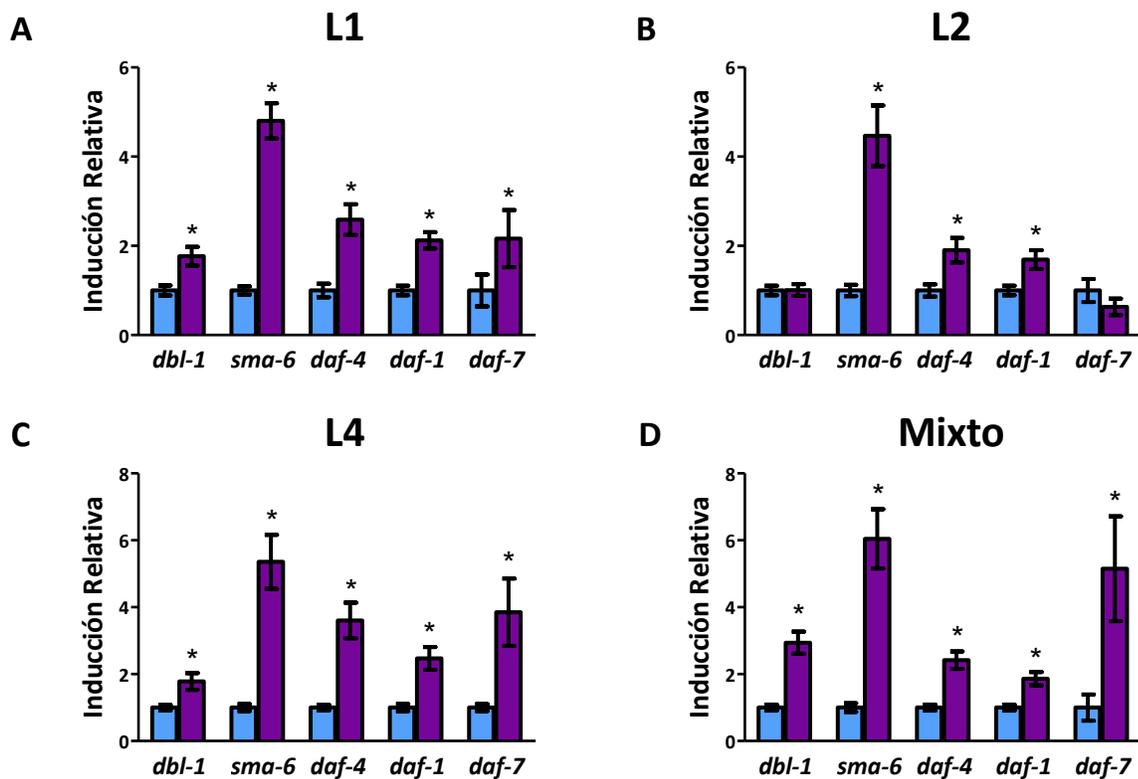


Figura R-1: Los mRNAs de los receptores y ligandos de ambas rutas de TGFβ están sobreexpresados en *mir-58f(-)* con respecto al control N2. Se muestran los resultados de cuatro experimentos de qRT-PCR independientes en los estadios larvarios L1 (A), L2 (B) y L4 (C), así como en poblaciones de estadio mixto (D). Las barras azules muestran los niveles de mRNAs en la cepa control N2 y las moradas los presentes en *mir-58f(-)* normalizados a los controles. La barra de error muestra la desviación estándar y la estrella indica diferencias estadísticamente significativas con N2 con una probabilidad <0,05.

Mediante ensayos de qRT-PCR se observó que en *mir-58f(-)* los mRNAs de *sma-6*, *daf-4* y *daf-1* (que codifican para los receptores de ambas rutas de TGFβ) están significativamente sobreexpresados con respecto a N2 en todos los momentos durante el desarrollo estudiados, así como en poblaciones mixtas

(Figura R-1A-D). Los niveles de mRNA de *dbl-1* y *daf-7* (que codifican para los ligandos) son estadísticamente más altos en *mir-58f(-)* que en los nematodos silvestres en los estadios larvarios L1 (Figura R-1A) y L4 (Figura R-1C), así como en muestras provenientes de una población mixta (Figura R-1D). La ausencia de estos miRNAs no afectó, sin embargo, a los niveles de mRNA de *dbl-1* o *daf-7* en el estadio larvario L2 (Figura R-1B).

Estos experimentos sugieren que los mRNAs de *sma-6*, *daf-4*, *daf-1*, *dbl-1* y *daf-7* están sujetos a la regulación de *mir-58f* en todos los estadios estudiados, con la excepción de *dbl-1* y *daf-7* en L2, estadio donde esta regulación no se detecta.

1.3. ¿Están los receptores y ligandos de las rutas TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer regulados directamente por *mir-58f*?

Para averiguar si *mir-58f* regula directamente los genes anteriormente identificados, realizamos varios tipos de ensayos previamente validados por otros grupos. Estos ensayos están basados en la utilización de genes reporteros (luciferasa o proteínas fluorescentes) bajo la influencia de regiones génicas donde se ha pronosticado la interacción con el miRNA. La mayoría de regiones génicas sujetas a la regulación por miRNAs se encuentran en el 3'UTR de los genes, como ocurre con estos genes de TGF β según las predicciones de los diferentes programas bioinformáticos. Por lo tanto, la secuencia correspondiente al 3'UTR del gen, susceptible de ser regulado por un determinado miRNA, se clona detrás del gen reportero. Los niveles del mRNA del reportero serán regulados por la interacción del 3'UTR con el miRNA, lo cual resultará en un cambio cuantificable en la actividad del gen reportero (emisión de luz o de fluorescencia). Los 3'UTRs silvestres y mutados de los genes candidatos se clonaron en el vector psiCHECK-2, corriente abajo del gen de la luciferasa (*Renilla*), y se cotransfectaron en células *HeLa* junto con los miRNAs sintéticos de miR-58f y el miRNA control miR-67. Posteriormente, se lisaron las células y se cuantificó la actividad luciferasa en las distintas condiciones experimentales. Los resultados se muestran en la Figura R-2.

La presencia de los 3'UTRs de todos los genes analizados, salvo en el caso del 3'UTR de *daf-7*, redujeron la actividad de la luciferasa cuando se transfectaron con los miRNAs de miR-58f, en comparación con el miRNA control miR-67 (Figura R-2). Además, esta represión resultó ser dependiente de los sitios de unión a miR-58f pronosticados en los 3'UTR de estos genes, ya que, al mutarlos de forma dirigida, aumentó la actividad luciferasa en todos los casos. Los 3'UTR de *daf-4* y *daf-1* son susceptibles de ser regulados por todos los miembros de miR-58f, mientras que los 3'UTR de *sma-6* y *dbl-1* no reprimen tan eficazmente la expresión de luciferasa en presencia de miR-81 y miR-58/miR-80, respectivamente. En cuanto al 3'UTR de *daf-7*, sólo reprimió la actividad luciferasa en presencia de miR-58, mostrando una pequeña diferencia estadísticamente significativa respecto al control miR-67, lo que sugiere que, en conjunto, el 3'UTR de *daf-7* no es regulado tan eficazmente por miR-58f como lo son los otros genes de TGF β analizados.

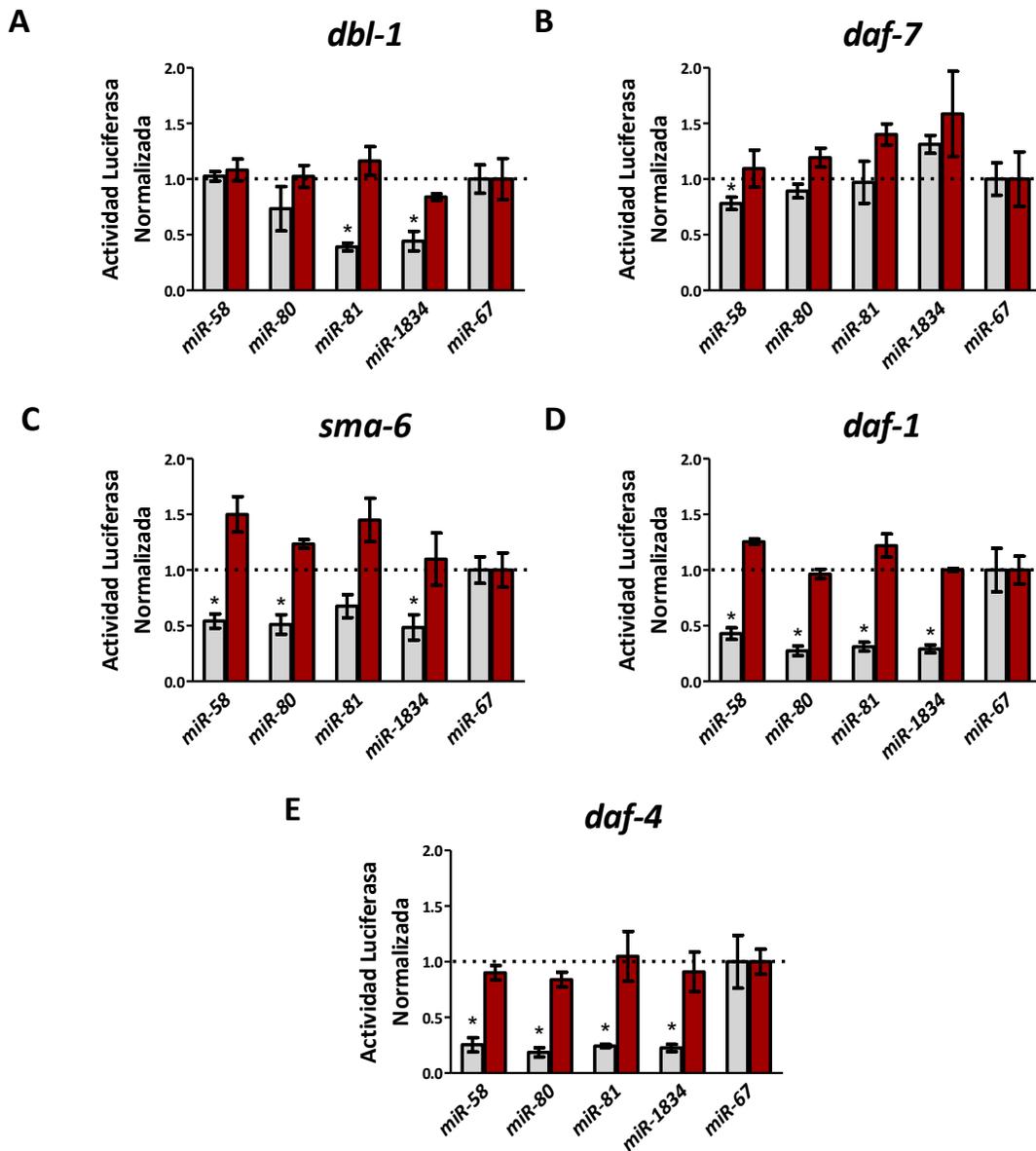


Figura R-2: Los 3'UTRs de los mRNAs de los receptores de TGF β y del ligando de TGF β Sma/Mab median la represión de luciferasa inducida por miR-58, miR-80, miR-81/82 y miR-1834 en células *HeLa*. En las gráficas se muestran los resultados representativos de, al menos, dos experimentos independientes de transfección de células *HeLa* con los distintos miRNAs sintéticos y el vector psiCHECK-2 con el 3'UTR de *dbl-1* (A), *daf-7* (B), *sma-6* (C), *daf-1* (D) y *daf-4* (E). Se representa la actividad luciferasa media con su desviación estándar para cada 3'UTR y miRNA concreto, normalizada con la actividad luciferasa registrada con el control miR-67. Los datos para cada 3'UTR silvestre se corresponden con las barras grises y los de los 3'UTR mutados con las barras marrones. La estrella indica una diferencia estadísticamente significativa con los valores de actividad luciferasa obtenidos con el miRNA control miR-67 con una probabilidad < 0,01. Experimentos realizados por E. Lozano.

Para averiguar si las interacciones observadas en los ensayos de luciferasa se producen *in vivo*, se generaron nematodos transgénicos que portaban, como reportero de la actividad 3'UTR-miRNA, el gen de la proteína fluorescente mCherry. Con este fin, se clonaron en el vector de expresión p374, que codifica para la proteína mCherry como reportero, tanto las regiones 5' flanqueantes como los 3'UTRs silvestres y mutados de *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1*.

Como se observa en la Figura R-3, en los nematodos de la cepa silvestre N2 (que expresan todos los miembros de *mir-58f*) se detecta menor emisión de fluorescencia del reportero mCherry, en comparación con *mir-58f(-)* en presencia del 3'UTR silvestre (WT) correspondiente (ver imágenes en la Figura A-1 del Anexo I). Por el contrario, al mutar tres nucleótidos del 3'UTR dentro de la región pronosticada de unión a los miRNAs, complementarios a las posiciones 2-4 de la región "seed" del miRNA, se detectan unos niveles de mCherry similares en nematodos silvestres y mutantes, salvo en el caso del 3'UTR mutado (MUT) de *sma-6* (paneles B y C de Figura R-3). Los resultados obtenidos con el 3'UTR mutado de *sma-6* se discutirán más adelante.

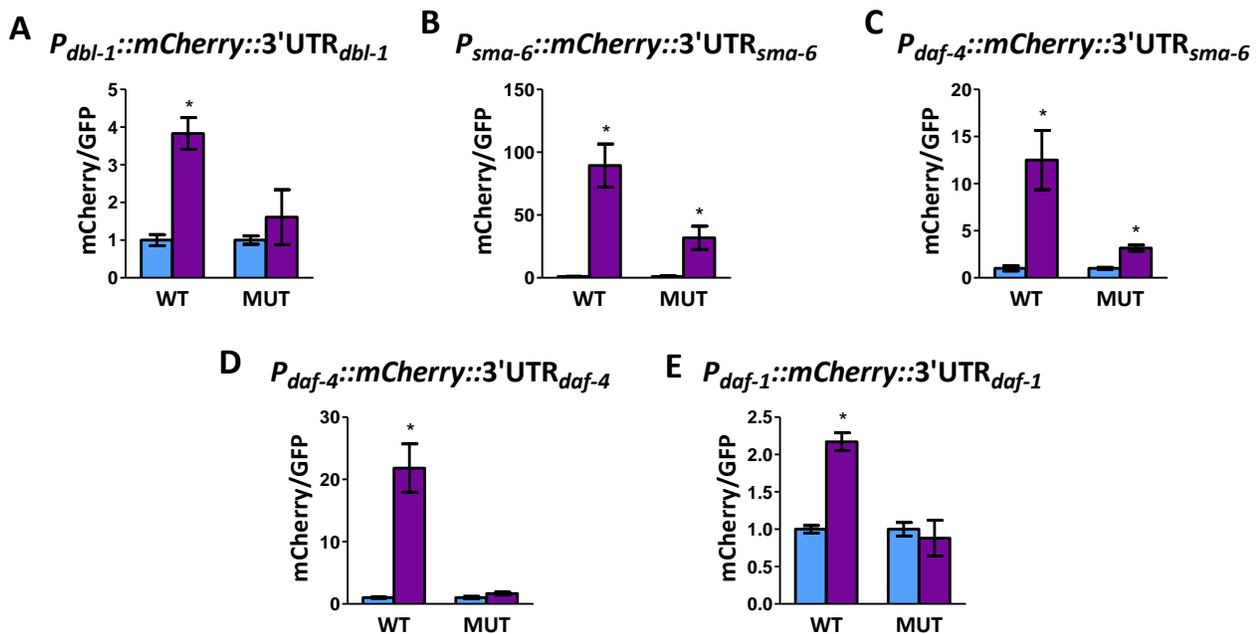


Figura R-3: *mir-58f* reduce la expresión del reportero mCherry a través de los 3'UTRs de los mRNAs de los receptores de TGF β y del ligando DBL-1 de TGF β Sma/Mab. Valores de inducción relativa de mCherry/GFP de transgénicos en el fondo genético de N2 (azul) y en el fondo genético de *mir-58f(-)* (morado) que expresan el reportero mCherry bajo el control de los 3'UTR silvestres (WT) y mutados (MUT) para *dbl-1* (A), *sma-6* (B y C), *daf-4* (D) y *daf-1* (E). Se muestra la media del valor de inducción relativa con la desviación estándar. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con los transgénicos de fondo genético silvestre con una probabilidad < 0,001.

En conclusión, estos ensayos *in vivo* con nematodos transgénicos, junto con los resultados de los ensayos *in vitro* de luciferasa, sugieren que *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1* son susceptibles de ser reprimidos por *mir-58f* *in vivo* a través de los 3'UTRs de sus mRNAs.

1.4. *mir-58f* y el control del tamaño corporal

Nuestros resultados, en concordancia con los de Álvarez-Saavedra y Horvitz⁵, muestran que los mutantes *mir-58f(-)* presentan un tamaño reducido, similar al de los mutantes del gen *dbl-1* (ver Figura R-4).

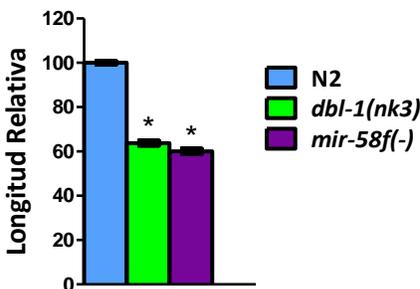


Figura R-4: Longitud relativa de mutantes *dbl-1(nk3)* y *mir-58f(-)* en relación a nematodos silvestres N2. Se muestra la media de, al menos, dos experimentos independientes para cada cepa con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa silvestre N2 con una probabilidad < 0,001. n > 40 individuos por cepa.

Recientemente, Vora y colaboradores han descrito que mutantes simples de *mir-80* son más pequeños y delgados que la cepa silvestre N2²¹¹. Sin embargo, a pesar de estos trabajos^{5,211}, todavía no se ha estudiado con detalle si la eliminación de algún otro miembro de la familia, o combinaciones de ellos, también es capaz de afectar al tamaño de *C. elegans*. Por esta razón, nos propusimos analizar la contribución de cada miembro de *mir-58f*, o combinaciones, al tamaño de los nematodos. Para ello, se calculó la longitud máxima alcanzada en los nematodos adultos, tanto de cepas mutantes que carecían de un único miRNA como de nematodos que no expresan varios de ellos.

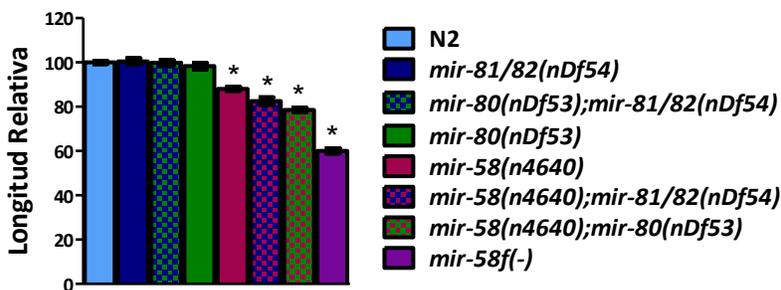


Figura R-5: *mir-58f* regula positivamente el tamaño de *C. elegans*. Longitud relativa de todas las combinaciones de mutaciones de los miRNAs de *mir-58f*. Se muestra la media de, al menos, dos experimentos de cada cepa con el intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa silvestre N2 con una probabilidad < 0,001. n > 48 individuos por cepa.

En la Figura R-5 y Tabla A-1 del Anexo I se muestra que *mir-58* es el único miRNA de la familia cuya ausencia, de forma individual, dio lugar a una reducción significativa del tamaño corporal en comparación con N2. La ausencia de *mir-80*, individual o combinada con la de *mir-81/82*, no produjo nematodos más pequeños que los silvestres N2. Sin embargo, la ausencia de *mir-58*, combinada con la de *mir-80*, originaba animales de menor tamaño que nematodos que carecían de *mir-58* y *mir-81/82*.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que miR-58 es el miRNA de la familia que mayor contribución tiene al tamaño corporal, seguido de miR-80 y de miR-81/82. Los resultados también indican que la función de miR-80 y miR-81/82 en el control del tamaño puede ser suplida por la de miR-58. Asimismo, en concordancia con otros autores⁵, la ausencia conjunta de miR-58, miR-80 y miR-81/82 compromete severamente el tamaño corporal de los nematodos (Figuras R-4 y R-5).

1.4.1. Los mutantes de *mir-58f* tienen una elevada actividad de TGFβ Sma/Mab

Los ensayos de qRT-PCR (Figura R-1) muestran que los mutantes de *mir-58f* tienen unos niveles anormalmente elevados de mensajeros de los receptores y del ligando de TGFβ Sma/Mab. Estas observaciones llevaron a preguntarnos si estos nematodos tenían, como cabría esperar, una mayor actividad de TGFβ Sma/Mab.

Para analizar la actividad de TGFβ Sma/Mab, se eligió el gen *sma-6* que, además de codificar para uno de los receptores de la ruta, es regulado transcripcionalmente de forma positiva cuando TGFβ Sma/Mab está activa^{145, 175}. En primer lugar, quisimos confirmar que *sma-6* responde de forma positiva a TGFβ Sma/Mab, como han descrito otros grupos^{145, 175}. Para confirmarlo, se generaron nematodos transgénicos que sobreexpresaban una construcción que codificaba para la proteína fluorescente mCherry bajo el control de la región 5' flanqueante de *sma-6* en diferentes fondos genéticos: silvestre (cepa N2), mutante que carece del ligando DBL-1 (cepa *dbl-1(nk3)*) y mutante que sobreexpresa el ligando DBL-1 (cepa *dbl-1(ctIs40)*). Para evitar la variabilidad debida al "array" extracromosómico, se microinyectaron únicamente nematodos N2 y varias líneas transgénicas independientes se cruzaron de forma individual con las diferentes cepas mutantes (*dbl-1(nk3)* y *dbl-1(ctIs40)*). Como se observa en la Figura R-6 y en la Figura A-2 del Anexo I, los transgénicos de la cepa que sobreexpresa el ligando (*dbl-1(ctIs40)*) emiten más fluorescencia que los de la cepa silvestre N2, mientras que en transgénicos sin ligando (*dbl-1(nk3)*) la fluorescencia es prácticamente nula, tal y como cabría esperar. A continuación, para averiguar si TGFβ Sma/Mab está activa en la cepa mutante *mir-58f(-)*, se cruzaron varias líneas transgénicas portadoras de la construcción reportera de *sma-6* con *mir-58f(-)* y se cuantificó la fluorescencia de mCherry. En estos animales se detectaron niveles de fluorescencia aproximadamente 20 veces superiores a los detectados en la cepa control N2. Esta inducción es incluso superior a la que se observa en nematodos que sobreexpresan el ligando de la ruta TGFβ Sma/Mab (*dbl-1(ctIs40)*) (Figura R-6 y Figura A-2 del Anexo I).

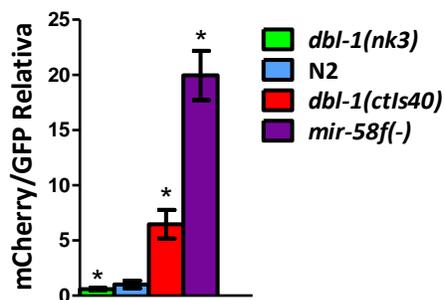


Figura R-6: La actividad de TGFβ Sma/Mab está inducida en los mutantes *mir-58f(-)*. Cuantificación de la fluorescencia de mCherry en estadio L4 de las diferentes cepas, normalizada a los valores de fluorescencia de GFP. Se muestra la media de, al menos, 2 experimentos independientes con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con los transgénicos silvestres de N2 con una probabilidad < 0,05. n > 25 individuos por cepa. Experimentos realizados en colaboración con A.G. Sáez.

Estos resultados indican que la ruta TGFβ Sma/Mab está inducida en ausencia de *mir-58f*.

1.4.2. ¿La señalización a través de TGFβ Sma/Mab explica el menor tamaño de los mutantes *mir-58f(-)*?

El hecho de que los mutantes *mir-58f(-)* sean pequeños (Figuras R-4 y R-5), a pesar de que tengan la ruta TGFβ Sma/Mab inducida (Figura R-6), sugiere que TGFβ Sma/Mab no es la ruta que determina el tamaño de los nematodos defectivos en esta familia de miRNAs. Para comprobarlo experimentalmente, se realizaron ensayos de epistasis. En *C. elegans*, para estudiar si dos genes están involucrados en la misma vía de señalización (epistasis entre genes), se utilizan nematodos mutantes nulos en ambos genes y se analiza el fenotipo resultante respecto a los fenotipos de los mutantes simples⁸⁴. Si el fenotipo del doble mutante es igual al de alguno de los mutantes simples, se infiere que ambos están en la misma ruta y que el gen, cuya mutación confiere el fenotipo al doble mutante, está corriente abajo en la vía de señalización. En cambio, si el doble mutante presenta un fenotipo intermedio o más acusado, implicaría que los genes pertenecen a rutas independientes o que la señalización de la misma no es lineal y podrían existir bifurcaciones o bucles regulatorios.

Según los resultados de la Figura R-5, *mir-58* es el miRNA de la familia que más contribuye al tamaño de *C. elegans* y también el único cuyos mutantes son pequeños. Por esta razón, se utilizó este miembro de la familia para estudiar la epistasis con los mutantes de TGFβ Sma/Mab.

En una primera aproximación, se cruzó la cepa que contenía la mutación de *mir-58* con las cepas que tienen *dbl-1* deletado (*dbl-1(nk3)*) o sobreexpresado (*dbl-1(ctls40)*). En la Figura R-7 y Tabla A-2 del Anexo I se observa que los nematodos defectivos en *dbl-1* o en *mir-58* son animales más pequeños que los controles N2. También se aprecia que los dobles mutantes *mir-58(n4640);dbl-1(nk3)* son incluso más pequeños que cualquiera de los mutantes simples. Estos resultados sugieren que TGFβ Sma/Mab y *mir-58* controlan de forma independiente el tamaño corporal de los animales. Además, se observa que la

combinación de *mir-58(n4640)* con animales que sobreexpresan el ligando de TGFβ Sma/Mab (*dbl-1(ctIs40)*) presenta un tamaño intermedio. Los fenotipos de los dobles mutantes son, por lo tanto, aditivos, lo que apoya la hipótesis de un control independiente del tamaño corporal por la ruta TGFβ Sma/Mab y *mir-58*.

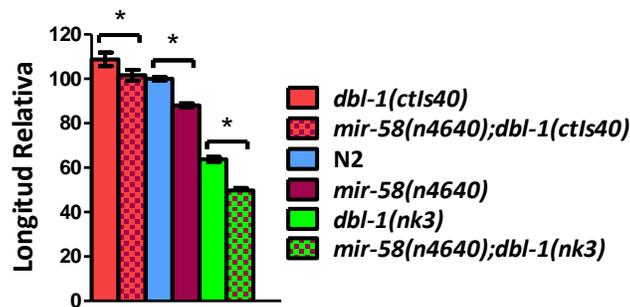


Figura R-7: *mir-58* regula el tamaño corporal de forma independiente de TGFβ Sma/Mab. Longitud relativa de mutantes de TGFβ Sma/Mab, *mir-58(n4640)* y dobles mutantes con respecto a N2. Se muestra la media de, al menos, dos experimentos de cada cepa con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas en cada cepa (N2, *dbl-1(nk3)*, *dbl-1(ctIs40)*) al eliminar *mir-58* con una probabilidad < 0,001. n > 39 individuos por cepa.

Adicionalmente, se utilizó un segundo abordaje experimental para comprobar si el tamaño corporal de los nematodos estaba controlado por TGFβ Sma/Mab y *mir-58* de forma paralela o a través de la misma vía de señalización. En este caso se utilizó la cepa *mir-58f(-)*, que carece de cuatro de los cinco miRNAs de la familia de *mir-58*, a diferencia de los ensayos de epistasis anteriores, donde sólo se trabajaba con mutantes en el miembro *mir-58*. Este abordaje consistió en experimentos de RNA de interferencia (RNAi). Se utilizaron fragmentos de las secuencias génicas de *sma-6*, *sma-10* y *daf-4* para inactivar TGFβ Sma/Mab en *mir-58f(-)*. Como se muestra en la Figura R-8, al inhibir algún miembro de esta ruta de TGFβ por RNAi en *mir-58f(-)*, la longitud de los nematodos se reduce hasta un 23%, en el caso del RNAi del receptor SMA-6 (Tabla A-3 del Anexo I). En cambio, la inhibición del receptor DAF-4 y la del correceptor SMA-10 no redujo el tamaño de los animales tan drásticamente (4% y 5% respectivamente) (Figura R-8, Tabla A-3 del Anexo I).

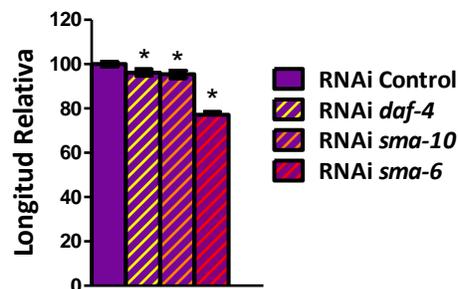


Figura R-8: La reducción de la actividad de TGFβ Sma/Mab por RNAi disminuye aún más el tamaño de *mir-58f(-)*. Longitud relativa de *mir-58f(-)* tratado con RNAi de los genes *daf-4*, *sma-10* y *sma-6* frente a la cepa tratada con el vector de RNAi vacío (RNAi Control). Se muestra la longitud relativa media de, al menos, dos experimentos independientes de cada tratamiento con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento control con una probabilidad < 0,001. n > 30 individuos por cepa.

En resumen, nuestros resultados ponen de manifiesto que TGF β Sma/Mab y *mir-58f* promueven el crecimiento corporal de forma independiente.

1.4.3. *mir-58f* inhibe el tamaño de los nematodos a través de TGF β Sma/Mab

Aunque el tamaño pequeño de *mir-58f(-)* no esté determinado por la actividad de TGF β Sma/Mab (Figuras R-7 y R-8), como la ruta actúa como promotora del crecimiento (Figura R-7) y *mir-58f(-)* tiene sobreactivada esta ruta (Figura R-6), quisimos cuantificar el efecto inhibitorio que ejerce *mir-58f* sobre el crecimiento mediado por la represión de los genes diana de la ruta de TGF β Sma/Mab. En concreto, estudiamos el efecto en tamaño que ejercía *mir-58f* a través de *sma-6*. Para cuantificarlo, se microinyectó una construcción que codificaba para *sma-6* con su 3'UTR en nematodos defectivos para este gen (*sma-6(wk7)*). Como se observa en la Figura R-9A, cuando *sma-6* incluye el 3'UTR silvestre (*sma-6++ 3'UTR WT*), los individuos recuperaron el tamaño de los nematodos silvestres N2. En cambio, cuando se microinyectó la construcción de *sma-6* con su 3'UTR mutado (*sma-6++ 3'UTR MUT*), los transgénicos no sólo recuperaron el tamaño de los mutantes *sma-6(wk7)*, sino que eran significativamente más largos que los silvestres (10% más largos). Además, cuando se sobreexpresó SMA-6 en *mir-58f(-)*, los nematodos crecían ese mismo 10% independientemente de que el 3'UTR estuviera mutado o no (Figura R-9B), lo que indica que *sma-6* no es susceptible de ser regulado a través de su 3'UTR en un fondo genético que carece de esta familia de miRNAs.

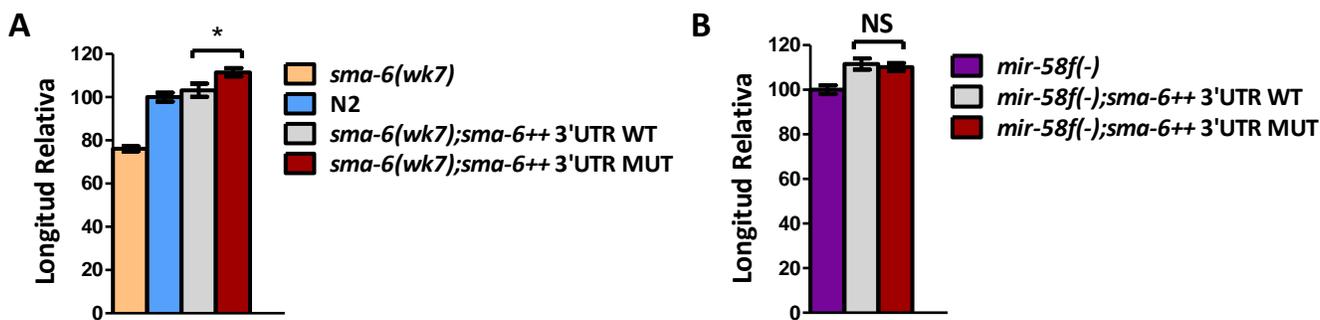


Figura R-9: *mir-58f* controla el tamaño de los nematodos a través del 3'UTR de *sma-6*. (A) Longitud media relativa a N2 de transgénicos de *sma-6* con su 3'UTR silvestre (WT) o mutado (MUT) en el fondo genético de *sma-6(wk7)*. (B) Longitud media relativa a *mir-58f(-)* de transgénicos de *sma-6* con su 3'UTR silvestre (WT) o mutado (MUT) en el fondo genético de *mir-58f(-)*. Se muestra la longitud relativa media de, al menos, dos experimentos independientes con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas entre transgénicos de *sma-6* con su 3'UTR silvestre (WT) y mutado (MUT) con una probabilidad < 0,001. Si no es significativa se indica con NS. n > 30 individuos por cepa.

Estos experimentos sugieren que *mir-58f*, además de ser un modulador positivo del crecimiento, es también un regulador negativo del mismo cuando actúa a través del control de la expresión de genes de TGF β Sma/Mab, al menos, a través de *sma-6*.

1.4.4. La regulación del tamaño por *mir-58* está dirigida por varios tejidos

En *C. elegans* la ruta predominante en el control del tamaño corporal es TGF β Sma/Mab, a través de la regulación de los niveles de endorreducción de los núcleos hipodérmicos¹³¹. Aparte de esta ruta de TGF β , el tamaño del nematodo está influido por otros mecanismos que median la ingesta, degradación y asimilación del alimento. Principalmente, los órganos que dirigen el tamaño corporal de los nematodos son el intestino y la hipodermis. El primero por ser el encargado de degradar y asimilar el alimento; y el segundo por ser un sincitio cuyo tamaño regula el crecimiento durante el periodo adulto⁶⁶.

Los dos miembros de *mir-58f* más abundantes son *mir-58* y *mir-80*^{91, 101, 103, 125, 220} y ambos tienen un amplio patrón de expresión tisular, aunque se expresan predominantemente en intestino e hipodermis^{91, 211}. Como los mutantes de *mir-58* son los únicos mutantes simples de esta familia de miRNAs que son más pequeños que los nematodos silvestres (Figura R-5), se quiso analizar en cuál de estos dos tejidos ejerce *mir-58* su papel como regulador positivo del tamaño corporal. Adicionalmente, se estudió la capacidad de *mir-80* para modular el crecimiento de los nematodos observado por otros autores en mutantes *mir-58f(-)*⁵.

Para determinar el control del crecimiento por parte de *mir-58*, se generaron animales transgénicos en el fondo genético *mir-58f(-)*, que sobreexpresaban el precursor de este miRNA (*pre-mir-58*) bajo el control de regiones 5' flanqueantes transcripcionalmente activas de forma específica en tejido hipodérmico (*P_{dpy-7}*) o intestinal (*P_{ges-1}*). *DPY-7* es un colágeno de la cutícula de los nematodos que se expresa exclusivamente en la hipodermis⁵⁷, mientras que la carboxilesterasa *GES-1* es específica de intestino¹⁴⁰. Además, se generaron transgénicos que sobreexpresaban *pre-mir-58* de forma ubicua, para lo que se utilizó la región 5' flanqueante de la subunidad grande ribosomal *RPL-28* (*P_{rpl-28}*). La región 5' flanqueante de *rpl-28* tiene un amplio espectro de expresión y se utiliza comúnmente como control de expresión¹⁸.

Se pudo observar que tanto la expresión de *mir-58* en hipodermis como en intestino aumentaba el tamaño corporal (Tabla R-2). Sin embargo, su contribución más importante parece ser a través del intestino, ya que los animales son más grandes cuando se sobreexpresa *mir-58* con la región 5' flanqueante de *ges-1*, que cuando se hace con la de *dpy-7* (67% de tamaño en relación a transgénicos N2 frente a 62%, respectivamente). Sorprendentemente, la expresión ubicua de *mir-58* utilizando la región 5' flanqueante de *rpl-28* no recuperó por completo el tamaño de *mir-58f(-)* (74%), y tampoco lo hizo la región 5' flanqueante de este miRNA (*P_{mir-58}*, 93%) o la de *mir-80* (*P_{mir-80}*, 77%) (Tabla R-2).

Cuando se sobreexpresó en los nematodos *mir-58* con sus regiones 5' y 3' flanqueantes (Tabla R-2, *mir-58++*), de forma análoga a como lo hicieron otros autores⁵, observamos que los animales recuperaban el tamaño normal ($p = 0,087$). En cambio, los que sobreexpresaban *mir-80* (*mir-80++*) eran más largos que los transgénicos de *mir-58f(-)*, pero no alcanzaron el tamaño de los transgénicos de la cepa silvestre N2, contradiciendo lo ya publicado⁵. Cabe resaltar que nuestros datos sugieren adicionalmente que la presencia

del 3'UTR de *mir-58* tiene un efecto positivo sobre el crecimiento, ya que, cuando se sitúa el miRNA sólo bajo la acción de su región 5' flanqueante ($P_{mir-58::pre-mir-58}$), los animales son mayores que cualquiera de los otros transgénicos analizados, pero no tan grandes como los que contienen el 3'UTR (*mir-58++*) (Tabla R-2). Además, mediante la introducción de la secuencia madura de *mir-58* y de su región 3' flanqueante en el programa RNAhybrid v2.2, pudimos detectar tres regiones a las que miR-58 podría unirse, regulando su propia expresión (Figura A-3 del Anexo I).

Genotipo	sobreexpresa	Longitud relativa a N2	valor p <i>mir-58f(-)</i>	valor p N2	n
N2	-	100 %	< 0,001	-	58
<i>mir-58f(-)</i>	<i>mir-58++</i>	99 %	< 0,001	0,087	80
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{mir-58::pre-mir-58}$	93 %	< 0,001	< 0,001	57
<i>mir-58f(-)</i>	<i>mir-80++</i>	77 %	< 0,001	< 0,001	19
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{mir-80::pre-mir-58}$	77 %	< 0,001	< 0,001	39
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{rpl-28::pre-mir-58}$	74 %	< 0,001	< 0,001	37
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{ges-1::pre-mir-58}$	67 %	< 0,001	< 0,001	38
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{dpy-7::pre-mir-58}$	62 %	< 0,001	< 0,001	32
<i>mir-58f(-)</i>	-	54 %	-	< 0,001	56

Tabla R-2: *mir-58* controla el tamaño a través de varios tejidos. Se muestran las construcciones sobreexpresadas en los diferentes transgénicos, la longitud relativa a transgénicos de la cepa silvestre N2, las probabilidades de que las diferentes construcciones introducidas en *mir-58f(-)* les confieran el tamaño de nematodos silvestres (valor p N2) o de *mir-58f(-)* (valor p *mir-58f(-)*) y el tamaño de la muestra (n).

En conjunto, estos resultados indican que *mir-58* dirige el tamaño corporal a través de varios tejidos, que la sobreexpresión de *mir-80* en *mir-58f(-)* no supe completamente la función de *mir-58* y que el 3'UTR de *mir-58* es importante para ejercer correctamente su función.

1.4.5. ¿Tienen los mutantes *mir-58f(-)* alterados otros genes determinantes del tamaño corporal?

Con la intención de encontrar los genes principales involucrados en el control del tamaño a través de *mir-58f*, se buscaron en la base de datos de fenotipos de *Wormbase* genes que contribuyen de forma negativa al crecimiento corporal en *C. elegans*. Como *mir-58f* promueve el crecimiento y, en general, los miRNAs son reguladores negativos de la expresión génica, los genes candidatos deben ser inhibidores del crecimiento corporal. En la base de datos de fenotipos de *Wormbase* la información proviene fundamentalmente de estudios a gran escala, en los que se reprimen genes mediante RNAi. Por esta razón, se seleccionaron aquellos genes que, al reducir sus niveles, inducen un aumento de tamaño en los nematodos (fenotipo *long*). Con ellos se creó una nueva base de datos en la que se identificaron los genes que podrían ser regulados por *mir-58f*, mediante la búsqueda en programas informáticos especializados, como los mencionados en la Tabla R-1. Entre estos candidatos encontramos dos ciclinas B (CYB-1 y CYB-2.2)¹⁸⁶ y MCM-4¹⁰⁹, que son reguladores del ciclo celular, por lo que la alteración de sus niveles podría contribuir al tamaño final de *mir-58f(-)*. Adicionalmente, *daf-25* codifica para una proteína con dominios

MYND que media la señalización de la ruta de cGMP, implicada en la respuesta frente a diversas condiciones ambientales^{53, 94}. Los alineamientos de las regiones de los 3'UTRs de estos genes con los miRNAs de *mir-58f* se muestran en el la Parte II del Anexo I.

Los niveles de expresión de estos genes se analizaron mediante qRT-PCR en poblaciones mixtas de mutantes *mir-58f(-)*, en relación a su expresión en nematodos silvestres N2. En la Figura R-10 se muestra que la ciclina B *cyb-1* no presenta un cambio en sus niveles de mensajero en *mir-58f(-)*, en comparación con N2. En cambio, tanto los transcritos de *cyb-2.2* como los de *mcm-4* aparecen disminuidos y los de *daf-25* aumentados en las poblaciones de *mir-58f(-)*.

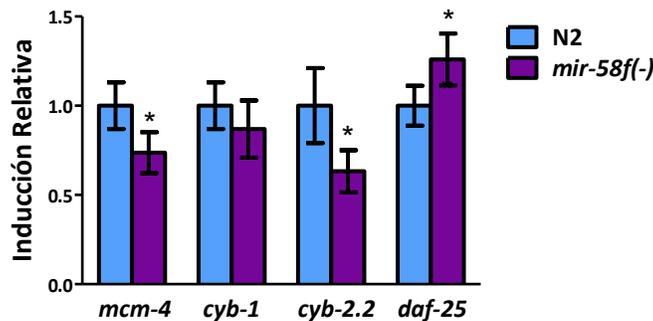


Figura R-10: Niveles de mRNA de *mcm-4*, *cyb-1*, *cyb-2.2* y *daf-25* en poblaciones mixtas de *mir-58f(-)* en comparación con N2. Se muestra el resultado de cuatro experimentos de qRT-PCR independientes con la desviación estándar. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa N2 con una probabilidad < 0,05.

Nuestros resultados indican, por lo tanto, que *daf-25* es el único gen de los analizados que podría contribuir a la reducción del tamaño corporal observado en *mir-58f(-)*.

1.4.6. ¿Tienen los mutantes *mir-58f(-)* alterada la proliferación de las células precursoras de la hipodermis?

Como en *C. elegans* el crecimiento corporal larvario está mediado principalmente por la división celular¹¹⁶, quisimos averiguar si el menor tamaño observado en *mir-58f(-)* (Figuras R-4 y R-5) estaba causado por algún defecto en la proliferación celular. Nos centramos en la hipodermis, principal órgano regulador del crecimiento adulto en el nematodo.

En una primera aproximación, analizamos si los mutantes *mir-58(n4640)* tenían el mismo número de células precursoras de los núcleos hipodérmicos (“seam cells”) que la cepa N2, ya que estos mutantes simples fueron los únicos que mostraron un tamaño significativamente menor que la cepa silvestre (Figura R-5). Para cuantificar estas células utilizamos la cepa JR667, que expresa la proteína fluorescente GFP bajo el control de un promotor específico de las “seam cells” (P_{SCM}). Para ello, cruzamos la cepa transgénica JR667 con *mir-58(n4640)* y contamos el número de células fluorescentes en JR667 y *mir-58(n4640);P_{SCM}::GFP*. Como el número de estas células en el fondo genético de *mir-58(n4640)* no varió respecto al silvestre de

JR667 (n = 16; tamaño muestral > 13, Figura A-4 del Anexo I), concluimos que los mutantes *mir-58(n4640)* no son más pequeños por tener un número menor de células precursoras de los núcleos del sincitio hipodérmico.

Sin embargo, este reportero no permite analizar si la proliferación de estas células precursoras era defectuosa, afectando al número total de núcleos hipodérmicos en adultos. Para estudiar este posible defecto, se utilizó el reportero $P_{dpy-7}::4xNLS::GFP$, que expresa la proteína fluorescente GFP específicamente en los núcleos hipodérmicos. Como los mutantes *mir-58f(-)* son mucho más pequeños que los mutantes simples *mir-58(n4640)* (Figura R-5), se contabilizaron los núcleos hipodérmicos en *mir-58f(-)*. Tras la microinyección de $P_{dpy-7}::4xNLS::GFP$ en N2 y *mir-58f(-)*, se contaron los núcleos de hyp 7 (por un único lado del animal) que expresaban GFP. Nuestros resultados mostraron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas ($p = 0,528$) (N2: $n = 58,1 \pm 0,8$; *mir-58f(-)*: $n = 57,8 \pm 2,0$; tamaño muestral = 18, Figura A-5 del Anexo I).

En conjunto, estos resultados indican que *mir-58f* no afecta al crecimiento de *C. elegans* a través del control del número o de la proliferación de las células precursoras hipodérmicas.

1.5. *mir-58f* y el control de entrada en dauer

La incapacidad de *mir-58f(-)* de entrar en el estadio de resistencia dauer es otro de los fenotipos característicos de esta cepa⁵. La formación de larvas dauer depende genéticamente de la actividad de varias vías de señalización, entre ellas TGF β Dauer e Insulina⁸³, por lo que se estudió el estado de activación de estas rutas en *mir-58f(-)*.

1.5.1. Los mutantes *mir-58f(-)* tienen inducida la ruta TGF β Dauer

Como se observó en el apartado 1.2, los niveles de mRNAs de los receptores de TGF β Dauer DAF-1 y DAF-4 y del ligando DAF-7 son superiores en *mir-58f(-)* a los que presenta la cepa control N2 (Figura R-1). Otros grupos han descrito que la sobreexpresión de TGF β Dauer impide la entrada en dauer de los nematodos^{158, 163}. En este sentido, Park y colaboradores observaron que la sobreexpresión de la proteína Smad DAF-8, que es uno de los factores de transcripción de TGF β Dauer, impedía a los animales entrar en dauer, incluso en condiciones ambientales adversas como es la inanición¹⁵⁸. Asimismo, los mutantes que carecen de *daf-3*, Smad antagonista de la ruta, tampoco son capaces de entrar en dauer¹⁶³. Al no poder formar larvas dauer los animales defectivos para *mir-58f*, nos preguntamos si los mutantes *mir-58f(-)* tienen la ruta TGF β Dauer constitutivamente activa, de tal modo que impida la entrada en este estadio de resistencia. Tanto *daf-8* como el ligando *daf-7* han sido descritos como genes regulados positivamente por la propia vía de señalización TGF β Dauer¹⁵⁸, por lo que se utilizaron como reporteros de la actividad de la ruta. Mediante qRT-PCR se cuantificaron los niveles de mRNA de *daf-7* y *daf-8* en *mir-58f(-)* comparándolos a los

niveles control de N2. Como control positivo de activación de la ruta, se midieron los niveles de estos mRNAs en la cepa *daf-3(ok3610)*, defectiva para esta proteína Smad antagonista, y en las cepas *daf-8(++)* y *daf-4(pwls922)*, que sobreexpresan *daf-8* y *daf-4*, respectivamente^{58, 158, 163, 199}.

En la Figura R-11A se observa que *mir-58f(-)* presenta unos niveles de mRNAs de *daf-8* y *daf-7* superiores a los niveles observados en N2 y similares a las cepas que tienen constitutivamente activa la ruta TGFβ Dauer (*daf-3(ok3610)* y *daf-4(pwls922)*). La cepa *daf-8(++)* muestra unos niveles de mRNA de *daf-8* aproximadamente 10000 veces superiores a lo normal (N2). Incluso en estas condiciones, los niveles de expresión del mRNA de *daf-7* son comparables entre *daf-8(++)* y *mir-58f(-)*. Estos resultados sugieren que los mutantes *mir-58f(-)* tienen inducida la ruta TGFβ Dauer.

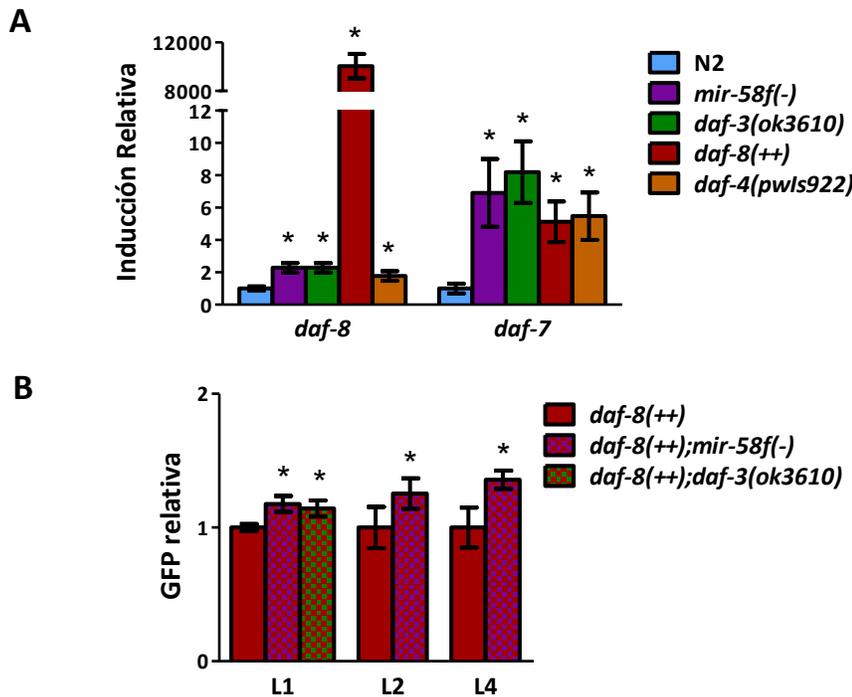


Figura R-11: Cuantificación de la actividad de TGFβ Dauer en mutantes *mir-58f(-)*. (A) Resultados de qRT-PCR de poblaciones en estadio mixto. En la gráfica se muestra el resultado de cuatro experimentos independientes con la desviación estándar. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa silvestre N2 con una probabilidad < 0,05. (B) Cuantificación de la fluorescencia media de GFP emitida por las diferentes cepas relativa a *daf-8(++)*. Se muestra la media con el intervalo de confianza del 95% de, al menos, dos experimentos independientes. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa *daf-8(++)* con una probabilidad < 0,05. n > 17 individuos por cepa.

Adicionalmente, se determinaron los niveles de la proteína DAF-8 en *mir-58f(-)*. Para cuantificarlos, se utilizó como reportero translacional la cepa que sobreexpresa DAF-8 fusionada a GFP (*daf-8(++)*), descrita anteriormente¹⁵⁸. Esta cepa se cruzó con los mutantes *mir-58f(-)* y con la cepa *daf-3(ok3610)* como control. Como se observa en la Figura R-11B, en los tres estadios larvarios analizados, *mir-58f(-)* tiene una mayor cantidad de GFP (y por tanto de DAF-8) en relación al fondo genético de la cepa *daf-8(++)*. Aunque la inducción relativa de GFP en el fondo genético *mir-58f(-)* sea moderada, es estadísticamente significativa en

relación a un fondo genético *daf-8⁺⁺* y similar a la obtenida en *daf-3(ok3610)*, al menos, en el estadio L1. Además, hay que tener en cuenta que *daf-8⁺⁺* presenta unos niveles de mRNA de *daf-8* aproximadamente 10000 veces superiores a lo normal (Figura R-11A), por lo que las inducciones observadas en *mir-58f(-)*, aunque modestas ($1,2 \pm 0,1$ en L1; $1,3 \pm 0,1$ en L2; $1,4 \pm 0,1$ en L4), se producen sobre una cantidad de proteína de DAF-8 supuestamente miles de veces por encima de los niveles normales en N2.

Estos resultados sugieren que, al eliminar *mir-58f*, se induce la actividad de TGF β Dauer, de manera similar a cuando se elimina *daf-3* o se sobreexpresa *daf-4* o *daf-8*.

1.5.2. La ausencia del receptor DAF-1 rescata el fenotipo de entrada en dauer en los mutantes *mir-58f(-)*

Como nuestros resultados indican que la ruta TGF β Dauer está inducida en *mir-58f(-)* (Figura R-11), nos preguntamos si anulando la ruta se podía restaurar la entrada en dauer en estos animales. Con esta finalidad, se eliminó el gen *daf-1* en el fondo genético *mir-58f(-)* por cruzamiento entre las cepas *mir-58f(-)* y *daf-1(m213)*. Una vez generados los quintuples mutantes, se realizaron experimentos de inducción de entrada en dauer a diferentes temperaturas y se cuantificaron los animales que entraban en dicho estadio.

En la Tabla R-3 se puede observar que los quintuples mutantes *mir-58f(-);daf-1(m213)* son capaces de entrar en dauer e incluso lo hacen en un porcentaje mayor (93%) que mutantes simples *daf-1(m213)* (71%).

Genotipo	20 °C		25,5 °C	
	% dauer	n	% dauer	n
N2	0	1382	0	807
<i>mir-58f(-)</i>	0	1295	0	515
<i>daf-1(m213)</i>	71	857	100	922
<i>mir-58f(-); daf-1(m213)</i>	93	782	100	928

Tabla R-3: La eliminación de *daf-1* permite la entrada en dauer a *mir-58f(-)*. Porcentaje de individuos que entran en dauer (% dauer) y el número total de individuos analizados (n) a 20 °C y 25,5 °C. Los resultados son la suma de, al menos, dos experimentos independientes.

A la vista de los resultados anteriores, nos preguntamos si la sobreexpresión del receptor DAF-1 sería suficiente para impedir la entrada en dauer de los nematodos. Para analizarlo, se microinyectó en un fondo genético *daf-1(m213)* una construcción que codifica para un fragmento genómico de *daf-1* (región 5' flanqueante y zona codificante) que excluye su 3'UTR (sometido a regulación por *mir-58f*). Posteriormente, se sometieron los animales transgénicos a condiciones de estrés en las que se induce la entrada en dauer, como es el caso de agotamiento de la fuente de alimentación. De hecho, la falta de comida reprime la expresión del ligando de TGF β Dauer DAF-7, promoviendo la entrada en dauer de los nematodos¹⁷⁴. En dos líneas transgénicas independientes que sobreexpresaban DAF-1, comprobamos que los animales no eran capaces de entrar en dauer a 20 °C, a diferencia de la cepa original *daf-1(m213)*, en la que aproximadamente un 70 % de los animales entran en dauer a esta temperatura (Tabla R-3 y Figura A-6 del Anexo I). Estos

transgénicos fueron sometidos a condiciones de inanición a 20 °C y se cuantificaron las larvas en estadio dauer mediante su resistencia a sobrevivir en una solución de SDS 1%. Como se observa en la Figura R-12, cuando se sobreexpresa DAF-1 se reduce a la mitad el número de animales que son capaces de entrar en dauer, en comparación con la cantidad de individuos que lo hacen en un fondo genético silvestre N2. Es decir, la sobreexpresión del receptor impide aproximadamente en un 50% la entrada en dauer respecto a los transgénicos silvestres.

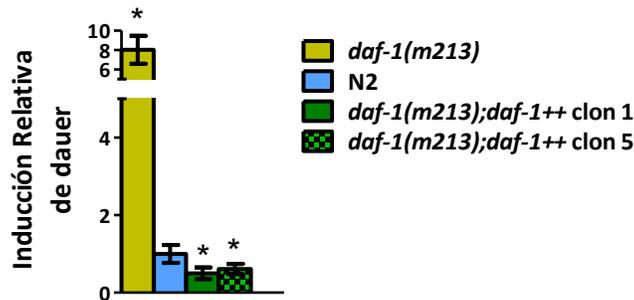


Figura R-12: La sobreexpresión de DAF-1 reprime la entrada en dauer en condiciones de inanición. Número de dauers relativo a transgénicos silvestres de N2 en placas sometidas a inanición a 20 °C con la desviación estándar de, al menos, dos placas independientes. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con transgénicos silvestres de N2 con una probabilidad < 0,05.

Como conclusión, los niveles de DAF-1 son determinantes en la toma de decisión de entrar en dauer y la eliminación de este receptor de TGFβ Dauer permite la entrada en dauer de *mir-58f(-)*. Estos resultados sugieren que la sobreactivación de la ruta TGFβ Dauer en *mir-58f(-)* es suficiente para impedir su entrada en dauer.

1.5.3. ¿Está reducida la actividad de la ruta de Insulina en *mir-58f(-)*?

Aunque la anulación de la señalización de TGFβ Dauer en *mir-58f(-)* propicie la formación de larvas dauer, quisimos averiguar si la ruta de Insulina jugaba algún papel en el fenotipo mostrado por los animales *mir-58f(-)*. La ruta de Insulina es una de las vías de señalización que se reprimen en los nematodos para favorecer la entrada en dauer ante condiciones ambientales adversas²¹² y actúa en paralelo, pero intercomunicada, con TGFβ Dauer^{83, 129, 151, 159, 183}.

En una primera aproximación, se analizó el estado de activación de la ruta de Insulina en *mir-58f(-)*, mediante la cuantificación por qRT-PCR de los niveles de mRNA del gen *sod-3*. SOD-3 es una superóxido dismutasa que está negativamente regulada por la ruta de Insulina a través del factor de transcripción FOXO DAF-16^{55, 78}. Como se observa en la Figura R-13A, tanto el factor de transcripción *daf-16* como su gen diana *sod-3* están significativamente inducidos en *mir-58f(-)* (alrededor de 3 veces) con respecto a la cepa control N2, indicando que la ruta de Insulina está reprimida en estos nematodos, al menos, en el estadio larvario L1.

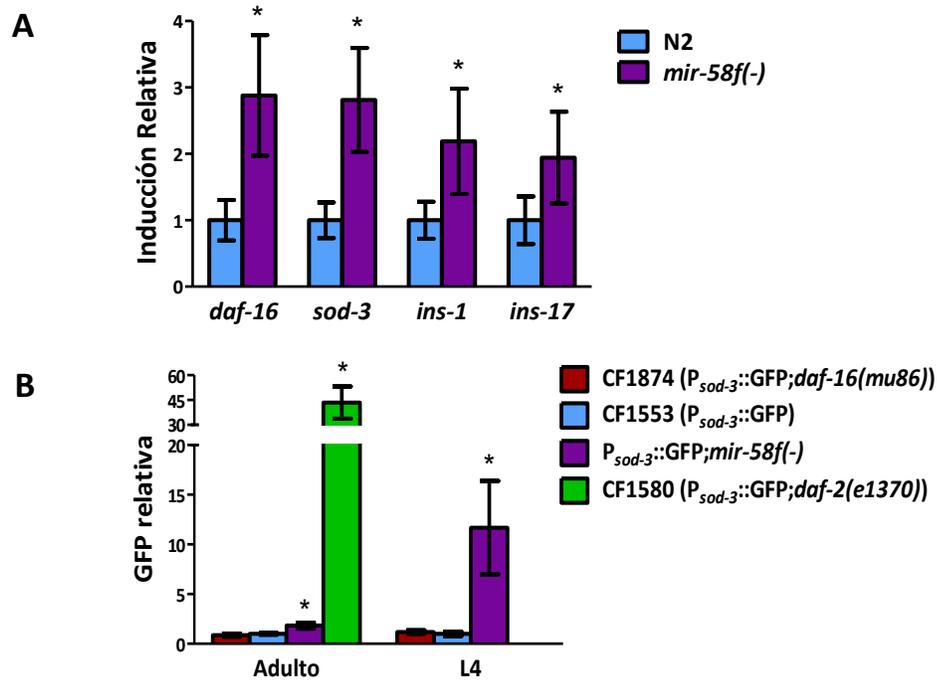


Figura R-13: Análisis de la ruta de Insulina en *mir-58f(-)*. (A) Resultados de qRT-PCR de *daf-16*, *sod-3*, *ins-1* e *ins-17* en poblaciones sincronizadas en estadio L1 de *mir-58f(-)* y N2. En la gráfica se muestra el resultado de cuatro experimentos independientes. (B) Cuantificación relativa de la fluorescencia de GFP emitida por las diferentes cepas frente CF1553. Se muestra el resultado de, al menos, dos experimentos independientes con $n > 23$.

Las barras de error representan la desviación estándar y la estrella indica diferencias estadísticamente significativas con N2/CF1553 con una probabilidad $< 0,05$.

Adicionalmente, se analizó la actividad del promotor de *sod-3* mediante la cuantificación de la emisión de fluorescencia de la construcción $P_{sod-3}::GFP$, que la cepa CF1553 tiene integrada en su genoma¹²⁴. Mediante cruces con CF1553 se puso este reportero de *sod-3* en el fondo genético de *mir-58f(-)*. La emisión de fluorescencia de $P_{sod-3}::GFP$ en los diferentes fondos genéticos se cuantificó en el periodo adulto, como han descrito otros autores para analizar la actividad de la ruta de Insulina con esta construcción¹²⁴. Como control positivo y negativo de la actividad de la ruta de Insulina, se usaron las cepas CF1874 ($P_{sod-3}::GFP;daf-16(mu86)$) y CF1580 ($P_{sod-3}::GFP;daf-2(e1370)$), respectivamente. En la Figura R-13B se observa que animales adultos de la cepa $P_{sod-3}::GFP;mir-58f(-)$ tienen la actividad del promotor de *sod-3* levemente inducida ($1,8 \pm 0,3$) respecto a la cepa control CF1553. Aunque esta diferencia es estadísticamente significativa, es muy inferior a la observada en la cepa CF1580 ($43,4 \pm 9,7$), que tiene la ruta de Insulina reprimida. La cepa CF1874, utilizada como control positivo de la actividad de esta vía de señalización, no mostró una reducción significativa de los niveles de fluorescencia ($0,9 \pm 0,2$). Como la expresión de los miRNAs de *mir-58f* disminuye en adultos con la edad¹³², pero es constante durante el desarrollo larvario^{101, 103, 125}, cuantificamos la fluorescencia del reportero $P_{sod-3}::GFP$ en el último estadio larvario L4. Mediante esta aproximación esperábamos obtener una diferencia mayor de fluorescencia de $P_{sod-3}::GFP;mir-58f(-)$, respecto a CF1553, que en adultos. En la Figura R-13B se muestra que, en el estadio

larvario L4, la fluorescencia emitida por $P_{sod-3}::GFP;mir-58f(-)$ aumentó considerable y significativamente ($11,7 \pm 4,7$) en relación a la de CF1553 (ver Figura A-7 del Anexo I). Sin embargo, en este estadio larvario tampoco pudimos observar que la cepa CF1874 mostrara una reducción significativa de los niveles de fluorescencia ($1,2 \pm 0,2$) (Figura R-13B).

Asimismo, se analizaron los niveles de mRNA de dos péptidos antagonistas de la ruta de Insulina, *ins-1* e *ins-17*, que, junto con *daf-16*, aparecieron en varias bases de datos como posibles genes diana de *mir-58f* (ver alineamientos en la Parte II del Anexo I). En la Figura R-13A se observa que en el estadio L1 los niveles de mRNA de las insulinas antagonistas *ins-1* e *ins-17*, al igual que los de *daf-16*, eran superiores en *mir-58f(-)* respecto a los de la cepa control N2.

Teniendo en cuenta estos resultados (Figura R-13), la ruta de Insulina parece estar constitutivamente inhibida en los mutantes de esta familia de miRNAs. Sin embargo, esta represión no es suficiente para que estos mutantes, incluso en condiciones de inanición, sean capaces de entrar en el estadio de resistencia dauer⁵ (Tablas R-3 – R-5).

Para descartar el papel de la ruta de insulina en el fenotipo defectivo en dauer mostrado por *mir-58f(-)*, se eliminó el receptor DAF-2 en el fondo genético *mir-58f(-)*, mediante cruces con la cepa *daf-2(e1370)*. Una vez obtenidos, los quintuples mutantes *mir-58f(-);daf-2(e1370)* y las cepas control (N2, *mir-58f(-)* y *daf-2(e1370)*) fueron sometidos a ensayos de entrada en dauer a 20 °C y a 25 °C y se cuantificó el porcentaje de larvas dauer o arrestadas en el desarrollo con respecto al de animales adultos (Tabla R-4).

Genotipo	20 °C		25 °C	
	% dauer ^a / % arresto ^b	n	% dauer ^a / % arresto ^b	n
N2	0	1511	0	1107
<i>mir-58f(-)</i>	0	851	0	511
<i>daf-2(e1370)</i>	0,14 ^a	1442	100 ^a	1001
<i>mir-58f(-); daf-2(e1370)</i>	2,14 ^b	748	100 ^b	202

Tabla R-4: La eliminación de *daf-2* induce un porcentaje de arresto larvario mayor en los mutantes *mir-58f(-)*. Porcentaje de individuos que entran en dauer o quedan arrestados en L2 (% dauer^a/% arresto^b) y el número total de individuos analizados (n). Los resultados son la suma de tres experimentos independientes.

Tanto a 20 °C como a 25 °C se observaron larvas arrestadas aparentemente en dauer en *mir-58f(-);daf-2(e1370)*. Sin embargo, al observar estos animales en el microscopio confocal (Figura R-14E), se apreció que no presentaban las características descritas de verdaderas larvas dauer, ya que: 1) la boca no tenía el tapón bucal y, por lo tanto, eran capaces de bombear comida; 2) la faringe no estaba remodelada por no presentar la constricción radial característica de dauer (comparar las larvas arrestadas de *mir-58f(-);daf-2(e1370)* con larvas en estadio L2 de nematodos silvestres (Figura R-14E-F)); 3) no tienen en su cutícula *alae* (datos no mostrados), que son protuberancias cuticulares específicas de algunos estadios

RESULTADOS

larvarios como dauer (Figura R-14G y R-14I) y permite distinguir estas larvas de otros estadios como L2²¹⁹. En cambio, las larvas arrestadas encontradas en *mir-58f(-);daf-1(m213)* (Figura R-14B) sí poseían características de larvas dauer como el tapón bucal y la faringe alargada, presentes en dauers de N2 (Figura R-14C), *daf-1(m213)* (Figura R-14A) y *daf-2(e1370)* (Figura R-14D). Además, las larvas dauer de *mir-58f(-);daf-1(m213)* también presentan en su cutícula *alae* (Figura R-14H) y son resistentes a SDS 1%, lo que confirma que no bombean comida y tienen la cutícula endurecida de larvas dauer⁸³.

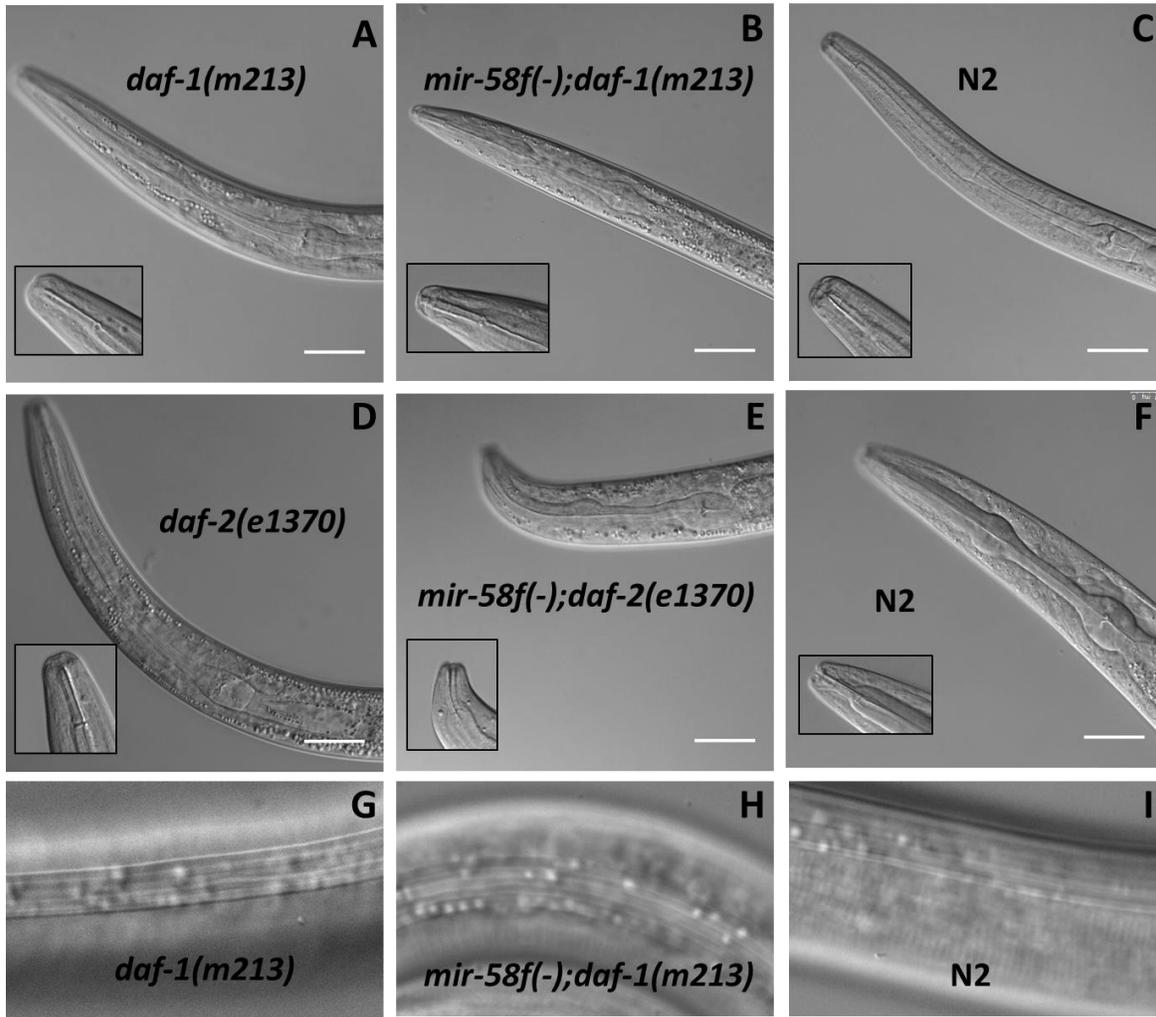


Figura R-14: Detalle de la faringe, boca y cutícula de larvas crecidas a 20 °C. (A-E) Faringes de larvas dauer de *daf-1(m213)* (A), *mir-58f(-);daf-1(m213)* (B), N2 (C) y *daf-2(e1370)* (D), de larva arrestada de *mir-58f(-);daf-2(e1370)* (E) y de larva L2 de nematodos silvestres N2 (F). (G-I) *Alae* de dauer en larvas de *daf-1(m213)* (G), *mir-58f(-);daf-1(m213)* (H) y N2 (I). En las fotografías A-F se enseña recuadrada la boca de las larvas. La barra de tamaño corresponde a 25 μ M.

En conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la sobreactivación de TGF β Dauer en *mir-58f(-)* impide a los animales entrar en dauer, ya que se revierte el fenotipo cuando silenciamos TGF β Dauer mediante la eliminación del receptor *daf-1*.

1.5.4. La sobreexpresión de *mir-58* en hipodermis restaura el fenotipo de entrada en dauer

Álvarez-Saavedra y Horvitz observaron que el defecto de entrada en dauer de *mir-58f(-)* podía ser restaurado por la expresión individual de todos los miembros de la familia salvo *mir-81*⁵, en concordancia con Than y colaboradores, que sugieren que *mir-81* reprime la entrada en dauer¹⁹⁸. Por lo tanto, no todos los miembros de *mir-58f* tienen el mismo papel regulador de la entrada en dauer. Como nosotros hemos observado que *mir-58* (y no *mir-80*) es el miRNA que restaura el fenotipo de tamaño por completo (Tabla R-2), quisimos corroborar, en primer lugar, si la mera sobreexpresión de *mir-58* (*mir-58++*) era suficiente para permitir la entrada en dauer a nematodos *mir-58f(-)*, tal y como estaba descrito⁵. También nos preguntamos si *mir-58* sin su 3'UTR ($P_{mir-58}::pre-mir-58$) era capaz de recuperar el fenotipo silvestre de entrada en dauer, ya que, como se observa en la Tabla R-2, la falta de esta región reguladora de *mir-58* no permitía recuperar por completo el tamaño de los animales al sobreexpresarse en *mir-58f(-)*. Cuando los transgénicos que sobreexpresaban las construcciones *mir-58++* y $P_{mir-58}::pre-mir-58$ fueron sometidos a estrés por inanición a 20 °C, observamos que ambas construcciones permitían la entrada en dauer a *mir-58f(-)*, pero no observamos que entraran en dauer por aumento de temperatura a 25,5 °C (Tabla R-5).

A continuación, nos preguntamos en qué tejido, intestino o hipodermis, media *mir-58* su función. Para averiguarlo, se utilizaron los transgénicos que sobreexpresaban *mir-58* sin su 3'UTR en intestino ($P_{ges-1}::pre-mir-58$) y en hipodermis ($P_{dpy-7}::pre-mir-58$) y observamos si alguno de estos animales recuperaba la capacidad de entrar en dauer en las condiciones de estrés anteriormente descritas. Como se muestra en la Tabla R-5, la sobreexpresión de *mir-58* en la hipodermis de *mir-58f(-)*, pero no en el intestino, recupera la entrada en dauer de estos mutantes ante la falta de comida, pero no por aumento de temperatura a 25,5 °C.

Genotipo	sobreexpresión	dauer por inanición	25,5 °C	
			% dauer	n
N2	-	Sí	0	248
<i>mir-58f(-)</i>	-	No	0	100
<i>mir-58f(-)</i>	<i>mir-58++</i>	Sí	0	178
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{mir-58}::pre-mir-58$	Sí	0	205
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{ges-1}::pre-mir-58$	No	0	158
<i>mir-58f(-)</i>	$P_{dpy-7}::pre-mir-58$	Sí	0	205

Tabla R-5: Recuperación del fenotipo de entrada en dauer por la expresión de *mir-58* dependiente de tejido en *mir-58f(-)*. *mir-58f(-)* no entra en dauer en condiciones de estrés por inanición o subida de temperatura. Sí: se encontraron dauers en 2 placas analizadas; No: no se encontraron dauers en ninguna de las 2 placas analizadas. Se muestran los resultados obtenidos de una línea transgénica para cada construcción. Se indican las construcciones sobreexpresadas en los diferentes transgénicos, capacidad de entrar en dauer a 20 °C en condiciones de inanición y porcentaje de entrada en dauer a 25,5 °C. n indica el número total de individuos analizados en dos ensayos de entrada en dauer realizados a 25,5 °C.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *mir-58* en *mir-58f(-)* no es capaz de inducir la entrada en dauer en nematodos crecidos a 25,5 °C, pero sí ante la falta de alimento. Además, esta respuesta es dependiente de la expresión de *mir-58* en hipodermis y no en intestino.

1.6. TGFβ Sma/Mab regula la expresión de *mir-58* y *mir-80*

Debido a la conservación de las rutas de TGFβ y esta familia de miRNAs, se planteó si la regulación transcripcional de los miRNAs por TGFβ observada en *D. melanogaster*¹⁵³ y en humanos^{15, 32, 130}, estaba conservada en *C. elegans*.

Para estudiar si las rutas de TGFβ Sma/Mab y Dauer controlan la expresión de los miRNAs de la familia de *mir-58*, se cuantificaron, en relación a la cepa silvestre N2, los niveles de los miRNAs maduros por qRT-PCR en cepas que tenían estas rutas alteradas (Figura R-15). Para TGFβ Sma/Mab se utilizó la cepa que sobreexpresa el ligando DBL-1 (*dbl-1(ctIs40)*) como control positivo y la cepa que tiene una delección para éste (*dbl-1(nk3)*) como control negativo. Además, se escogió el último estadio larvario L4, porque los niveles de los miRNAs de *mir-58f* son estables durante el desarrollo larvario^{91, 101, 103, 125, 220} y el estadio L4 es clave para TGFβ Sma/Mab^{133, 175}. En el caso de TGFβ Dauer, se cuantificó la expresión relativa de los miembros de *mir-58f* en cepas que tienen esta ruta constitutivamente activa (*daf-8(++)* y *daf-3(ok3610)*, ver Figura R-11A), a modo de controles positivos, y en otras que la tienen reprimida (*daf-1(m213)* y *daf-4(m63)*), como controles negativos. Para estudiar el control de expresión por TGFβ Dauer, se escogió el estadio L1, por ser en el que se toma la decisión de entrada en dauer⁸³.

En cuanto a la regulación de esta familia de miRNAs por TGFβ Sma/Mab, se observó que, en mutantes que carecen del ligando DBL-1 (*dbl-1(nk3)*), los niveles de los RNAs maduros de *mir-58* y *mir-80* eran significativamente inferiores a los de nematodos silvestres (Figura R-15A). Sin embargo, para TGFβ Dauer, no se pudieron apreciar diferencias en los niveles de los miRNAs maduros de *mir-58* y *mir-80* entre N2 y los diversos mutantes analizados (Figura R-15B).

Por lo tanto, estos resultados indican que TGFβ Sma/Mab, en el estadio L4, promueve la expresión de los miRNAs *mir-58* y *mir-80*. Sin embargo, la expresión de estos miRNAs no se ve afectada por la actividad de TGFβ Dauer, al menos, en el estadio L1.

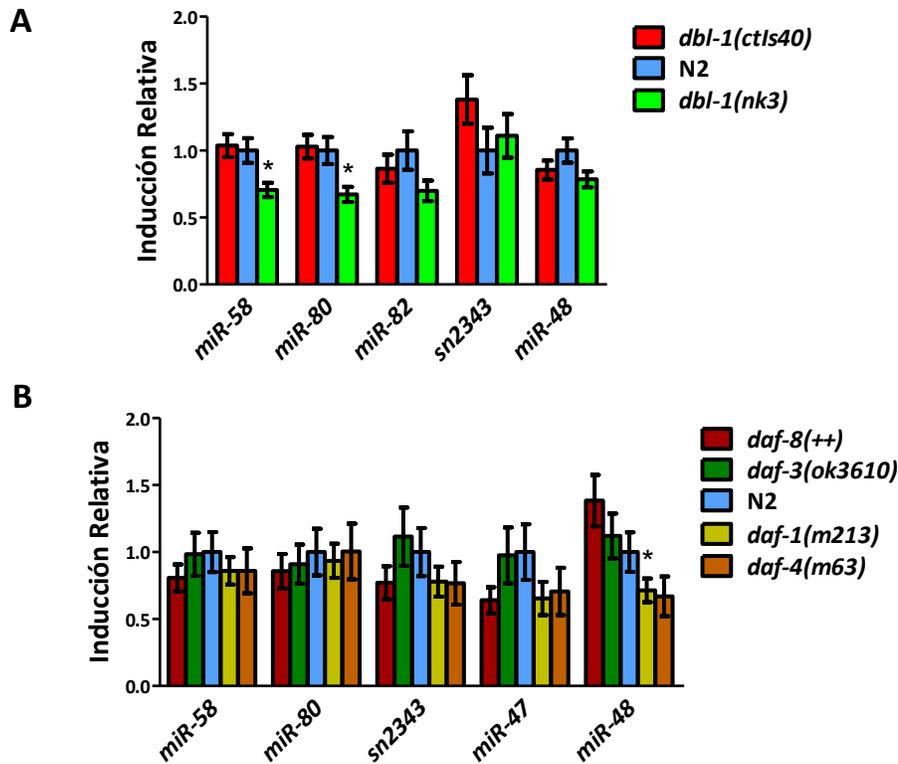


Figura R-15: TGFβ Sma/Mab controla positivamente los niveles de *mir-58* y *mir-80* en L4. (A) Cuantificación de los miRNAs por qRT-PCR en poblaciones sincronizadas en el estadio L4 de N2, *dbl-1(nk3)* y *dbl-1(ctIs40)*. Los resultados de dos experimentos independientes fueron normalizados con los valores de *mir-47* y *mir-81*, al ser los miRNAs que menos varían entre las muestras. **(B)** Cuantificación de los miRNAs por qRT-PCR en poblaciones sincronizadas en el estadio L1 de N2 y mutantes de TGFβ Dauer. Los resultados de dos experimentos independientes fueron normalizados con los valores de *mir-81* y *mir-82*, al ser los miRNAs que menos varían entre las muestras. En las gráficas se muestra la inducción media relativa a la cepa silvestre N2 con la desviación estándar para cada miRNA y cepa. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa silvestre N2 con una probabilidad < 0,05.

Para confirmar que *mir-58* está regulado por las rutas de TGFβ y que esta regulación se produce a nivel transcripcional, se utilizó la cepa transgénica EUB0032⁹¹, que expresa GFP bajo la región 5' flanqueante de *mir-58*. La combinación de esta cepa con diferentes mutantes de ambas rutas de TGFβ permitió analizar la influencia de estas vías de señalización sobre la actividad promotora de *mir-58*.

Como se puede observar en la Figura R-16 y Figura A-8 del Anexo I, en los fondos genéticos de los mutantes defectivos de TGFβ (*sma-10(ok2224)*, *dbl-1(nk3)*, *daf-4(m63)* y *daf-1(m213)*) se observa una menor expresión de la proteína fluorescente GFP que en el fondo genético silvestre EUB0032 (control). Esto indica que, al menos en el estadio L4, las dos rutas regulan positivamente la actividad promotora de *mir-58*.

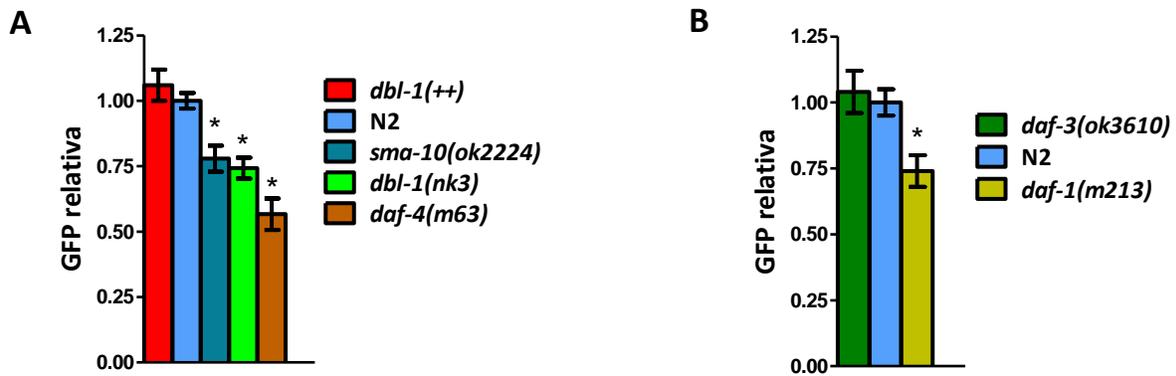


Figura R-16: TGF β Sma/Mab (A) y TGF β Dauer (B) activan transcripcionalmente a *mir-58* en el estadio larvario L4. Se muestra la media de intensidad de GFP de los diferentes fondos genéticos mutantes en relación con el fondo genético silvestre de EUB0032 (control, señalado en la leyenda como N2) con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con EUB0032 (control) con una probabilidad < 0,05. Experimentos realizados en colaboración con A.G. Sáez.

Estos resultados sugieren que la regulación de la cantidad de miRNAs maduros por parte de TGF β Sma/Mab se produce a nivel transcripcional, al menos en el caso de *mir-58*. TGF β Dauer también controla positivamente a este miRNA, al menos en L4.

2. SMA-10

El interés de nuestro grupo por buscar moduladores de la ruta TGF β Sma/Mab nos condujo a estudiar un mutante pequeño de un gen con función desconocida en ese momento y denominado T21D12.9 (más tarde descrito como *sma-10*⁶⁴). Nos centramos en él porque parecía ser el ortólogo de *kekkon5*, un gen de *Drosophila* codificante para un regulador extracelular de TGF β ⁴⁶. Por esta razón, nos propusimos estudiar si T21D12.9 (SMA-10) podía también modular la ruta TGF β Sma/Mab en *C. elegans*.

2.1. SMA-10 contribuye al tamaño de *C. elegans* a través de TGF β Sma/Mab

Como se ha comentado con anterioridad, el fenotipo más característico de los mutantes de la ruta TGF β Sma/Mab es que presentan un tamaño pequeño. Para comprobar si SMA-10 forma parte de esta ruta, se generaron dobles mutantes de este correceptor con el ligando *dbl-1* y se realizaron experimentos de epistasis (similares a los del apartado 1.4.2.), en los que se analizó su longitud. Como se observa en la Figura R-17, los dobles mutantes *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* no eran significativamente más cortos que los mutantes *dbl-1(nk3)* ($p = 0,053$) (Tabla A-4 del Anexo I). Si SMA-10 contribuyera al control del tamaño a través de otras rutas, esperaríamos que *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* fuera significativamente más pequeño que ambos mutantes por separado. Al no observar un efecto aditivo, nuestros resultados sugieren que SMA-10 forma parte de la ruta TGF β Sma/Mab, en cuanto a su papel en tamaño corporal, y no de alguna otra vía de señalización.

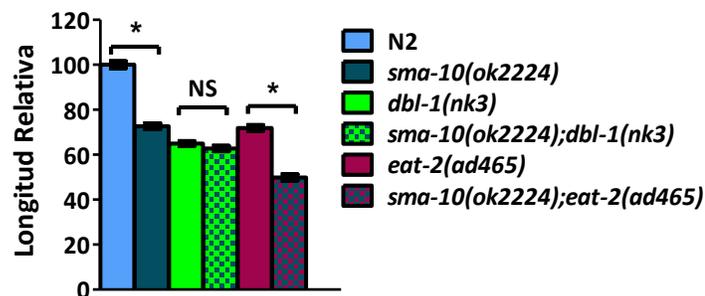


Figura R-17: SMA-10 regula el tamaño a través de TGF β Sma/Mab, pero no a través de *eat-2*. Longitud relativa a la cepa control N2 de *sma-10(ok2224)*, *dbl-1(nk3)*, *eat-2(ad465)* y dobles mutantes con *sma-10(ok2224)*. Se muestra la media de cada cepa con su intervalo de confianza del 95 %. La estrella indica en cada cepa (N2, *dbl-1(nk3)*, *eat-2(ad465)*) si la eliminación de *sma-10* reduce su tamaño de forma significativa (valor $p < 0,05$). Si las diferencias no son significativas se indica con NS. $n > 20$ individuos por cepa.

Para comprobar que *sma-10* regula el tamaño corporal a través de TGF β Sma/Mab, analizamos la longitud de dobles mutantes de *sma-10* con *eat-2* (*sma-10(ok2224);eat-2(ad465)*), que también promueve el crecimiento de los nematodos (Figura R-17). Los animales nulos para *eat-2* son pequeños, porque presentan una tasa de ingesta menor que los nematodos silvestres¹⁷¹. La eliminación de SMA-10 en mutantes

RESULTADOS

eat-2(ad465) reduce en un 31% su tamaño (Tabla A-4 del Anexo I). Esta reducción es comparable al 27% que presentan los mutantes simples *sma-10(ok2224)* frente a los animales silvestres N2 (Tabla A-4 del Anexo I). En conjunto, estos resultados indican que SMA-10 controla el crecimiento de *C. elegans* a través de TGF β Sma/Mab, y no a través de otras rutas, como por ejemplo la de *eat-2*.

Poco después de haber obtenido estos resultados, Gumienny y colaboradores publicaron un trabajo en el que, de forma independiente a nosotros, confirmaban nuestros resultados acerca de SMA-10 y su papel en tamaño corporal mediado por TGF β Sma/Mab⁶⁴. Sin embargo, dicho trabajo no confirmaba si, como cabría esperar, SMA-10 ejerce su función sobre el tamaño corporal a través de la regulación de los niveles de ploidía de la hipodermis. Para confirmarlo, se cuantificó la ploidía de los núcleos hipodérmicos de hyp 7 en los mutantes *sma-10(ok2224)*, midiendo la fluorescencia del agente intercalante DAPI. En la Figura R-18A y la Tabla A-5 del Anexo I se muestra que *sma-10(ok2224)* tiene una ploidía menor en hyp 7 (8,7 C) que nematodos silvestres N2 (10,2 C) y que es similar a la que presentan los mutantes *dbl-1(nk3)* (7,4 C) y *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* (7,8 C). Estos datos refuerzan la idea de que SMA-10 controla el tamaño de *C. elegans* a través de TGF β Sma/Mab, puesto que esta ruta controla el tamaño corporal vía la endopoliploidización de hyp 7^{49, 131}.

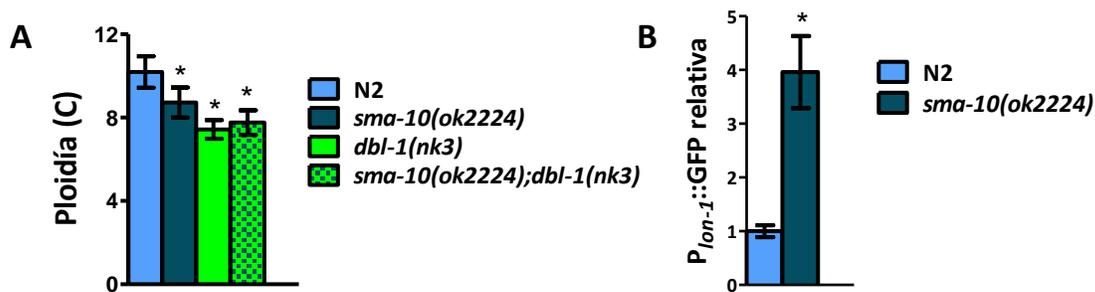


Figura R-18: Los mutantes *sma-10(ok2224)* tienen menor ploidía y mayor actividad de $P_{lon-1}::GFP$ que N2. (A) Contenido medio de ploidía con el intervalo de confianza del 95% para cada cepa. n > 6 individuos por cepa. (B) Cuantificación de la fluorescencia media de $P_{lon-1}::GFP$ emitida por N2 y *sma-10(ok2224)* en estadio L4. n > 25 individuos por cepa.

La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa N2 con una probabilidad < 0,001.

Adicionalmente, se analizó la actividad de la ruta TGF β Sma/Mab en los nematodos defectivos *sma-10(ok2224)*. Para cuantificarla, utilizamos un reportero transcripcional de la ruta, $P_{lon-1}::GFP$ ¹⁴⁷. *lon-1* responde negativamente a la actividad de la ruta TGF β Sma/Mab¹⁴⁷, de tal forma que, cuando la ruta se silencia, se induce la transcripción de *lon-1*. La elección del reportero $P_{lon-1}::GFP$ para analizar la actividad de TGF β Sma/Mab en *sma-10(ok2224)* y no la del reportero $P_{sma-6}::mCherry$ (utilizado en el trabajo sobre *mir-58f*) se debe a que $P_{lon-1}::GFP$ es una construcción integrada y estable en el genoma. Esto nos permite, mediante un único cruce entre *sma-10(ok2224)* y esta cepa transgénica $P_{lon-1}::GFP$, detectar la señalización de TGF β Sma/Mab, midiendo simplemente la expresión de GFP¹⁴⁷. El reportero $P_{sma-6}::mCherry$, aparte de tener que microinyectarse en N2 y pasarse al fondo genético de *sma-10(ok2224)* mediante cruces, requiere

el análisis de varias líneas transgénicas independientes, lo que aumenta el tiempo y el trabajo para obtener resultados equivalentes. Tras transferir el reportero $P_{lon-1}::GFP$ al fondo genético *sma-10(ok2224)*, observamos que aumentó la fluorescencia de GFP en relación a la detectada en un fondo genético silvestre (Figura 18B y Figura A-9 del Anexo I). Estos resultados apoyan que SMA-10 modula positivamente la señalización de TGF β Sma/Mab, confirmando y complementando los resultados de Gumienny y colaboradores⁶⁴.

El descubrimiento de SMA-10 como componente de la ruta TGF β Sma/Mab hizo que nos cuestionásemos si este correceptor era un componente esencial de la ruta o bien su participación era dependiente de la función biológica de la que TGF β Sma/Mab fuera responsable. Esta vía de señalización controla varias funciones en *C. elegans*, algunas de las cuales se analizan a continuación. En resumen, nos preguntamos si SMA-10 es un modulador facultativo o constitutivo de TGF β Sma/Mab.

2.2. SMA-10 no regula la longevidad mediada por TGF β Sma/Mab

Luo y colaboradores describieron que la ruta TGF β Sma/Mab ejerce un control moderado sobre la longevidad de los nematodos, ya que la inactivación de esta ruta hace a los nematodos hasta un 40% más longevos¹³⁴. Este trabajo llevó a preguntarnos si SMA-10 mediaba dicho fenotipo. Para estudiarlo, se investigó, en primer lugar, si la ausencia de SMA-10 influía sobre la longevidad de nematodos N2 (analizando la supervivencia de mutantes *sma-10(ok2224)*) y si este posible efecto era dependiente de la ruta TGF β Sma/Mab (analizando la supervivencia de los dobles mutantes *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)*). En la Figura R-19 y Tabla R-6 se puede observar que los mutantes *sma-10(ok2224)* no viven significativamente más que los nematodos silvestres N2, mientras que los mutantes *dbl-1(nk3)* son más longevos, como ya se había descrito con anterioridad¹³⁴. Además, *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* tiene un comportamiento similar a *dbl-1(nk3)*.

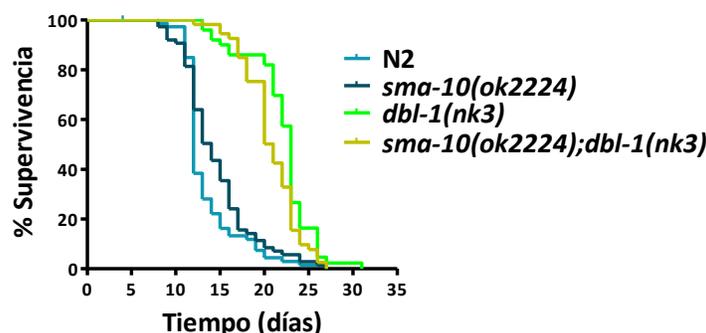


Figura R-19: Longevidad de N2, *sma-10(ok2224)*, *dbl-1(nk3)* y *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)*. Curvas de supervivencia representativas de varias réplicas experimentales. Experimentos realizados en colaboración con E. Lozano.

Estos resultados sugieren que SMA-10 no es necesario en el control de la longevidad a través de la ruta TGF β Sma/Mab, aunque tienen una vida media mayor (16%) que nematodos silvestres.

Cepa	Vida media (días)	valor <i>p</i> N2	valor <i>p</i> <i>dbl-1(nk3)</i>	n
N2	12			75
<i>sma-10(ok2224)</i>	14	0,071	< 0,001	75
<i>dbl-1(nk3)</i>	23	< 0,001		50
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	21	< 0,001	0,017	55

Tabla R-6: Estadística asociada a la Figura R-19. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a la de N2 (valor *p* N2) o a la de la cepa mutante *dbl-1(nk3)* (valor *p* *dbl-1(nk3)*) y número de individuos analizados (n).

2.3. SMA-10 controla el envejecimiento reproductivo a través de TGFβ Sma/Mab

TGFβ Sma/Mab regula el periodo reproductivo en *C. elegans* mediante el control de la proliferación y calidad de las células germinales^{133, 134}. Con el fin de determinar si SMA-10 interviene este proceso, se analizó el periodo reproductivo (ventana temporal durante la cual los individuos depositan huevos fértiles) y la progenie (cantidad de descendencia viable por individuo y unidad de tiempo) de *sma-10(ok2224)* y *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)*.

Como se observa en la Figura R-20, los animales defectivos para SMA-10 tienen un envejecimiento reproductivo similar a los mutantes *dbl-1(nk3)* y ambas cepas tienen una vida reproductiva más larga que los nematodos silvestres. Asimismo, la eliminación de SMA-10 en mutantes *dbl-1(nk3)* no afecta significativamente al periodo reproductivo (Tabla R-7).

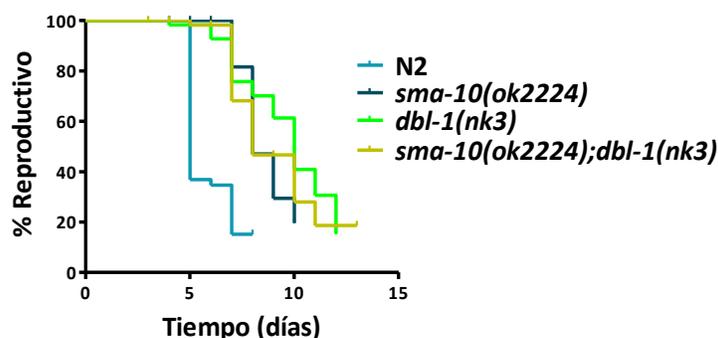


Figura R-20: SMA-10 modula el envejecimiento reproductivo a través de TGFβ Sma/Mab. Porcentaje de individuos reproductivos en cada cepa de un experimento representativo de varias réplicas biológicas. Experimentos realizados en colaboración con E. Lozano.

Cepa	Vida media (días)	valor <i>p</i> N2	Valor <i>p</i> <i>sma-10(ok2224)</i> ^a / <i>dbl-1(nk3)</i> ^b	n
N2	5			60
<i>sma-10(ok2224)</i>	8	< 0,001		61
<i>dbl-1(nk3)</i>	10	< 0,001	0,161 ^a	59
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	8	< 0,001	0,815 ^a ; 0,230 ^b	62

Tabla R-7: Estadística asociada a la Figura R-20. Se muestra la vida media reproductiva de cada cepa, la probabilidad de que la curva de fertilidad sea parecida a la de N2 (valor *p* N2) o a la de las cepas mutantes *sma-10(ok2224)* o *dbl-1(nk3)* (valor *p* *sma-10(ok2224)*^a/*dbl-1(nk3)*^b) y número de individuos analizados (n).

Las tres cepas mutantes (*sma-10(ok2224)*, *dbl-1(nk3)* y el doble mutante) se comportan de manera similar en cuanto al número total de descendencia viable (Figura R-21A) y a la progenie media aportada por individuo cada día (Figura R-21B). Tanto *sma-10(ok2224)* como *dbl-1(nk3)* y *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* tienen una descendencia viable por individuo menor que nematodos silvestres (Figura R-21A), lo que está en concordancia con otros estudios para mutantes de la ruta TGFβ Sma/Mab¹³⁴.

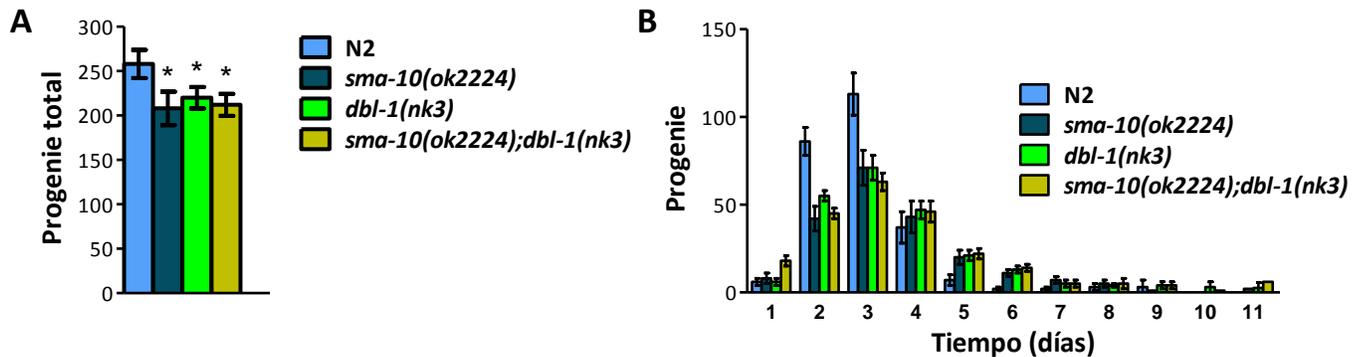


Figura R-21: SMA-10 modula el número de progenie a través de TGFβ Sma/Mab. (A) Número medio de descendientes totales por individuo de cada cepa con su intervalo de confianza del 95%. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con la cepa N2 con una probabilidad < 0,05. (B) Número medio de descendientes por individuo y día con su intervalo de confianza del 95%. n = 30 individuos por cepa. Se muestra el resultado de un experimento representativo de varias réplicas biológicas. Experimentos realizados en colaboración con E. Lozano.

En conjunto, estos resultados indican que el correceptor SMA-10 está involucrado en el control de la reproducción de los nematodos a través de TGFβ Sma/Mab.

2.4. SMA-10 tiene un papel independiente de la ruta TGFβ Sma/Mab en el control de la inmunidad

La ruta TGFβ Sma/Mab también está involucrada en la defensa frente a diversos agentes patógenos^{114, 136, 167, 190, 197, 236}. Para estudiar el papel de SMA-10 en inmunidad, se utilizaron dos bacterias patógenas, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*, a las que *C. elegans* hace frente mediante la respuesta inmune inducida por TGFβ Sma/Mab^{114, 136}, aparte de otras rutas como la de Insulina o la de p38 MAPK¹¹⁴.

Como se muestra en la Figura R-22 y Tablas R-8 y R-9, *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* es más susceptible a la infección por *S. marcescens* (Figura R-22A, Tabla R-8) y por *P. aeruginosa* (Figura R-22B, Tabla R-9) que mutantes *sma-10(ok2224)* y *dbl-1(nk3)* por separado. En estos ensayos se observaron ciertas diferencias con respecto al patógeno utilizado: mientras que *sma-10(ok2224)* es más sensible a *P. aeruginosa* que N2 (Figura R-22B, Tabla R-9), no se observan diferencias significativas de sensibilidad a *S. marcescens* con respecto a la cepa silvestre (Figura R-22A, Tabla R-8). Estos datos nos condujeron a realizar el resto de los experimentos con *P. aeruginosa*, exclusivamente.

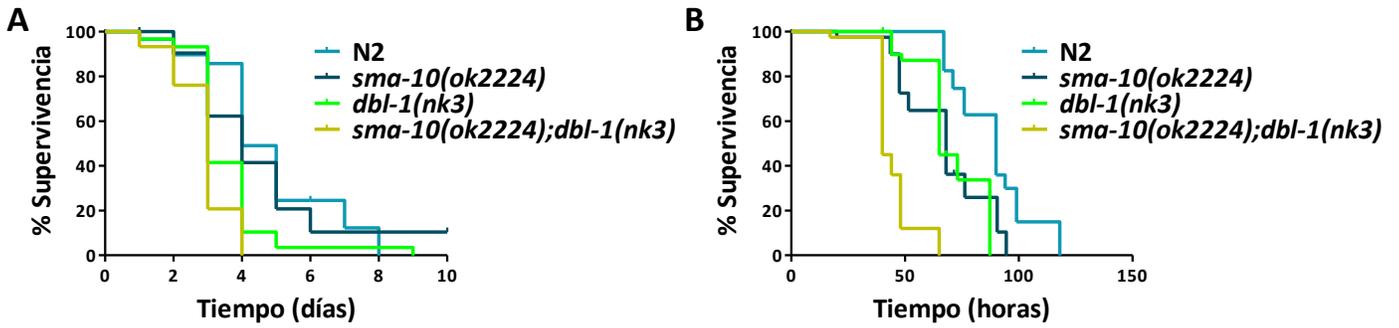


Figura R-22: SMA-10 modula la respuesta inmune independientemente de TGFβ Sma/Mab. Curvas de supervivencia representativas de las diferentes cepas expuestas a *S. marcescens* (A) y a *P. aeruginosa* (B). Experimentos de *P. aeruginosa* realizados en colaboración con M. Jiménez.

Cepa	Vida media (días)	Valor p N2	Valor p <i>dbl-1(nk3)</i>	n
N2	4			29
<i>sma-10(ok2224)</i>	4	0,468	0,045	30
<i>dbl-1(nk3)</i>	3	0,003		30
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	3	< 0,001	0,025	30

Tabla R-8: Estadística asociada a la Figura 22A. Se muestra la vida media de cada cepa en presencia de *S. marcescens*, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a la de N2 (valor p N2) o a la de la cepa mutante *dbl-1(nk3)* (valor p *dbl-1(nk3)*) y número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	Valor p N2	Valor p <i>dbl-1(nk3)</i>	n
N2	90			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	68	< 0,001	0,462	40
<i>dbl-1(nk3)</i>	65	< 0,001		40
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	40	< 0,001	< 0,001	40

Tabla R-9: Estadística asociada a la Figura 22B. Se muestra la vida media de cada cepa en presencia de *P. aeruginosa*, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a la de N2 (valor p N2) o a la de la cepa mutante *dbl-1(nk3)* (valor p *dbl-1(nk3)*) y número de individuos analizados (n).

Estos resultados indican que SMA-10 tiene un papel en el control de la inmunidad de los nematodos, como ya se ha observado para otros mutantes de TGFβ Sma/Mab^{114, 136}. Sin embargo, independientemente de que SMA-10 pueda o no tener un papel en la respuesta inmune a través de TGFβ Sma/Mab, SMA-10 contribuye a la inmunidad del nematodo a través de otra ruta independiente de TGFβ Sma/Mab, ya que los mutantes *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* son los más susceptibles a las infecciones ensayadas.

2.4.1. La expresión de SMA-10 en intestino o hipodermis es suficiente para conferir resistencia a *P. aeruginosa*

Para caracterizar la respuesta inmune a través de SMA-10, se quiso determinar el tejido donde esta proteína es necesaria para combatir a *P. aeruginosa*. Con este fin, se generaron transgénicos que sobreexpresaban SMA-10 en tejidos específicos en el fondo genético *sma-10(ok2224)*. Como SMA-10 está

presente en la faringe, intestino e hipodermis^{64, 86, 128}, se expresó SMA-10 bajo el control de regiones 5' flanqueantes, correspondientes a genes que únicamente se expresan en uno de estos tres tejidos: P_{myo-2} en la faringe¹⁵⁴, P_{trx-3} en intestino⁹⁶ y P_{dpy-7} en hipodermis⁵⁷. A modo de control experimental, también se expresó SMA-10 bajo su propia región 5' flanqueante (P_{sma-10}) y se pudo comprobar que, en efecto, esta construcción ($P_{sma-10}::sma-10$) recuperó al 100% la capacidad de resistencia frente a *P. aeruginosa* (Figura R-23).

La sobreexpresión de SMA-10 en intestino o en hipodermis rescató completamente el fenotipo de inmunosupresión frente a *P. aeruginosa*. Sin embargo, la expresión en la faringe sólo confirió una resistencia parcial a los mutantes *sma-10(ok2224)* (Figura R-23).

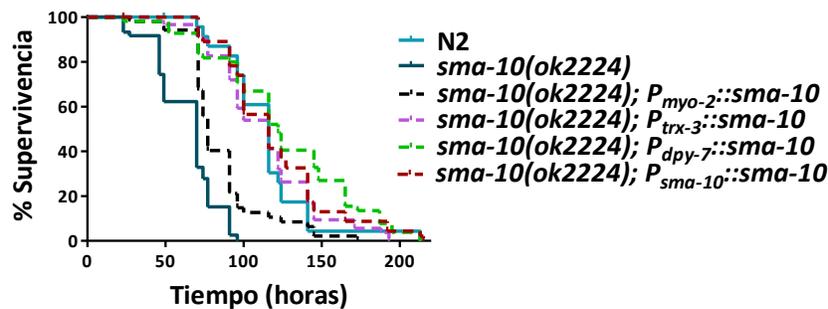


Figura R-23: SMA-10 modula la respuesta inmune a través de varios tejidos. Curvas de supervivencia de la cepa silvestre (N2) y de mutantes *sma-10(ok2224)* que sobreexpresan SMA-10 bajo las regiones 5' flanqueantes específicas de faringe (P_{myo-2}), de intestino (P_{trx-3}), de hipodermis (P_{dpy-7}) y la propia región 5' de *sma-10* (P_{sma-10}). El tiempo de vida media y la estadística asociada se muestran en la Tabla A-6 del Anexo I). Experimentos realizados en colaboración con M. Jiménez.

Estos resultados sugieren que la presencia de SMA-10 en intestino o hipodermis es necesaria y suficiente para modular la respuesta inmune en *C. elegans*, mientras que su expresión en la faringe no tiene un papel crítico en la respuesta al patógeno *P. aeruginosa*.

2.4.2. *P. aeruginosa* no induce la expresión de *sma-10*

Al ser SMA-10 una proteína necesaria para la supervivencia de *C. elegans* en presencia de *P. aeruginosa*, nos preguntamos si la exposición a esta bacteria patógena induce la expresión de *sma-10* para combatir la infección.

Para analizar si la expresión de SMA-10 está regulada por este patógeno, se expusieron nematodos sincronizados en estadio larvario L4 de la cepa control N2 a condiciones de crecimiento normales (*E. coli* OP50) y nocivas (*P. aeruginosa* PA14) durante 6 horas. Posteriormente, se cuantificaron mediante qRT-PCR los niveles de mRNA de *sma-10* en estas dos condiciones experimentales. También se analizaron, como controles, los niveles de mRNA de dos lisozimas cuya expresión se altera por la infección de *P. aeruginosa*: *lys-2*, que se induce, y *lys-7*, que se reprime⁴⁵. En la literatura está descrito que *P. aeruginosa* activa la ruta de Insulina⁴⁵, por lo que se utilizó el gen *sod-3* (reportero de la actividad de Insulina) para asegurarnos de

RESULTADOS

que esta vía de señalización se inducía en nuestras condiciones experimentales. Adicionalmente, se midieron los niveles de mRNA de *sma-6* (reportero de la ruta de TGF β Sma/Mab) para averiguar si TGF β Sma/Mab se induce por la infección de *P. aeruginosa*. En la Figura R-24A se muestra que la exposición a la bacteria patógena durante 6 horas es suficiente para desencadenar una respuesta inmune (*lys-2* se induce y *lys-7* se reprime) y para que la ruta de Insulina se active (*sod-3* se reprime). Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión del mRNA de *sma-6*, ni una alteración significativa de los niveles de mRNA de *sma-10*.

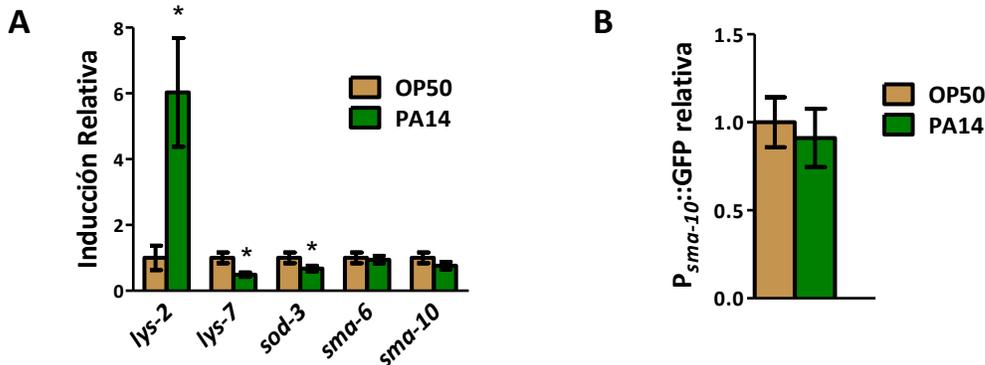


Figura R-24: *sma-10* no está inducido por la exposición a *P. aeruginosa* en estadio L4. (A) qRT-PCR de *lys-2*, *lys-7*, *sod-3*, *sma-6* y *sma-10* en poblaciones sincronizadas en estadio L4 de N2 crecidas en *E. coli* OP50 y en *P. aeruginosa* PA14 durante 6 horas. La gráfica representa la inducción media de dos experimentos independientes, relativa al crecimiento en OP50, con su desviación estándar. La estrella indica diferencias estadísticamente significativas con OP50 con una probabilidad < 0,05. (B) Cuantificación de los niveles de GFP regulados por el promotor de *sma-10* ($P_{sma-10}::GFP$) de larvas transgénicas en estadio L4, expuestas a *E. coli* OP50 y a *P. aeruginosa* PA14 durante 24 horas. Se muestra el resultado medio obtenido con cuatro transgénicos independientes. Experimentos realizados con la colaboración de A. Ulacia-Hernando.

Estos resultados indican que TGF β Sma/Mab no se induce, al menos, tras 6 horas de exposición de larvas L4 a *P. aeruginosa*. Además, la expresión de SMA-10, aunque se reduce levemente (0,76 veces), no se ve afectada de manera significativa en estas condiciones.

Para averiguar si SMA-10 se induce en L4 por una exposición más duradera a *P. aeruginosa* (a diferencia de nuestros ensayos anteriores con una exposición de tan solo 6 horas), nematodos transgénicos que expresaban un reportero de la actividad promotora de *sma-10* ($P_{sma-10}::GFP$) se expusieron a este patógeno durante 24 horas. Estos transgénicos sobreexpresan GFP bajo la regulación de la región 5' flanqueante de *sma-10*, que comprobamos que era suficiente para recuperar la resistencia a *P. aeruginosa* por la sobreexpresión de SMA-10, mediante experimentos de inmunidad (Figura R-23). En la Figura R-24B se resume la respuesta obtenida con cuatro líneas transgénicas independientes. No se observaron cambios globales en la actividad promotora de *sma-10* frente a *P. aeruginosa*, analizada como cambios en la fluorescencia de GFP de los transgénicos bajo las dos condiciones.

Como conclusión a estos resultados, la expresión del correceptor SMA-10 no se induce en presencia de la bacteria patógena *P. aeruginosa* en las condiciones experimentales utilizadas.

2.4.3. SMA-10 modula la respuesta inmune a través de DAF-2

Con el fin de determinar en qué ruta o rutas interviene SMA-10 para modular la capacidad de resistencia de los nematodos a infecciones por *P. aeruginosa*, se eligieron genes involucrados en una diversidad de rutas moleculares, cuya función está relacionada con la defensa frente a patógenos en *C. elegans*, como son *tol-1*, *fshr-1*, *sek-1*, *bar-1* y *daf-2*. Se generaron cepas que carecían tanto de *sma-10* como de cada uno de estos genes y se analizó su supervivencia en presencia de *P. aeruginosa*.

El receptor TOL-1 está implicado en el comportamiento evasivo de *C. elegans* frente a algunas bacterias patógenas⁴¹. En nuestros ensayos, los mutantes *tol-1(nr2033)* no mostraron ser más susceptibles a *P. aeruginosa* que los nematodos silvestres (Figura R-25A), como se había observado con anterioridad¹⁷⁰. Además, los dobles mutantes *sma-10(ok2224);tol-1(nr2033)* no resultaron estar más inmunocomprometidos que los mutantes *sma-10(ok2224)* (Figura R-25A).

FSHR-1 es una proteína transmembrana estructuralmente similar a SMA-10, con repeticiones ricas en leucinas en la parte extracelular, y cuya expresión es necesaria en el intestino de los nematodos para combatir a *P. aeruginosa*¹⁶⁹. SEK-1 forma parte de la señalización de la ruta de *p38* MAPK y también controla la inmunidad de *C. elegans*¹⁸⁴. Por su parte, el ortólogo de β -catenina en nematodos, BAR-1, también regula la respuesta inmune frente a bacterias patógenas⁹⁰. Los dobles mutantes de *sma-10* con estos genes (*fshr-1*, *sek-1* y *bar-1*), mostraron una supervivencia significativamente menor que los mutantes simples, indicando que SMA-10 no controla la respuesta inmune a través de los mecanismos moleculares gobernados por estas vías de señalización (Figura R-25B-D).

Sin embargo, la ausencia de SMA-10 no comprometió la resistencia de los mutantes del receptor de Insulina, *daf-2(e1370)* (Figura R-25E). Estos resultados sugieren que el efecto en inmunidad debido a la ausencia de SMA-10 es suplido por la ausencia de DAF-2 y, por lo tanto, ambos genes podrían estar interaccionando genéticamente y DAF-2 ser epistático a SMA-10.

Para descartar que el efecto que observamos entre *sma-10(ok2224)* y *daf-2(e1370)* en inmunidad no es debido a la interacción de la ruta TGF β Sma/Mab con *daf-2(e1370)*, se analizó la resistencia de dobles mutantes *dbl-1(nk3);daf-2(e1370)* a la infección por *P. aeruginosa*. Como se observa en la Figura R-25F, los dobles mutantes *dbl-1(nk3);daf-2(e1370)* están más inmunocomprometidos que los mutantes *daf-2(e1370)*, sugiriendo que SMA-10 tiene un papel independiente a la ruta de TGF β Sma/Mab en inmunidad.

RESULTADOS

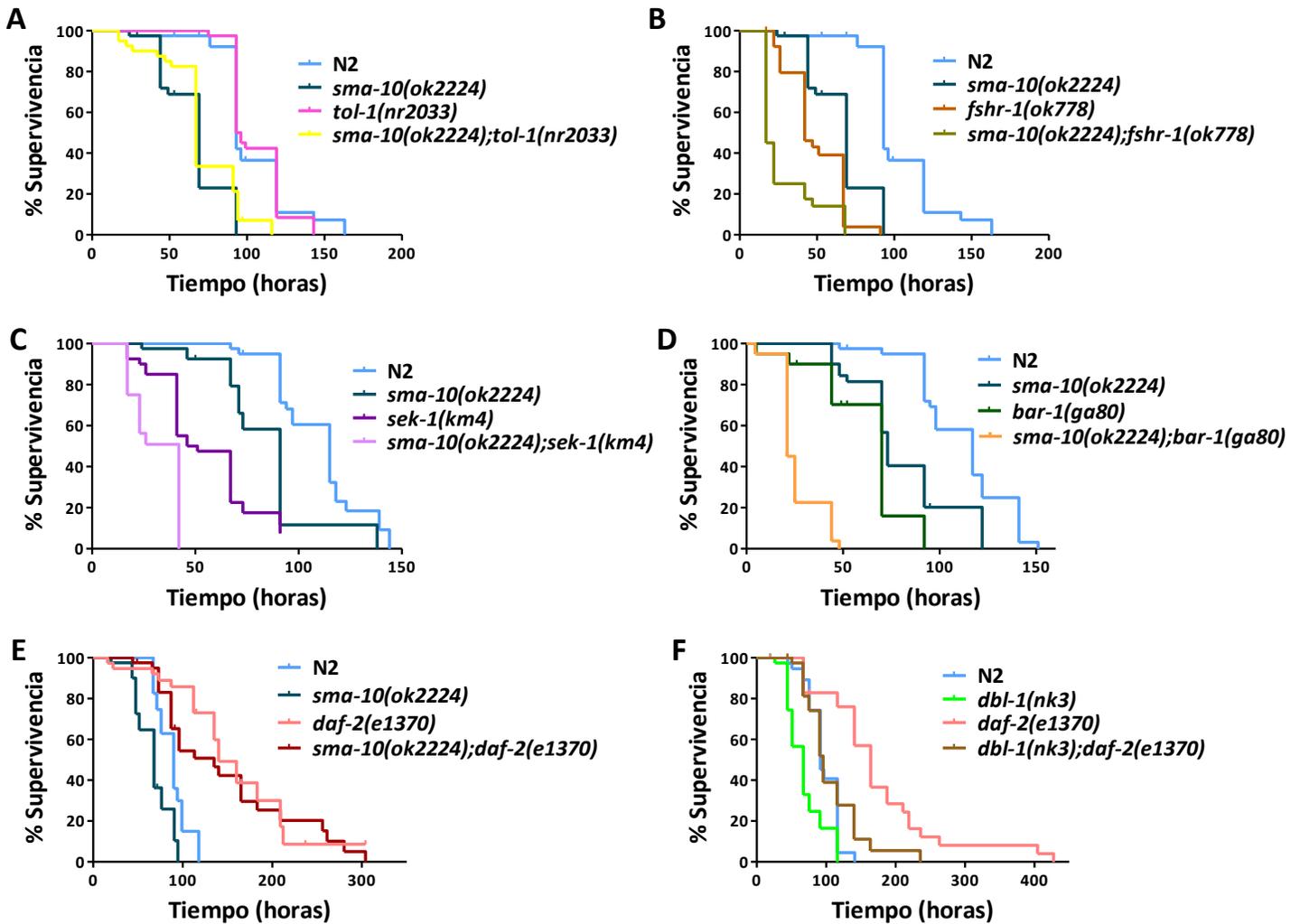


Figura R-25: SMA-10 modula la respuesta inmune a través de DAF-2. Curvas de supervivencia de N2, mutantes simples y dobles mutantes defectivos de *sma-10* con *tol-1* (A), *fshr-1* (B), *sek-1* (C), *bar-1* (D), *daf-2* (E) y el doble mutante *dbl-1(nk3);daf-2(e1370)* (F) expuestos a *P. aeruginosa*. Los tiempos de vida media y la estadística asociada se muestran en las Tablas A-7-12 del Anexo I. Experimentos A-E realizados en colaboración con M. Jiménez.

Como el efector mejor estudiado de la ruta de Insulina es el factor de transcripción DAF-16, nos preguntamos si el papel en inmunidad de SMA-10 depende de DAF-16. La actividad de este factor de transcripción tipo FOXO está regulada negativamente por la activación del receptor de la ruta DAF-2, de tal manera que la activación de DAF-16 se produce cuando la actividad conducida por DAF-2 disminuye^{48, 100, 202}. Sin embargo, los mutantes *daf-16(mu86)* no son más sensibles a *P. aeruginosa* que N2²⁰⁵ (Figura R-26A), aunque cabría esperarlo, porque los mutantes *daf-2(e1370)* son más resistentes que N2 (Figura R-25E-F). Para estudiar si la modulación que ejerce SMA-10 sobre DAF-2 (Figura R-25E) depende de DAF-16, se generaron dobles mutantes *sma-10(ok2224);daf-16(mu86)* y se analizó la resistencia de los mismos a *P. aeruginosa*. En la Figura R-26A se observa que la eliminación de DAF-16 compromete aún más la resistencia de los mutantes *sma-10(ok2224)* a este patógeno. Este resultado sugiere que la ausencia de

SMA-10 nativo, en un fondo genético en el que está ausente DAF-16, induce un efecto acumulativo, por lo que parece existir una relación entre SMA-10 y DAF-16.

Un experimento tal vez más clarificador podría ser el análisis de la supervivencia de un transgénico que sobreexpresa DAF-16 en el fondo genético de un mutante defectivo para SMA-10. Singh y colaboradores han descrito que los nematodos que sobreexpresan DAF-16 son más resistentes a *P. aeruginosa* que los nematodos silvestres^{188, 189}. En la Figura R-26B se muestran las curvas de supervivencia en presencia de *P. aeruginosa* de los transgénicos que sobreexpresan DAF-16 (*daf-16(zls356)*⁷²), en ausencia y presencia de SMA-10. Nuestros resultados no corroboran lo descrito por otros autores^{188, 189}, ya que no observamos un efecto protector frente a la infección bacteriana cuando se sobreexpresa DAF-16. Sin embargo, el fenotipo de *sma-10(ok2224);daf-16(zls356)* es intermedio entre *sma-10(ok2224)* y *daf-16(zls356)*, que es ligeramente más resistente que N2 en nuestros ensayos. Este resultado es consistente con una actuación de SMA-10 independiente de DAF-16, puesto que los efectos opuestos de los dos mutantes se combinan produciendo un fenotipo intermedio.

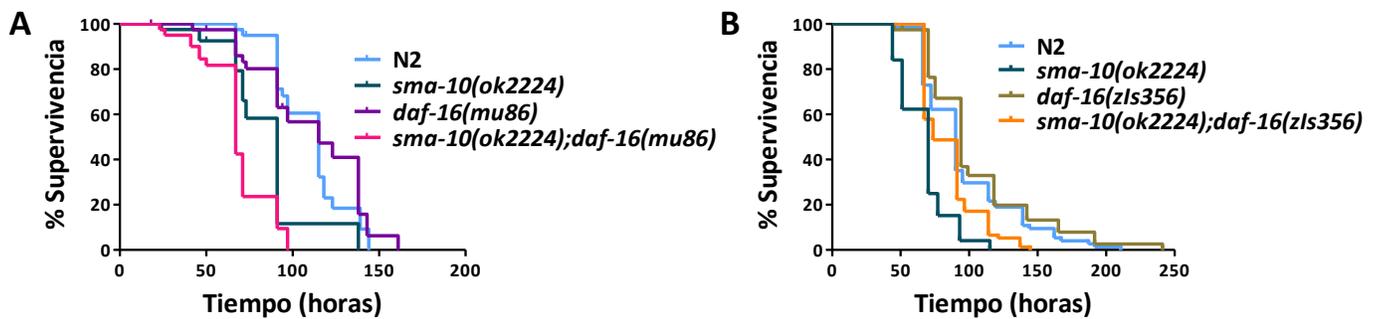


Figura R-26: SMA-10 modula la respuesta inmune independientemente de DAF-16. (A) Curvas de supervivencia en presencia de *P. aeruginosa* de N2, *sma-10(ok2224)*, *daf-16(mu86)* y el doble mutante *sma-10(ok2224);daf-16(mu86)*. Experimentos realizados en colaboración con A. Ulacia-Hernando. **(B)** Curvas de supervivencia de N2, *sma-10(ok2224)*, *daf-16(zls356)* y *sma-10(ok2224);daf-16(zls356)* expuestos a *P. aeruginosa*. Experimentos realizados por E. Lozano.

El tiempo de vida media y la estadística asociada se muestran en las Tablas A-13 y A-14 del Anexo I.

El conjunto de nuestros resultados apunta a que SMA-10 modula la respuesta inmune de *C. elegans* frente a *P. aeruginosa* actuando sobre la ruta de Insulina, pero no clarifica si es dependiente o no del factor de transcripción DAF-16.

DISCUSIÓN

1. La familia de *mir-58* y TGF β

El papel de los miRNAs como reguladores génicos y su implicación en diversas patologías humanas ha centrado multitud de estudios en identificar sus genes diana^{2, 81, 92, 126}. La conservación de las principales vías de señalización entre humanos y nematodos, junto con la simplicidad y fácil detección fenotípica de *C. elegans*, permite encontrar en el nematodo miRNAs y genes diana comunes en ambas especies^{40, 127}. Sin embargo, al eliminar de forma individual miRNAs, se observó que la ausencia de la mayoría de los miRNAs no provocaba alteraciones fenotípicas fácilmente reconocibles, si alguna, en *C. elegans*¹⁴⁴. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos abordajes experimentales para dilucidar tanto la función de miRNAs, como los genes diana regulados por ellos^{5, 20, 36, 101, 198}. Algunos autores hemos utilizado mutantes en los que se delecionan familias enteras de miRNAs^{5, 21}.

En este trabajo se han estudiado en detalle los fenotipos de tamaño y de entrada en dauer de los mutantes *mir-58f(-)*, descritos recientemente⁵. Se ha podido demostrar que, en *mir-58f(-)*, las rutas TGF β Sma/Mab (Figura R-6) y TGF β Dauer (Figura R-11) están inducidas y que esta inducción es debida a la regulación, por parte de *mir-58f*, de *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1* a través de sus 3'UTRs (Figuras R-2 y R-3). Sin embargo, mientras que la inducción de TGF β Dauer puede explicar la incapacidad de estos mutantes de entrar en dauer (Tabla R-3), la inducción de TGF β Sma/Mab no determina su tamaño pequeño (Figuras R-7 y R-8) (Figura D-1).

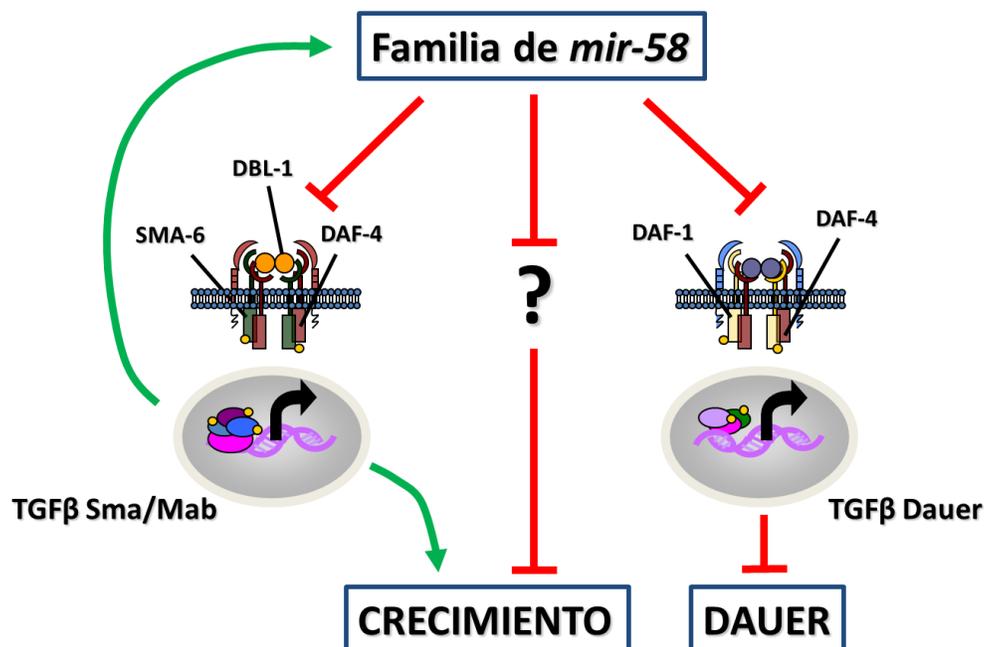


Figura D-1: Modelo de actuación de *mir-58f* sobre los fenotipos de crecimiento y entrada en dauer. *mir-58f* inhibe la actividad de TGF β Sma/Mab y TGF β Dauer actuando sobre *dbl-1*, *sma-6*, *daf-4* y *daf-1*, afectando negativamente al crecimiento por TGF β Sma/Mab y favoreciendo la entrada en dauer a través de TGF β Dauer. Cabe esperar que el efecto promotor del crecimiento de *mir-58f* se produzca por la regulación negativa de inhibidores del crecimiento desconocidos.

1.1. *mir-58f* y TGFβ Sma/Mab

1.1.1. *dbl-1*, *sma-6* y *daf-4* son genes diana de *mir-58f*

mir-58f está implicada directamente en la degradación de los mRNAs de los receptores SMA-6 y DAF-4 y del ligando DBL-1 de TGFβ Sma/Mab, según indican los ensayos *in vitro* (Figura R-2) e *in vivo* (Figura R-3). Al mutar posiciones decisivas para la unión de los miRNAs en los 3'UTRs de estos genes (ver Parte II del Anexo I), se observó, en los ensayos *in vivo*, que los niveles del reportero mCherry en *mir-58f(-)* eran similares a los de nematodos silvestres, salvo para *sma-6*, en los que la señal era superior en los mutantes (Figura R-3). Estos resultados se podrían explicar porque *sma-6* está regulado positivamente por la propia ruta TGFβ Sma/Mab y porque esta ruta está sobreactivada en *mir-58f(-)* (Figura R-6). Para corroborar esta hipótesis, se sustituyó su región 5' flanqueante por la de *daf-4*, gen no sujeto a regulación por TGFβ Sma/Mab (datos no mostrados). En estas condiciones, los valores de expresión de mCherry siguen siendo significativamente superiores en el fondo genético de *mir-58f(-)*, comparado con el fondo genético silvestre (Figura R-3C). Estos datos sugieren que existe otro sitio con afinidad por *mir-58f* en el 3'UTR de *sma-6*. De hecho, dos de los siete programas bioinformáticos utilizados (microna.org y mirWIP) predicen otro sitio de unión al principio del 3'UTR de *sma-6* (ver sitio de unión 1-17 en el 3'UTR en Parte II del Anexo I). En nuestros ensayos, sólo se mutaron las posiciones decisivas de la región 93-114 del 3'UTR de *sma-6* que, aparte de ser común a todas las predicciones bioinformáticas, se encuentra localizada en la posición central del 3'UTR. Se eligió este sitio para su mutación y no el localizado en la región 1-17 del 3'UTR, porque se ha postulado que las secuencias de reconocimiento cercanas al codón de stop suelen tener menor afinidad por los miRNAs. Esto es debido a que estos primeros nucleótidos del 3'UTR están protegidos por la maquinaria de traducción del mRNA^{11, 160}. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos de los ensayos *in vivo*, no podemos descartar que los miRNAs se unan a la región 1-17 del 3'UTR de *sma-6*.

Algunos genes analizados en este estudio ya se han propuesto como genes diana de *mir-58f* por otros autores, que han realizado estudios a gran escala en *C. elegans*^{63, 235}. En StarBase versión 2.0 (<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>) se han recogido algunos trabajos realizados con nuevas tecnologías para descubrir genes diana de miRNAs^{121, 223}. Entre estos estudios a gran escala destacan los ensayos que utilizan la metodología CLIP-seq. Esta metodología combina la fijación por UV de las proteínas del miRISC al mRNA y miRNA que lo componen, con la inmunoprecipitación de una de las proteínas de este complejo y la posterior pirosecuenciación, tras aislar el RNA y retrotranscribirlo en cDNA^{63, 235}. Hasta hace poco, esta metodología no permitía identificar si un miRNA era capaz de unir la región secuenciada, ya que sólo se obtenían fragmentos génicos y no los miRNAs asociados a ellos. La nueva metodología descrita para CLIP-seq por Grosswendt y colaboradores, en la que se ligan el miRNA y el fragmento génico presentes dentro del miRISC, permite la inmunoprecipitación de quimeras mRNA-miRNA, evidenciando una unión directa entre ambas moléculas⁶³.

Según la base de datos StarBase versión 2.0, tanto la región de unión a *mir-58f* 93-114 del 3'UTR de *sma-6* como las correspondientes regiones 127-148 y 234-255 del 3'UTR de *daf-4* han sido encontradas en la inmunoprecipitación de la proteína ALG-1 del miRISC en el estudio de Zisoulis y colaboradores²³⁵. En el artículo de Grosswendt y colaboradores también encontraron una asociación de *mir-58f* con las regiones 127-234 y 351-372 del 3'UTR de *daf-4*⁶³. En cambio, no se ha detectado la interacción de *mir-58f* ni con el ligando DBL-1 de TGFβ Sma/Mab, ni con el receptor de TGFβ Dauer, DAF-1. Por consiguiente, estudios como los realizados en este trabajo, que analicen de forma individual la interacción entre miRNAs y genes concretos, son necesarios para desenmascarar la conexión existente entre ellos, que no se aprecia en los abordajes a gran escala^{63, 98, 99, 235}.

1.1.2. El fenotipo de tamaño de *mir-58f(-)*

Al igual que ocurre con *mir-58f* en *C. elegans*, en *D. melanogaster bantam*, el único ortólogo de *mir-58f*, también es capaz de promover el crecimiento^{17, 74}. Los mutantes defectivos de *bantam*, como los mutantes *mir-58f(-)* de *C. elegans*, son animales pequeños con defectos en la fertilidad^{5, 74}. En el caso de *D. melanogaster*, son las rutas de Hippo-Warts, EGFR, TGFβ e Insulina las que controlan el crecimiento a través de *bantam*^{17, 73, 153}. En este sentido, nuestros resultados en *C. elegans* están en concordancia con los descritos en *D. melanogaster*, ya que hemos observado que las rutas de TGFβ también parecen controlar la expresión de *mir-58* (Figuras R-15 y R-16). Sin embargo, el pequeño tamaño corporal de los nematodos *mir-58f(-)* no parece deberse a la sobreexpresión de los genes diana identificados de la ruta TGFβ Sma/Mab *dbl-1*, *sma-6* y *daf-4*, ya que esto implicaría nematodos de mayor tamaño corporal que N2, al contrario de lo que observamos. Como cada miRNA tiene el potencial de reprimir muchos genes al mismo tiempo y el tamaño corporal del nematodo es susceptible a cambios en una diversidad de rutas y genes, postulamos que el pequeño tamaño de *mir-58f(-)* es el efecto combinado en varios genes por determinar.

El crecimiento de los organismos se produce por un aumento del número y/o del tamaño de las células¹¹⁶. En *Drosophila* se ha observado que *bantam* controla la tasa de proliferación celular de varios tejidos como las alas¹⁹. En *C. elegans* el tejido que es mayormente responsable del tamaño adulto es la hipodermis²²⁷. Durante las diferentes etapas larvarias, las células precursoras de la hipodermis se dividen para aumentar en número y la cantidad de núcleos de este sincitio poliploide³. Para determinar si *mir-58f* promueve la proliferación que determina el número de núcleos de la hipodermis en *C. elegans*, se contabilizó el número de células precursoras de los núcleos del sincitio hipodérmico en los mutantes simples *mir-58(n4640)* y el número de núcleos hipodérmicos de mutantes *mir-58f(-)*. Sin embargo, no observamos diferencias entre los mutantes de *mir-58f* y nematodos silvestres N2, por lo que concluimos que si esta familia de miRNAs afecta a la proliferación en *C. elegans*, no lo hace sobre el tejido hipodérmico.

Recientemente, Jiang y colaboradores han observado en *D. melanogaster* que *bantam* también contribuye al crecimiento mediante el aumento del tamaño de las células de la epidermis, como consecuencia del control que ejerce este miRNA sobre la endorreduplicación de sus núcleos⁹⁵. Los adultos de *C. elegans* están formados por un número fijo de núcleos, 959 en las hermafroditas y 1031 en los machos⁴. Sin embargo, al alcanzar el periodo adulto, los nematodos continúan creciendo, por el aumento en endorreduplicación de los núcleos hipodérmicos, que son dependientes de la actividad de TGF β Sma/Mab¹³¹. Para analizar si el control que ejerce *bantam* sobre la endorreduplicación de los núcleos epidérmicos en *D. melanogaster* está conservado en *C. elegans*, habría que analizar el contenido en ploidía de la hipodermis de *mir-58f(-)*.

Alternativamente, *mir-58f* también puede estar controlando el tamaño de los nematodos, actuando a través de la línea germinal: se ha observado que los sitios pronosticados de unión a esta familia de miRNAs aparecen infrarrepresentados en transcriptomas de la línea germinal, lo que sugiere una fuerte regulación por parte de esta familia de miRNAs en este tejido¹⁹¹. Por otro lado, la línea germinal inhibe el crecimiento porque, al eliminarla en las larvas, hace que los adultos tengan mayor tamaño^{150, 162}. En este sentido, se ha observado que nematodos sin línea germinal sobreexpresan *mir-58*²²⁰, lo que está en concordancia con un control positivo del crecimiento por parte de este miRNA y también sugeriría una regulación de *mir-58f* desde la propia línea germinal.

1.1.2.1. *mir-58* como modulador positivo del tamaño

Para esclarecer si *mir-58f* promueve el tamaño corporal a través de algún tejido en particular, se sobreexpresó *mir-58* de forma independiente en intestino y en hipodermis (Tabla R-2). Nuestros resultados indican que *mir-58* contribuye más al crecimiento de los nematodos a través del intestino (recuperación del 67% del tamaño control N2), que a través de la hipodermis (recuperación del 62% del tamaño control N2) (Tabla R-2). Esta observación es acorde con la expresión natural de *mir-58*, que es más fuerte en el intestino que en la hipodermis⁹¹, por lo que, a priori, se espera que tenga un papel más determinante en este tejido. Sin embargo, no podemos descartar que la sobreexpresión de *mir-58* en hipodermis esté inhibiendo la actividad de TGF β Sma/Mab, actuando sobre los mRNAs de *sma-6* y *daf-4*, y por tanto, enmascarando el efecto que tiene este miRNA como modulador positivo del crecimiento en este tejido.

Estos resultados sugieren varias posibilidades: 1) La expresión del miRNA en varios tejidos de forma simultánea es necesaria para el correcto desarrollo de su función, ya que *mir-58* se expresa en varios tejidos como intestino e hipodermis⁹¹ y estos dos controlan el crecimiento de *C. elegans*⁶⁶. En este sentido, nuestros ensayos pusieron de manifiesto que *mir-58* parece dirigir el tamaño simultáneamente a través de hipodermis e intestino, ya que la expresión en cada uno de estos tejidos por separado no recupera 100% el tamaño normal (Tabla R-2). Aparte del requerimiento de *mir-58* para promover el crecimiento en intestino e

hipodermis, la expresión de *mir-58* en una localización específica también podría regular la expresión de alguna hormona endocrina, que controlara el crecimiento de *C. elegans*. A favor de esta idea, en *Drosophila*, la expresión de *bantam* en la glándula protorácica es suficiente para inhibir la producción de ecdisona y promover el crecimiento de la larva¹⁷. 2) Los niveles de expresión de *mir-58*, controlados por las regiones 5' flanqueantes estudiadas, puede que no sean los correctos (insuficientes o excesivos), como parece indicar el resultado de la sobreexpresión de *mir-58* con la región 5'flanqueante de expresión ubicua de RPL-28, que no pudo rescatar el tamaño de los mutantes *mir-58f(-)* completamente (Tabla R-2).

Por último, hemos observado que la sobreexpresión de *mir-58*, bajo el control de su región 5' flanqueante y sin estar sometido a la regulación por su 3'UTR, es menos eficiente que la del miRNA con su 3'UTR a la hora de recuperar el fenotipo de tamaño. Estos resultados ponen de manifiesto que el 3'UTR de *mir-58* es importante para ejercer su función (Tabla R-2), como ya se ha descrito para el miRNA *let-7*²³⁴. En su 3'UTR, *let-7* presenta una región complementaria a su forma madura, mediante la cual promueve la maduración de la forma primaria, creando un bucle autorregulatorio positivo²³⁴. En el 3'UTR de *mir-58* se han encontrado tres regiones complementarias a miR-58 (Figura A-3 del Anexo I), que pudieran estar promoviendo la maduración del transcrito primario, de forma análoga a *let-7*. Sería interesante averiguar si, *in vivo*, el 3'UTR de *mir-58* añade estabilidad al miRNA.

1.1.2.2. *mir-80* como modulador positivo del tamaño

Nuestros resultados muestran que la influencia de *mir-80* sobre el fenotipo de tamaño es pequeña, en comparación con la de *mir-58*. De hecho, no pudimos detectar una reducción significativa en el tamaño de los mutantes *mir-80(nDf53)*, ni en los dobles mutantes *mir-80(nDf53);mir-81/82(nDf54)* (Figura R-5), en contraposición con los resultados de Vora y colaboradores, en los que observan que *mir-80(nDf53)* es un 10% más pequeño que nematodos silvestres N2 a la edad de cuatro días²¹¹. En su trabajo, los animales se midieron cuando éstos llevaban únicamente un día en su fase adulta, lejos del momento en el que se alcanza el máximo tamaño corporal, que está alrededor de 120-144 horas desde la eclosión del huevo (4-5 días desde el momento de entrada en adultos), en el caso de la cepa silvestre⁵. Si la ausencia de *mir-80* induce un cambio en la velocidad con la que los animales se desarrollan, puede que no se observe la diferencia real de tamaño corporal en el momento del desarrollo en la que lo midieron.

Por otro lado, cuando sobreexpresamos *mir-80* (*mir-80++*) se rescató sólo en un 77% el fenotipo de tamaño de *mir-58f(-)*, contradiciendo lo publicado por otros autores (Tabla R-2)⁵. Una explicación posible es que las regiones 5' flanqueantes utilizadas para expresar *mir-80* difieran entre ambos trabajos. En nuestro caso, la región 5' flanqueante clonada se localiza entre *mir-238* y el inicio de *mir-80*. Puede que esta zona no abarque las regiones reguladoras necesarias para la correcta transcripción de *mir-80* y la utilizada por Álvarez-Saavedra y Horvitz fuera más extensa⁵. Alternativamente a las diferencias en la longitud de la región

5' flanqueante, cabe la posibilidad de que Álvarez-Saavedra y Horvitz no detectaran el tamaño máximo que alcanzan los animales que sobreexpresan *mir-80* en sus experimentos. Esta discrepancia podría explicarse igualmente por diferencias en la forma de medir el tamaño, como se ha expuesto en el párrafo anterior.

Por otro lado, la recuperación del 77% del tamaño silvestre, cuando se sobreexpresa *mir-80* en *mir-58f(-)* (Tabla R-2), refleja el control positivo que ejerce este miRNA sobre el crecimiento de *C. elegans*. Este control positivo está aparentemente en contradicción con que la ausencia de *mir-80* no afecte al tamaño corporal de los nematodos silvestres (Figura R-5). Sin embargo, la explicación más probable es que la ausencia de *mir-80* en un fondo genético silvestre es compensada por el efecto de los otros miRNAs de la familia, especialmente de *mir-58*.

1.1.2.3. Genes diana que influyen en el tamaño de *mir-58f(-)*

Para explicar el tamaño pequeño de *mir-58f(-)*, se analizaron los niveles de mRNA de genes reguladores del crecimiento en *C. elegans*, que aparecían en diferentes programas informáticos como posibles genes diana de *mir-58f* (Figura R-10). Nuestros resultados de qRT-PCR indican que, de un conjunto de genes analizados, sólo *daf-25* aparece sobreexpresado significativamente en poblaciones mixtas de *mir-58f(-)* (Figura R-10). DAF-25 regula la señalización de la ruta de cGMP, implicada en la respuesta frente a diversas condiciones ambientales^{53, 94}, y controla el tamaño actuando sobre TGFβ Sma/Mab, a través de EGL-4^{9, 52, 53, 75}. Aunque la sobreexpresión de DAF-25 fuera capaz de disminuir el tamaño de los animales, otros autores lo han situado corriente arriba de la ruta de TGFβ Sma/Mab. Como el tamaño pequeño de *mir-58f(-)* es independiente de TGFβ Sma/Mab (Figuras R-7 y R-8), podemos descartar que la sobreexpresión de DAF-25 sea la causante del defecto en crecimiento de *mir-58f(-)*.

Al ser los miRNAs reguladores potenciales de cientos de genes^{102, 180} y los miembros de *mir-58f* unos de los miRNAs más expresados en nematodos^{101, 103, 125}, es lógico pensar que los mutantes *mir-58f(-)* tengan multitud de vías de señalización alteradas que estén afectando a su tamaño. Nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva de transcriptomas, podrían utilizarse para identificar los genes alterados en los mutantes de *mir-58f*. Otros autores ya han utilizado aproximaciones similares para encontrar genes diana de *mir-58*^{98, 99}. Sin embargo, en estos ensayos proteómicos no se pudieron identificar ninguno de los genes diana de *mir-58f(-)* descubiertos en este trabajo^{98, 99}. Como la regulación génica por parte de los miRNAs suele ser sutil^{137, 180} y los estudios realizados por estos autores se llevaron a cabo con mutantes simples *mir-58(n4640)*, puede que las variaciones de SMA-6, DAF-4 y DAF-1 no fueran lo suficientemente grandes para poder ser detectadas. Este hecho pone de manifiesto que el trabajo con mutantes defectivos de familias enteras de miRNAs puede ser más esclarecedor a la hora de determinar sus genes diana.

1.2. *mir-58f* y TGFβ Dauer

1.2.1. *daf-1* también es un gen diana de *mir-58f*

Por qRT-PCR se observó que los niveles de mRNA de *daf-1* y *daf-4* son significativamente superiores en *mir-58f(-)* que en los de nematodos silvestres en todos los estadios larvarios analizados (Figura R-1). En los ensayos *in vitro* los 3'UTRs de DAF-1 y DAF-4 fueron modulados negativamente por todos los miembros de *mir-58f* (Figura R-2) y en los experimentos *in vivo* se confirmó que esta interacción también es válida en *C. elegans* (Figura R-3). Los estudios masivos realizados por otros autores, que utilizan la metodología CLIP-seq^{63, 235}, apoyan la unión de *mir-58f* al 3'UTR de *daf-4* inferida de nuestros ensayos, como se ha descrito en el apartado 1.1.1. de la discusión. Sin embargo, no se ha observado una relación entre *daf-1* y *mir-58f*, ni en los estudios de CLIP-seq anteriores^{63, 235}, ni en los de proteómica de Jovanovic^{98, 99}. En nuestros estudios *in vivo*, se pudo detectar que la expresión del reportero mCherry bajo la regulación del 3'UTR silvestre de *daf-1* se duplica en mutantes defectivos para *mir-58f*, en comparación con la registrada para nematodos control N2 (Figura R-3). Este aumento en la expresión de mCherry, similar al obtenido con el 3'UTR silvestre de *dbl-1* (de unas cuatro veces), es mucho menor que el observado para los 3'UTRs silvestres de *daf-4* o *sma-6* (20 veces para el de *daf-4* y 15 veces para el de *sma-6* regulado por la región 5' flanqueante de *daf-4*) (Figura R-3). En estos ensayos (Figura R-3), al reflejar la expresión de mCherry la capacidad de interacción entre esta familia de miRNA y los diferentes 3'UTRs, se puede extrapolar la intensidad de represión que ejercen los miRNAs sobre los diferentes 3'UTRs. Por lo tanto, como la capacidad de represión de los 3'UTRs silvestres de *daf-1* y *dbl-1* por parte de *mir-58f* parece ser menor que la observada para los de *daf-4* y *sma-6*, la probabilidad de detectar las interacciones miRNA-mRNA de estos genes podría estar reducida en estudios a gran escala.

Aunque *daf-7* fue identificado como gen diana de *mir-58f* por cuatro programas informáticos diferentes, nuestros resultados no apoyan inequívocamente que *daf-7* sea regulado por esta familia de miRNAs. Por un lado, los niveles de mRNA del ligando DAF-7 no aumentaron respecto a los de nematodos silvestres en el estadio L2 (Figura R-1) y los ensayos *in vitro* indicaron que únicamente miR-58 era susceptible de inhibir levemente la expresión de luciferasa a través del 3'UTR de *daf-7* (Figura R-2). Por otro lado, los niveles de mRNA de *daf-7* en *mir-58f(-)* son elevados frente a los que se observan en N2 y similares a los que muestran nematodos con la ruta TGFβ Dauer inducida (*daf-3(ok3610)*, *daf-8(++)* y *daf-4(pwls922)*) (Figura R-11A). Por lo tanto, estos resultados sugieren que *mir-58f(-)* no actúa directamente sobre *daf-7*, sino que los elevados niveles de *daf-7* son un efecto indirecto debido a que la ruta de TGFβ Dauer está activa en *mir-58f(-)*. Adicionalmente, no se ha observado en ningún estudio a gran escala que *mir-58f* esté regulando a *daf-7*^{63, 98, 99, 235}. Sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, hay que valorar con cautela los resultados de estos trabajos masivos, ya que puede que no sean lo suficientemente sensibles para detectar

interacciones sutiles, restringidas a tejidos muy concretos o con genes que no se expresen en altas concentraciones.

1.2.2. La activación de TGF β Dauer explica el fenotipo defectivo de entrada en dauer de *mir-58f(-)*

Nuestro trabajo sugiere que los mutantes *mir-58f(-)* son incapaces de entrar en el estadio de resistencia dauer por tener la ruta TGF β Dauer inducida, ya que la eliminación de la actividad del receptor DAF-1 en estos animales mutantes restauró el fenotipo silvestre (Tabla R-3, Figura R-14).

Hasta la fecha, se ha estudiado en profundidad la expresión del ligando DAF-7 como regulador de la entrada en dauer^{174, 179}. En cambio, no hay ensayos que, de forma directa, hayan puesto de manifiesto la importancia de la sobreexpresión de los receptores DAF-1 y DAF-4 en la capacidad de reprimir la entrada en dauer. En este trabajo, mostramos que la sobreexpresión de DAF-1 en un fondo genético defectivo para *daf-1* es capaz, por sí misma, de reducir la entrada en dauer en *C. elegans* (Figura R-12). Teniendo en cuenta que *mir-58f(-)* tiene altos niveles no sólo de DAF-1 sino también de DAF-4, DAF-7 y DAF-8 (Figuras R-2 y R-11A), nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la activación de TGF β Dauer en *mir-58f(-)* explicaría su fenotipo defectivo de entrada en dauer.

Por otro lado, también hemos observado un aumento en el porcentaje de entrada en dauer de *mir-58f(-);daf-1(m213)* en relación a la cepa *daf-1(m213)* (Tabla R-3). Este aumento puede ser debido a que *mir-58f(-)* tenga también alteradas otras rutas implicadas en el control de la entrada en dauer. En *C. elegans* existen varias rutas que regulan la entrada en dauer, siendo TGF β Dauer e Insulina dos rutas que actúan en paralelo, pero a la vez intercomunicadas por mecanismos no totalmente esclarecidos^{83, 129, 151, 159, 183}. Estas rutas controlan, a nivel neural, la información ambiental recibida por receptores acoplados a proteínas G para, a su vez, transducirla para que se ejecute la remodelación global de la larva, convergiendo sobre la regulación del receptor nuclear DAF-12^{8, 48, 83}. En este sentido, hemos observado en este trabajo que los mutantes *mir-58f(-)* tienen también inhibida la ruta de Insulina (Figura R-13). La inhibición de la ruta de Insulina, por sí sola, no explica el defecto de entrada en dauer de *mir-58f(-)*, ya que hemos observado que los mutantes *mir-58f(-);daf-2(e1370)* son incapaces de formar dauer (Figura R-14). Sin embargo, una reducción de la misma sí podría explicar el aumento de individuos de *mir-58f(-);daf-1(m213)* que entran en dauer, en relación al número que lo hace de *daf-1(m213)* (Tabla R-3).

En cualquier caso, todavía queda por esclarecer en este trabajo, si la inducción de *daf-16*, *ins-1* e *ins-17* en *mir-58f(-)* (Figura R-13A) se debe a la unión de esta familia de miRNAs a sus 3'UTR (ver Parte II del Anexo I) o es una consecuencia indirecta de la ausencia de señalización a través de insulina o de la activación de las rutas TGF β , ya que las rutas de TGF β Sma/Mab y Dauer pueden modular la actividad de la ruta de Insulina^{24, 129, 151, 159, 175, 183, 226}.

1.3. Bucle regulatorio entre TGF β y *mir-58f*

En este trabajo hemos detectado que los mutantes de TGF β Sma/Mab *dbl-1(nk3)* presentan en el estadio L4 una menor cantidad de las formas maduras de *mir-58* y *mir-80* que los nematodos control N2 (Figura R-15A). Este resultado sugiere un control transcripcional de estos miembros de la familia de *mir-58* por parte de TGF β Sma/Mab, tal y como se ha descrito en otros organismos como *Drosophila* y humanos. En *D. melanogaster*, el ligando Dpp de la superfamilia de TGF β controla, a través del factor de transcripción Smad Mad, la transcripción del único ortólogo de esta familia de miRNAs, *bantam*¹⁵³. Uno de los posibles ortólogos humanos, *hsa-mir-143*, también es regulado transcripcionalmente a través de Smads^{15, 33, 130}. El análisis de la actividad de la región 5' flanqueante de *mir-58* en mutantes de ambas rutas de TGF β confirmó los resultados obtenidos para TGF β Sma/Mab y sugirió que también TGF β Dauer regulara a *mir-58*, al menos, en el estadio L4 (Figura R-16).

El bucle regulatorio negativo existente entre TGF β Sma/Mab y *mir-58* y *mir-80* podría estar controlando que la señalización a través de TGF β Sma/Mab permaneciera dentro de un rango óptimo de actividad. Esta ruta de TGF β se autorregula positivamente a nivel del receptor *sma-6*^{145, 175} (Figura R-6) y *mir-58f* serviría para que los niveles de SMA-6, y por tanto de la ruta, no aumentaran exponencialmente. En este sentido, en los experimentos de sobreexpresión de SMA-6, hemos observado que la mutación del 3'UTR (en el sitio de unión 93-114 a *mir-58f*) confiere un mayor tamaño a los nematodos que aquellos que sobreexpresan este receptor con su 3'UTR silvestre (Figura R-9). Además, la sobreexpresión de *sma-6* con el 3'UTR mutado aumentó el tamaño de los mutantes *mir-58f(-)* en la misma proporción que lo hizo la misma construcción con el 3'UTR silvestre. Por consiguiente, estos experimentos sugieren que *mir-58f* es necesaria para controlar la actividad de TGF β Sma/Mab, influyendo de forma negativa en la determinación del tamaño corporal a través de esta ruta.

2. SMA-10

El estudio de la función de ortólogos de genes humanos en *C. elegans* permite establecer relaciones entre sus productos génicos y diferentes rutas de señalización conservadas entre ambas especies. Hasta la fecha, se ha descrito que los ortólogos de SMA-10 en humanos, las proteínas LRIG, son moduladores de las rutas de señalización gobernadas por EGF^{70, 185}. En este trabajo se ha estudiado la capacidad de SMA-10 para modular diferentes fenotipos de la ruta TGF β Sma/Mab. Hemos observado que este ortólogo de LRIG humano funciona como un correceptor facultativo, ya que no está involucrado en todos los fenotipos controlados por esta vía de señalización. Adicionalmente, nuestros resultados indican que, en el control de la respuesta inmune, SMA-10 parece interactuar genéticamente con DAF-2, el receptor de la ruta de Insulina en *C. elegans*, y su sobreexpresión en intestino o en hipodermis es suficiente para conferir resistencia frente a *P. aeruginosa* (Figura D-2).

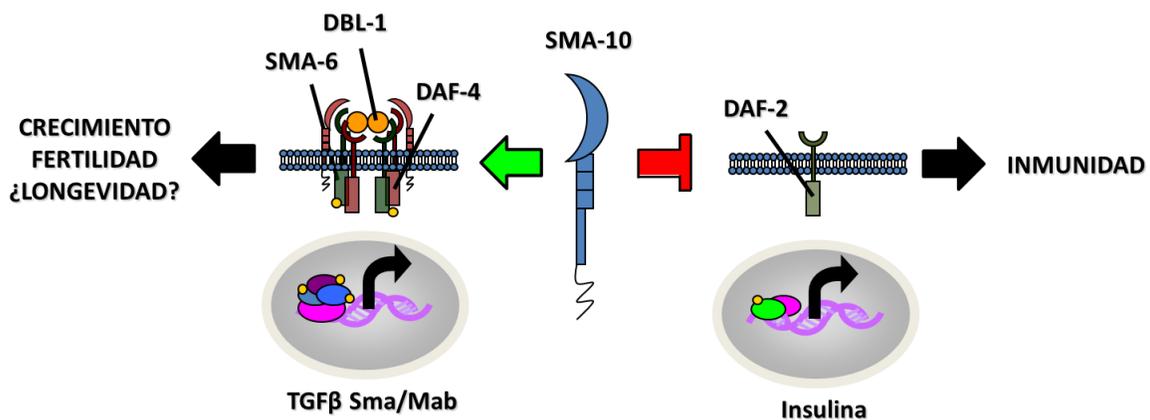


Figura D-2: Modelo de actuación de SMA-10 como correceptor de las rutas de TGF β Sma/Mab e Insulina. En el caso de TGF β Sma/Mab, SMA-10 actúa como un modulador positivo de la ruta y está involucrado en los fenotipos de crecimiento y fertilidad, mientras que su papel en longevidad es controvertido. En cuanto a la ruta de Insulina, SMA-10 funciona como un modulador negativo y actúa corriente arriba de su receptor DAF-2, al menos, en el fenotipo de inmunidad.

2.1. SMA-10 como modulador facultativo de la ruta TGF β Sma/Mab

Como se discutirá en este apartado, el estudio de los fenotipos regulados por TGF β Sma/Mab en mutantes *sma-10(ok2224)* ha puesto de manifiesto que SMA-10 actúa como un modulador facultativo de esta vía de señalización, al igual que el otro correceptor descrito para TGF β Sma/Mab, DRAG-1²⁰¹.

2.1.1. Tamaño corporal

La ruta de TGF β Sma/Mab controla el tamaño de los nematodos en función de su actividad^{146, 193}. En este sentido, los ensayos de crecimiento de los mutantes *sma-10(ok2224)* pusieron de manifiesto la interacción de SMA-10 con TGF β Sma/Mab (Figura R-17), al igual que han hecho otros autores⁶⁴. Sin embargo, Gumienny y colaboradores no describieron que los mutantes *sma-10(ok2224)* eran pequeños por

tener comprometida la endorreproducción de los núcleos de la hipodermis, como se muestra en este trabajo (Figura R-18A). Asimismo, nosotros hemos confirmado que SMA-10 modula positivamente la ruta de TGF β Sma/Mab mediante el análisis de la actividad del promotor de *lon-1* (Figura R-18B), gen regulado transcripcionalmente de forma negativa por la misma¹⁴⁷.

2.1.2. SMA-10 y el envejecimiento

Según nuestros resultados, SMA-10 no influye significativamente en el envejecimiento somático de los individuos ($p = 0,071$, Tabla R-6), al contrario de lo que ocurre con algunos de los componentes de la ruta de TGF β Sma/Mab, como *dbl-1* y *sma-6*, cuya ausencia aumenta la vida media de los animales con respecto a la cepa silvestre N2¹³⁴ (Figura R-19). Sin embargo, se ha descrito que otros componentes de TGF β Sma/Mab no influyen de forma consistente en la longevidad de los nematodos (como las proteínas Smad SMA-2 y SMA-4) o incluso no tienen ningún efecto sobre ella (como la proteína Smad SMA-3 y el factor de transcripción SMA-9)¹³⁴, por lo que la modulación de TGF β Sma/Mab tiene un efecto variable en la determinación de este fenotipo.

En cambio, la inhibición de SMA-10 por RNAi revela que el fenotipo de longevidad asociado a SMA-10 es controvertido. Si bien, en los estudios realizados con esta técnica y revisados por Yanos y colaboradores recientemente, no se observa que la inhibición de SMA-10 por RNAi incremente la longevidad de los nematodos²²⁴, Samuelson y colaboradores detectaron un pequeño aumento significativo en la vida media de los individuos tratados¹⁷⁶. Estas discrepancias podrían poner de manifiesto que SMA-10 no tuviera un efecto consistente en la longevidad de los nematodos, como ya se ha visto para SMA-2 y SMA-4¹³⁴, y dependiera de pequeñas variaciones ambientales incontroladas al realizarse los diferentes experimentos. Este factor desconocido podría aumentar la supervivencia de los nematodos en los que se ha inhibido SMA-10, llegando a hacer las diferencias estadísticamente significativas. De hecho, nosotros hemos observado que la vida media de *sma-10(ok2224)* aumenta un 17% respecto a la de la cepa N2 en los dos ensayos de longevidad realizados. Aunque las curvas de supervivencia de *sma-10(ok2224)* nunca hayan sido estadísticamente diferentes a las de los controles N2, teniendo en cuenta los resultados del grupo de Samuelson¹⁷⁶, no podemos descartar inequívocamente que este correceptor tenga un mínimo efecto en la longevidad de *C. elegans*.

Mediante este trabajo también se ha podido determinar que el control positivo que ejerce SMA-10 sobre el envejecimiento reproductivo está mediado por TGF β Sma/Mab (Figuras R-20 y R-21). Los mutantes de TGF β Sma/Mab tienen un envejecimiento reproductivo desproporcionalmente menor al envejecimiento somático, en relación a otros mutantes longevos con restricción calórica o deficientes en la señalización por la ruta de Insulina¹³⁴. En este sentido, nuestros resultados de envejecimiento reproductivo y somático obtenidos con los mutantes *sma-10(ok2224)* apoyan esta disparidad entre ambos fenotipos. Asimismo,

Wang y colaboradores han descrito recientemente, que la inactivación de la mayoría de los genes implicados en el envejecimiento reproductivo que han estudiado puede aumentar la calidad de vida de los nematodos e incluso puede llegar a prolongarla²¹⁵. Además, en este estudio asociaron a algunos de estos genes con la vía de señalización TGF β Sma/Mab²¹⁵. Por lo tanto, tampoco podemos descartar que el mínimo efecto que pudiera tener SMA-10 en longevidad fuera consecuencia de su prolongado periodo reproductivo dependiente de TGF β Sma/Mab.

2.2. SMA-10 como modulador negativo de la ruta de Insulina

A pesar de que los mutantes *sma-10(ok2224)* mostraron una sensibilidad a *P. aeruginosa* similar a la de mutantes *dbl-1(nk3)*, los dobles mutantes *sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)* presentaron un fenotipo aditivo, más inmunocomprometido (Figura R-22B), lo que indicaba un papel de SMA-10 independiente a TGF β Sma/Mab en inmunidad. En este trabajo hemos profundizado en este fenotipo y se ha puesto de manifiesto que SMA-10 está involucrado en la señalización de la ruta de Insulina, como modulador de la respuesta inmune frente a *P. aeruginosa*. Los experimentos de epistasis, en los que se compara la supervivencia de animales que no expresan SMA-10 nativo con aquellos que además tienen el receptor de Insulina DAF-2 constitutivamente inactivo, muestran que ambos genes actúan en la misma ruta y que DAF-2 es epistático a SMA-10 (Figura R-25E). Al ser los mutantes *sma-10(ok2224)* más sensibles que la cepa silvestre y los mutantes del receptor DAF-2 más resistentes que los nematodos silvestres a la infección bacteriana^{29, 45, 205} (Figura R-25E), nuestra hipótesis es que SMA-10 inhibe la actividad de la ruta de insulina.

¿Existen muchos moduladores de DAF-2 descritos o es SMA-10 un caso particular? Hasta la fecha, en *C. elegans* se ha descrito que Klotho, el correceptor de FGFR, modula negativamente la actividad de DAF-2 para aumentar la longevidad de los nematodos²⁶. De forma similar, se ha descrito que VANG-1 (ortólogo de la proteína humana VANGL1), por un lado, requiere la interacción con FGFR para su función en la embriogénesis⁷⁷ y, por otro, reduce la longevidad de los nematodos a través de DAF-2⁸⁰. Estos trabajos ponen de manifiesto que proteínas como Klotho y VANG-1 son capaces de interactuar con diferentes tipos de receptores con actividad tirosina quinasa, como FGFR y DAF-2, como hipotetizamos que hace SMA-10 con TGF β Sma/Mab y DAF-2.

En humanos, LRIG1, LRIG2 y LRIG3 (ortólogos de SMA-10) actúan también como moduladores tanto positivos como negativos de receptores con actividad tirosina quinasa, como EGFR y FGFR¹⁸⁵, de forma análoga a la regulación de DAF-2 por parte de SMA-10 en *C. elegans* que describimos en este trabajo.

Aunque la función de SMA-10 como correceptor de DAF-2 parece ser análogamente posible, quisimos descartar que el aumento de la resistencia a *P. aeruginosa* de los mutantes *sma-10(ok2224);daf-2(e1370)* no se debiera a la interacción de SMA-10 con la ruta TGF β Sma/Mab. Para comprobarlo, se analizó la

sensibilidad de *dbl-1(nk3);daf-2(e1370)*. Como ya se había visto en otros estudios, en los que se analizaba la sensibilidad a *P. aeruginosa* de dobles mutantes entre DAF-2 y proteínas moduladoras de la inmunidad de otras rutas independientes a Insulina, como *fshr-1(ok778);daf-2(e1368)*¹⁶⁹ y *sek-1(km4);daf-2(e1370)*²⁰⁵, el doble mutante *dbl-1(nk3);daf-2(e1370)* fue más sensible que *daf-2(e1370)* (Figura 25F). Estos datos confirman que, en presencia de *P. aeruginosa*, las rutas TGFβ Sma/Mab e Insulina tienen una función independiente y refuerzan la idea de que el papel de SMA-10 en inmunidad frente a este patógeno depende de la ruta de Insulina.

La señalización de la ruta de Insulina comprende una cascada de fosforilaciones que comienza en el receptor DAF-2 y converge mayoritariamente en el factor de transcripción DAF-16^{48, 100, 202}. Sin embargo, los mutantes de *daf-16* no son sensibles a *P. aeruginosa*²⁰⁵ (Figura R-26A), pero, al eliminar DAF-16 en los mutantes *sma-10(ok2224)*, se observó que se comprometía aún más la resistencia a *P. aeruginosa* de *sma-10(ok2224)* (Figura R-26A). En concreto, la mayor sensibilidad de los dobles mutantes *sma-10(ok2224);daf-16(mu86)* (Figura R-26A) parece indicar que los mutantes *daf-16(mu86)* pudieran estar inmunocomprometidos frente a *P. aeruginosa*, pero esta sensibilidad no se hace patente hasta que no se elimina otro componente involucrado en la respuesta inmune, como SMA-10. Según nuestra hipótesis, SMA-10 modula negativamente la actividad de DAF-2 y esta inhibición del receptor activaría a DAF-16, que se translocaría al núcleo para regular la expresión génica. Entre los genes que se inducirían, se encuentra el propio SMA-10, ya que se ha descrito que su transcripción se activa en ausencia de DAF-2^{148, 230}, por lo que se originaría un bucle regulatorio positivo de la ruta de Insulina. En presencia de *P. aeruginosa*, se activa la señalización del receptor DAF-2, suprimiendo la respuesta inmune de *C. elegans* por parte de la vía de Insulina⁴⁵. En los mutantes *sma-10(ok2224)* expuestos a *P. aeruginosa*, la falta de SMA-10 contribuiría a la activación de DAF-2, aumentando la sensibilidad frente a este patógeno. Si, además, se elimina DAF-16, utilizando dobles mutantes *sma-10(ok2224);daf-16(mu86)*, el efecto de *P. aeruginosa* sería más acusado, lo cual está en concordancia con nuestras observaciones (Figura R-26A). Adicionalmente, como SMA-10 se expresa en el intestino⁸⁶ y DAF-16 es necesario en este tejido para combatir a este patógeno (a pesar de que no se observe una respuesta neta de los mutantes *daf-16(mu86)* a *P. aeruginosa* (Figura R-26A))⁴⁵, serían necesarios ensayos de inmunidad expresando específicamente en el intestino SMA-10 y DAF-16, para clarificar si ambas proteínas interactúan en una misma ruta de señalización.

Asimismo, también estudiamos el efecto de la sobreexpresión de DAF-16 sobre la resistencia a *P. aeruginosa* en los mutantes de SMA-10. Observamos que los mutantes *sma-10(ok2224);daf-16(zls356)* se comportaron como la cepa silvestre N2 frente a la infección por esta bacteria, y eran más sensibles que los transgénicos que sobreexpresaban DAF-16 (*daf-16(zls356)*). Sin embargo, no pudimos reproducir los resultados descritos por Singh y colaboradores, que observaron que la sobreexpresión de DAF-16 en la cepa *daf-16(zls356)* confiere resistencia frente a esta *P. aeruginosa*^{188, 189} (Figura R-26B). Por un lado, la

explicación más razonable es que, en nuestros experimentos, DAF-16 no sea funcionalmente activo, aunque esté sobreexpresado. Pero, por otro, como han descrito estos mismos autores, *daf-16(zls356)* podría tener un exceso de DAF-16 activo, lo que provoca una mayor susceptibilidad a infecciones por *P. aeruginosa*¹⁸⁹.

En conjunto, el efecto aditivo de los estudios de epistasia en los que se ha eliminado y sobreexpresado DAF-16 en *sma-10(ok2224)* sugeriría la existencia de bifurcaciones en la ruta de Insulina por debajo de su receptor DAF-2 (Figura D-3). La señalización a través de DAF-2 no se transmite exclusivamente a DAF-16, sino que hay otras proteínas involucradas en la defensa frente a este patógeno, capaces de regular la transcripción de forma independiente a DAF-16^{29, 45}. Evans y colaboradores observaron que, en respuesta a la infección por *P. aeruginosa*, se inducía a través de la ruta de Insulina, pero independientemente de DAF-16, un conjunto de proteínas con efecto antimicrobiano⁴⁵. Sin embargo, sólo propusieron algunos factores de transcripción como posibles mediadores de este efecto, como ELT-2 o SKN-1⁴⁵, que habría que analizar. Además, se ha descrito que la ubiquitina ligasa E3 WWP-1 actúa en la ruta de Insulina en paralelo a DAF-16 en la defensa frente a toxinas que forman poros en la membrana plasmática²⁹. Mutantes de WWP-1 mostraron también estar inmunocomprometidos frente a *P. aeruginosa*²⁹, por lo que la ausencia de SMA-10 podría estar fomentando la activación de DAF-2 y, por consiguiente, también la regulación negativa de WWP-1 u otros factores de transcripción, de forma independiente a DAF-16.

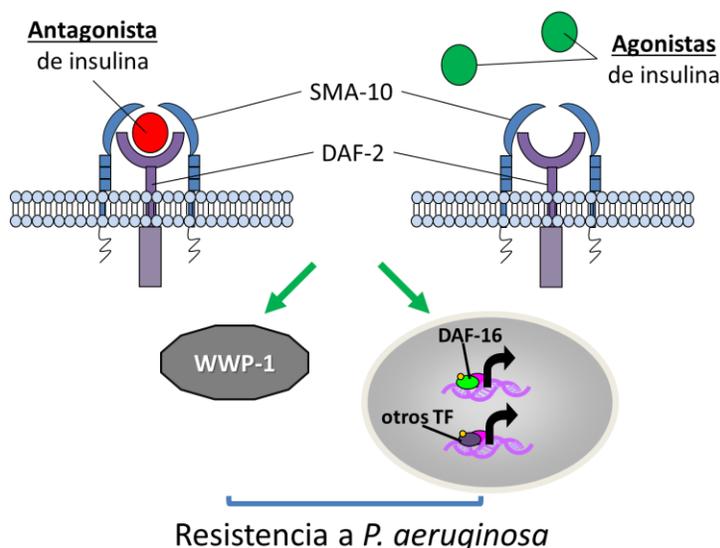


Figura D-3: Modelo de actuación de SMA-10 en la ruta de Insulina. Tras la exposición a *P. aeruginosa*, SMA-10 podría servir para estabilizar la unión de péptidos antagonistas de insulina al receptor DAF-2 o inhibir la unión de péptidos agonistas, para inhibir a DAF-2. La inactivación de DAF-2 fomentaría la resistencia a este patógeno mediante mecanismos dependientes e independientes de DAF-16.

Por otro lado, un par de trabajos han mostrado que *sma-10* se activa transcripcionalmente en ausencia de DAF-2 y a través de DAF-16^{148, 230}. Nuestros resultados muestran que los niveles de *sma-10* no varían significativamente en presencia de *P. aeruginosa* (Figura R-24), aunque sí se detecta una reducción a nivel de mRNA del 24%, que indicaría una tendencia al silenciamiento de *sma-10* (Figura R-24A). Como la

expresión de SMA-10 aumenta en mutantes DAF-2^{148, 230} y *P. aeruginosa* induce la activación de este receptor⁴⁵, esperaríamos observar una disminución estadísticamente significativa en la expresión de *sma-10*. Sin embargo, nuestros datos no están en concordancia con lo previamente descrito por otros grupos. Una posible explicación es que otras rutas, independientes a la de Insulina, estén activando la transcripción de SMA-10 en presencia de *P. aeruginosa*, lo que no nos permitiría observar cambios netos en la expresión de *sma-10* en nuestros ensayos. En este sentido, sería interesante estudiar si se induce la expresión de SMA-10 para combatir la infección de otros patógenos, que no tengan mecanismos de evasión a la respuesta inmune por la ruta de Insulina, como sucede con *P. aeruginosa*.

Sin embargo, que no hayamos detectado diferencias en la expresión de SMA-10 en presencia de *P. aeruginosa* (Figura R-24), aunque este correceptor sea necesario para combatir su infección (Figuras R-22B, R-25 y R-26), no tienen por qué ser resultados contradictorios. De hecho, que una ruta de señalización o un gen sean necesarios para combatir a un patógeno, no implica necesariamente su activación o inducción, al menos, durante una exposición corta. Como hemos observado en este trabajo, los mutantes de TGFβ Sma/Mab son más sensibles a *P. aeruginosa* que los nematodos silvestres (Figuras R-22B, R-25F), sin embargo, la presencia de este patógeno no induce su activación (Figura R-24A).

SMA-10 se expresa en intestino, hipodermis y faringe⁶⁴. Cuando restauramos su expresión en los mutantes *sma-10(ok2224)* en intestino o en hipodermis, se rescató completamente la inmunosupresión frente a *P. aeruginosa*, mientras que su expresión en faringe sólo produjo una recuperación parcial (Figura R-23). La recuperación de la resistencia por la expresión de SMA-10 en intestino o hipodermis apoya nuestra hipótesis de que SMA-10 interacciona con la ruta de insulina en su función en inmunidad, ya que tanto DAF-2 como DAF-16 se expresan en estos tejidos^{72, 86, 105, 120}. Sin embargo, la recuperación parcial de la capacidad inmunoprotectora que se observa cuando se expresa SMA-10 en faringe parece ser independiente a esta ruta, porque ni DAF-2 ni DAF-16 parecen localizarse en este tejido^{72, 86, 105, 120}. Además, no podemos obviar que SMA-10 está compuesta en su región extracelular por repeticiones ricas en leucinas^{38, 64}, por lo que tampoco se podría descartar que estuviera involucrada en el reconocimiento de agentes patógenos, como proponen otros autores para proteínas con este tipo de dominios^{41, 169, 170}.

CONCLUSIONES

1. Los mRNAs correspondientes al ligando y receptor de la ruta de TGF β Sma/Mab de *Caenorhabditis elegans*, DBL-1 y SMA-6 respectivamente, el mRNA del receptor de TGF β Dauer DAF-1, así como el del receptor compartido por ambas rutas DAF-4, son regulados negativamente a través de sus 3'UTRs por la familia de *mir-58*. De esta manera, las rutas TGF β Sma/Mab y Dauer están inducidas en los mutantes de la familia de *mir-58*.
2. A pesar de que la familia de *mir-58* actúa como promotora del tamaño corporal de los nematodos, también regula negativamente el tamaño mediado por TGF β Sma/Mab, al menos, a través del 3'UTR de *sma-6*.
3. La familia de *mir-58* modula positivamente la entrada en dauer de los nematodos a través de TGF β Dauer, de tal manera que los mutantes de esta familia de miRNAs son defectivos en dauer por la sobreexpresión de, al menos, *daf-1* y *daf-4*.
4. Los mutantes defectivos de la ruta TGF β Sma/Mab presentan una expresión menor de *mir-58* y *mir-80* en el estadio L4, que, en el caso de *mir-58*, se produce a nivel transcripcional.
5. SMA-10 es un modulador facultativo de TGF β Sma/Mab, actuando sobre los fenotipos de tamaño y envejecimiento reproductivo. En cambio, no contribuye significativamente al fenotipo de longevidad a través de TGF β Sma/Mab.
6. SMA-10 tiene un papel inmunoprotector independiente de la ruta TGF β Sma/Mab, actuando corriente arriba del receptor de la ruta de Insulina, DAF-2. La expresión de *sma-10* en intestino o hipodermis, pero no en faringe, es capaz de reconstituir dicha función inmunoprotectora en mutantes de *sma-10*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ailion, M. and Thomas, J.H., *Dauer formation induced by high temperatures in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2000. **156**(3): p. 1047-67.
2. Almeida, M.I., Reis, R.M., and Calin, G.A., *MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers*. Mutat Res, 2011. **717**(1-2): p. 1-8.
3. Altun, Z.F., Hall, D.H., *Epithelial system, hypodermis.*, in *WormAtlas*. 2009.
4. Altun, Z.F., Hall, D.H., *Introduction*, in *WormAtlas*. 2009.
5. Alvarez-Saavedra, E. and Horvitz, H.R., *Many families of C. elegans microRNAs are not essential for development or viability*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. 367-73.
6. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-8.
7. Andersen, C.L., Jensen, J.L., and Orntoft, T.F., *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
8. Antebi, A., et al., *daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the dauer diapause and developmental age in C. elegans*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1512-27.
9. Bargmann, C.I., *Chemosensation in C. elegans*. WormBook, 2006: p. 1-29.
10. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
11. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
12. Baugh, L.R., *To grow or not to grow: nutritional control of development during Caenorhabditis elegans L1 arrest*. Genetics, 2013. **194**(3): p. 539-55.
13. Betel, D., et al., *Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites*. Genome Biol, 2010. **11**(8): p. R90.
14. Betel, D., et al., *The microRNA.org resource: targets and expression*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D149-53.
15. Blahna, M.T. and Hata, A., *Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis*. FEBS Lett, 2012. **586**(14): p. 1906-12.
16. Blaxter, M., *Nematodes: the worm and its relatives*. PLoS Biol, 2011. **9**(4): p. e1001050.
17. Boulan, L., Martin, D., and Milan, M., *bantam miRNA promotes systemic growth by connecting insulin signaling and ecdysone production*. Curr Biol, 2013. **23**(6): p. 473-8.
18. Boulias, K. and Horvitz, H.R., *The C. elegans microRNA mir-71 acts in neurons to promote germline-mediated longevity through regulation of DAF-16/FOXO*. Cell Metab, 2012. **15**(4): p. 439-50.
19. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
20. Brenner, J.L., et al., *Loss of individual microRNAs causes mutant phenotypes in sensitized genetic backgrounds in C. elegans*. Curr Biol, 2010. **20**(14): p. 1321-5.
21. Brenner, J.L., Kemp, B.J., and Abbott, A.L., *The mir-51 family of microRNAs functions in diverse regulatory pathways in Caenorhabditis elegans*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37185.
22. Brenner, S., *The genetics of Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974. **77**(1): p. 71-94.
23. Butz, H., et al., *Crosstalk between TGF-beta signaling and the microRNA machinery*. Trends Pharmacol Sci, 2012. **33**(7): p. 382-93.
24. Clark, J.F., Almonte, V., & Savage-Dunn, C., *Regulation of Metabolism by TGF-b Signaling in C. elegans*, in *International Worm Meeting*. 2013.
25. Chang, C., Sternberg, P.W., *C. elegans vulval development as a model system to study the cancer biology of EGFR signaling*. Cancer Metastasis Rev., 1999. **18**(2): p. 203-213.
26. Chateau, M.T., et al., *Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in Caenorhabditis elegans*. Aging (Albany NY), 2010. **2**(9): p. 567-81.

27. Chatterjee, S., et al., *Target-mediated protection of endogenous microRNAs in C. elegans*. Dev Cell, 2011. **20**(3): p. 388-96.
28. Chatterjee, S. and Grosshans, H., *Active turnover modulates mature microRNA activity in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2009. **461**(7263): p. 546-9.
29. Chen, C.S., et al., *WWP-1 is a novel modulator of the DAF-2 insulin-like signaling network involved in pore-forming toxin cellular defenses in Caenorhabditis elegans*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9494.
30. da Graca, L.S., et al., *DAF-5 is a Ski oncoprotein homolog that functions in a neuronal TGF beta pathway to regulate C. elegans dauer development*. Development, 2004. **131**(2): p. 435-46.
31. Dalfo, D., Michaelson, D., and Hubbard, E.J., *Sensory regulation of the C. elegans germline through TGF-beta-dependent signaling in the niche*. Curr Biol, 2012. **22**(8): p. 712-9.
32. Davis-Dusenbery, B.N., et al., *down-regulation of Kruppel-like factor-4 (KLF4) by microRNA-143/145 is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein 4*. J Biol Chem, 2011. **286**(32): p. 28097-110.
33. Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A., *Smad-mediated miRNA processing: a critical role for a conserved RNA sequence*. RNA Biol, 2011. **8**(1): p. 71-6.
34. Davis, B.N., et al., *SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 56-61.
35. Davis, B.N., et al., *Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha*. Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 373-84.
36. de Lencastre, A., et al., *MicroRNAs both promote and antagonize longevity in C. elegans*. Curr Biol, 2010. **20**(24): p. 2159-68.
37. Dogini, D.B., et al., *The new world of RNAs*. Genet Mol Biol, 2014. **37**(1 Suppl): p. 285-93.
38. Dolan, J., et al., *The extracellular leucine-rich repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 320.
39. Ebert, M.S. and Sharp, P.A., *Emerging roles for natural microRNA sponges*. Curr Biol, 2010. **20**(19): p. R858-61.
40. Ecsedi, M. and Grosshans, H., *LIN-41/TRIM71: emancipation of a miRNA target*. Genes Dev. **27**(6): p. 581-9.
41. Engelmann, I. and Pujol, N., *Innate immunity in C. elegans*. Adv Exp Med Biol, 2010. **708**: p. 105-21.
42. Enright, A.J., et al., *MicroRNA targets in Drosophila*. Genome Biol, 2003. **5**(1): p. R1.
43. Essers, M.A., et al., *Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling*. Science, 2005. **308**(5725): p. 1181-4.
44. Estevez, M., et al., *The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling C. elegans dauer larva development*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 644-9.
45. Evans, E.A., Kawli, T., and Tan, M.W., *Pseudomonas aeruginosa suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in Caenorhabditis elegans*. PLoS Pathog, 2008. **4**(10): p. e1000175.
46. Evans, T.A., Haridas, H., and Duffy, J.B., *Kekkon5 is an extracellular regulator of BMP signaling*. Dev Biol, 2009. **326**(1): p. 36-46.
47. Fernando, T., et al., *C. elegans ADAMTS ADT-2 regulates body size by modulating TGFbeta signaling and cuticle collagen organization*. Dev Biol, 2011. **352**(1): p. 92-103.
48. Fielenbach, N. and Antebi, A., *C. elegans dauer formation and the molecular basis of plasticity*. Genes Dev, 2008. **22**(16): p. 2149-65.
49. Flemming, A.J., et al., *Somatic polyploidization and cellular proliferation drive body size evolution in nematodes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5285-90.

50. Fortunato, A. and Fraser, A.G., *Uncover genetic interactions in Caenorhabditis elegans by RNA interference*. Biosci Rep, 2005. **25**(5-6): p. 299-307.
51. Friedlander, M.R., et al., *Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(4): p. 407-15.
52. Fujiwara, M., Sengupta, P., and McIntire, S.L., *Regulation of body size and behavioral state of C. elegans by sensory perception and the EGL-4 cGMP-dependent protein kinase*. Neuron, 2002. **36**(6): p. 1091-102.
53. Fujiwara, M., et al., *A novel zf-MYND protein, CHB-3, mediates guanylyl cyclase localization to sensory cilia and controls body size of Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2010. **6**(11): p. e1001211.
54. Fung, W.Y., et al., *crm-1 facilitates BMP signaling to control body size in Caenorhabditis elegans*. Dev Biol, 2007. **311**(1): p. 95-105.
55. Furuyama, T., et al., *Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 2): p. 629-34.
56. Georgi, L.L., Albert, P.S., and Riddle, D.L., *daf-1, a C. elegans gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase*. Cell, 1990. **61**(4): p. 635-45.
57. Gilleard, J.S., Barry, J.D., and Johnstone, I.L., *cis regulatory requirements for hypodermal cell-specific expression of the Caenorhabditis elegans cuticle collagen gene dpy-7*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(4): p. 2301-11.
58. Gleason, R.J., et al., *BMP signaling requires retromer-dependent recycling of the type I receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(7): p. 2578-83.
59. Gordon, K.J. and Blobel, G.C., *Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1782**(4): p. 197-228.
60. Greer, E.R., et al., *Neural and molecular dissection of a C. elegans sensory circuit that regulates fat and feeding*. Cell Metab, 2008. **8**(2): p. 118-31.
61. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
62. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D154-8.
63. Grosswendt, S., et al., *Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions*. Mol Cell, 2014. **54**(6): p. 1042-54.
64. Gumienny, T.L., et al., *Caenorhabditis elegans SMA-10/LRIG is a conserved transmembrane protein that enhances bone morphogenetic protein signaling*. PLoS Genet, 2010. **6**(5): p. e1000963.
65. Gumienny, T.L., et al., *Glypican LON-2 is a conserved negative regulator of BMP-like signaling in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2007. **17**(2): p. 159-64.
66. Gumienny, T.L. and Savage-Dunn, C., *TGF-beta signaling in C. elegans*. WormBook, 2013: p. 1-34.
67. Gunther, C.V., Georgi, L.L., and Riddle, D.L., *A Caenorhabditis elegans type I TGF beta receptor can function in the absence of type II kinase to promote larval development*. Development, 2000. **127**(15): p. 3337-47.
68. Hammell, M., et al., *mirWIP: microRNA target prediction based on microRNA-containing ribonucleoprotein-enriched transcripts*. Nat Methods, 2008. **5**(9): p. 813-9.
69. Hausser, J., et al., *MirZ: an integrated microRNA expression atlas and target prediction resource*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W266-72.
70. Hedman, H. and Henriksson, R., *LRIG inhibitors of growth factor signalling - double-edged swords in human cancer?* Eur J Cancer, 2007. **43**(4): p. 676-82.

71. Heikkinen, L., Kolehmainen, M., and Wong, G., *Prediction of microRNA targets in Caenorhabditis elegans using a self-organizing map*. Bioinformatics, 2011. **27**(9): p. 1247-54.
72. Henderson, S.T. and Johnson, T.E., *daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2001. **11**(24): p. 1975-80.
73. Herranz, H., Hong, X., and Cohen, S.M., *Mutual repression by bantam miRNA and Capicua links the EGFR/MAPK and Hippo pathways in growth control*. Curr Biol, 2012. **22**(8): p. 651-7.
74. Hipfner, D.R., Weigmann, K., and Cohen, S.M., *The bantam gene regulates Drosophila growth*. Genetics, 2002. **161**(4): p. 1527-37.
75. Hirose, T., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase EGL-4 controls body size and lifespan in C elegans*. Development, 2003. **130**(6): p. 1089-99.
76. Ho, S.N., et al., *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene, 1989. **77**(1): p. 51-9.
77. Hoffmann, M., et al., *Intestinal tube formation in Caenorhabditis elegans requires vang-1 and egl-15 signaling*. Dev Biol, 2010. **339**(2): p. 268-79.
78. Honda, Y. and Honda, S., *The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in Caenorhabditis elegans*. FASEB J, 1999. **13**(11): p. 1385-93.
79. Hong, E. and Reddi, A.H., *Dedifferentiation and redifferentiation of articular chondrocytes from surface and middle zones: changes in microRNAs-221/-222, -140, and -143/145 expression*. Tissue Eng Part A, 2013. **19**(7-8): p. 1015-22.
80. Honnen, S.J., et al., *C. elegans VANG-1 modulates life span via insulin/IGF-1-like signaling*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32183.
81. Hsieh, W.J., et al., *Investigating microRNA-target interaction-supported tissues in human cancer tissues based on miRNA and target gene expression profiling*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95697.
82. Hsu, S.D., et al., *miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions*. Nucleic Acids Res, 2013. **42**(Database issue): p. D78-85.
83. Hu, P.J., *Dauer*. WormBook, 2007: p. 1-19.
84. Huang, L.S. and Sternberg, P.W., *Genetic dissection of developmental pathways*. WormBook, 2006: p. 1-19.
85. Hung, W.L., et al., *A Caenorhabditis elegans developmental decision requires insulin signaling-mediated neuron-intestine communication*. Development, 2014. **141**(8): p. 1767-79.
86. Hunt-Newbury, R., et al., *High-throughput in vivo analysis of gene expression in Caenorhabditis elegans*. PLoS Biol, 2007. **5**(9): p. e237.
87. Ibanez-Ventoso, C., Vora, M., and Driscoll, M., *Sequence relationships among C. elegans, D. melanogaster and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2818.
88. Inoue, T. and Thomas, J.H., *Suppressors of transforming growth factor-beta pathway mutants in the Caenorhabditis elegans dauer formation pathway*. Genetics, 2000. **156**(3): p. 1035-46.
89. Inoue, T. and Thomas, J.H., *Targets of TGF-beta signaling in Caenorhabditis elegans dauer formation*. Dev Biol, 2000. **217**(1): p. 192-204.
90. Irazoqui, J.E., et al., *Role for beta-catenin and HOX transcription factors in Caenorhabditis elegans and mammalian host epithelial-pathogen interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17469-74.

91. Isik, M., Korswagen, H.C., and Berezikov, E., *Expression patterns of intronic microRNAs in Caenorhabditis elegans*. Silence, 2010. **1**(1): p. 5.
92. Jacobsen, A., et al., *Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(11): p. 1325-32.
93. Jan, C.H., et al., *Formation, regulation and evolution of Caenorhabditis elegans 3'UTRs*. Nature, 2010. **469**(7328): p. 97-101.
94. Jensen, V.L., et al., *Localization of a guanylyl cyclase to chemosensory cilia requires the novel ciliary MYND domain protein DAF-25*. PLoS Genet, 2010. **6**(11): p. e1001199.
95. Jiang, N., et al., *The microRNA bantam regulates a developmental transition in epithelial cells that restricts sensory dendrite growth*. Development, 2014. **141**(13): p. 2657-68.
96. Jimenez-Hidalgo, M., et al., *Functional characterization of thioredoxin 3 (TRX-3), a Caenorhabditis elegans intestine-specific thioredoxin*. Free Radic Biol Med, 2014. **68**: p. 205-19.
97. John, B., et al., *Human MicroRNA targets*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e363.
98. Jovanovic, M., et al., *RIP-chip-SRM--a new combinatorial large-scale approach identifies a set of translationally regulated bantam/miR-58 targets in C. elegans*. Genome Res, 2012. **22**(7): p. 1360-71.
99. Jovanovic, M., et al., *A quantitative targeted proteomics approach to validate predicted microRNA targets in C. elegans*. Nat Methods, 2010. **7**(10): p. 837-42.
100. Kaletsky, R. and Murphy, C.T., *The role of insulin/IGF-like signaling in C. elegans longevity and aging*. Dis Model Mech, 2010. **3**(7-8): p. 415-9.
101. Karp, X., et al., *Effect of life history on microRNA expression during C. elegans development*. RNA, 2011. **17**(4): p. 639-51.
102. Kartha, R.V. and Subramanian, S., *Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation*. Front Genet, 2014. **5**: p. 8.
103. Kato, M., et al., *Dynamic expression of small non-coding RNAs, including novel microRNAs and piRNAs/21U-RNAs, during Caenorhabditis elegans development*. Genome Biol, 2009. **10**(5): p. R54.
104. Kaufman, E.J. and Miska, E.A., *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(7): p. 728-37.
105. Kimura, K.D., Riddle, D.L., and Ruvkun, G., *The C. elegans DAF-2 insulin-like receptor is abundantly expressed in the nervous system and regulated by nutritional status*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. **76**: p. 113-20.
106. Kirienko, N.V., Mani, K., and Fay, D.S., *Cancer models in Caenorhabditis elegans*. Dev Dyn, 2010. **239**(5): p. 1413-48.
107. Kishore, S., et al., *A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins*. Nat Methods, 2011. **8**(7): p. 559-64.
108. Kobe, B. and Kajava, A.V., *The leucine-rich repeat as a protein recognition motif*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(6): p. 725-32.
109. Korzelius, J., et al., *C. elegans MCM-4 is a general DNA replication and checkpoint component with an epidermis-specific requirement for growth and viability*. Dev Biol, 2010. **350**(2): p. 358-69.
110. Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
111. Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., *miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D68-73.
112. Kratsios, P., et al., *Coordinated regulation of cholinergic motor neuron traits through a conserved terminal selector gene*. Nat Neurosci, 2011. **15**(2): p. 205-14.
113. Krishna, S., Maduzia, L.L., and Padgett, R.W., *Specificity of TGFbeta signaling is conferred by distinct type I receptors and their associated SMAD proteins in Caenorhabditis elegans*. Development, 1999. **126**(2): p. 251-60.

114. Kurz, C.L. and Tan, M.W., *Regulation of aging and innate immunity in C. elegans*. Aging Cell, 2004. **3**(4): p. 185-93.
115. Lall, S., et al., *A genome-wide map of conserved microRNA targets in C. elegans*. Curr Biol, 2006. **16**(5): p. 460-71.
116. Lee, H.O., Davidson, J.M., and Duronio, R.J., *Endoreplication: polyploidy with purpose*. Genes Dev, 2009. **23**(21): p. 2461-77.
117. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V., *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
118. Leroy, M., et al., *Pathogen-induced Caenorhabditis elegans developmental plasticity has a hormetic effect on the resistance to biotic and abiotic stresses*. BMC Evol Biol, 2012. **12**: p. 187.
119. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P., *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
120. Li, F., et al., *Hc-daf-2 encodes an insulin-like receptor kinase in the barber's pole worm, Haemonchus contortus, and restores partial dauer regulation*. Int J Parasitol, 2014. **44**(7): p. 485-96.
121. Li, J.H., et al., *starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data*. Nucleic Acids Res, 2013. **42**(Database issue): p. D92-7.
122. Li, W., Kennedy, S.G., and Ruvkun, G., *daf-28 encodes a C. elegans insulin superfamily member that is regulated by environmental cues and acts in the DAF-2 signaling pathway*. Genes Dev, 2003. **17**(7): p. 844-58.
123. Liang, J., et al., *Transcriptional repressor and activator activities of SMA-9 contribute differentially to BMP-related signaling outputs*. Dev Biol, 2007. **305**(2): p. 714-25.
124. Libina, N., Berman, J.R., and Kenyon, C., *Tissue-specific activities of C. elegans DAF-16 in the regulation of lifespan*. Cell, 2003. **115**(4): p. 489-502.
125. Lim, L.P., et al., *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. Genes Dev, 2003. **17**(8): p. 991-1008.
126. Liu, H., et al., *Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 51.
127. Liu, J., Yang, B., and Ai, J., *Advance in research of microRNA in Caenorhabditis elegans*. Journal of cellular biochemistry, 2013. **114**(5): p. 994-1000.
128. Liu, O.W. and Shen, K., *The transmembrane LRR protein DMA-1 promotes dendrite branching and growth in C. elegans*. Nat Neurosci, 2011. **15**(1): p. 57-63.
129. Liu, T., Zimmerman, K.K., and Patterson, G.I., *Regulation of signaling genes by TGFbeta during entry into dauer diapause in C. elegans*. BMC Dev Biol, 2004. **4**: p. 11.
130. Long, X. and Miano, J.M., *Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30119-29.
131. Lozano, E., et al., *Regulation of growth by ploidy in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2006. **16**(5): p. 493-8.
132. Lucanic, M., et al., *Age-related micro-RNA abundance in individual C. elegans*. Aging (Albany NY), 2013. **5**(6): p. 394-411.
133. Luo, S., et al., *TGF-beta and insulin signaling regulate reproductive aging via oocyte and germline quality maintenance*. Cell, 2010. **143**(2): p. 299-312.
134. Luo, S., et al., *TGF-beta Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging*. PLoS Genet, 2009. **5**(12): p. e1000789.
135. Maduzia, L.L., et al., *lon-1 regulates Caenorhabditis elegans body size downstream of the dbl-1 TGF beta signaling pathway*. Dev Biol, 2002. **246**(2): p. 418-28.

136. Mallo, G.V., et al., *Inducible antibacterial defense system in C. elegans*. *Curr Biol*, 2002. **12**(14): p. 1209-14.
137. Martinez-Sanchez, A. and Murphy, C.L., *MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches*. *Biology (Basel)*, 2013. **2**(1): p. 189-205.
138. Martinez, N.J., et al., *Genome-scale spatiotemporal analysis of Caenorhabditis elegans microRNA promoter activity*. *Genome Res*, 2008. **18**(12): p. 2005-15.
139. Massague, J., *TGFbeta signalling in context*. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2012. **13**(10): p. 616-30.
140. McGhee, J.D., et al., *Production of null mutants in the major intestinal esterase gene (ges-1) of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1990. **125**(3): p. 505-14.
141. Mello, C. and Fire, A., *DNA transformation*. *Methods Cell Biol*, 1995. **48**: p. 451-82.
142. Mello, C.C., et al., *Efficient gene transfer in C.elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences*. *EMBO J*, 1991. **10**(12): p. 3959-70.
143. Milward, K., et al., *Neuronal and molecular substrates for optimal foraging in Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(51): p. 20672-7.
144. Miska, E.A., et al., *Most Caenorhabditis elegans microRNAs are individually not essential for development or viability*. *PLoS Genet*, 2007. **3**(12): p. e215.
145. Mochii, M., et al., *Identification of transforming growth factor-beta- regulated genes in caenorhabditis elegans by differential hybridization of arrayed cDNAs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(26): p. 15020-5.
146. Morita, K., Chow, K.L., and Ueno, N., *Regulation of body length and male tail ray pattern formation of Caenorhabditis elegans by a member of TGF-beta family*. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1337-47.
147. Morita, K., et al., *A Caenorhabditis elegans TGF-beta, DBL-1, controls the expression of LON-1, a PR-related protein, that regulates polyploidization and body length*. *EMBO J*, 2002. **21**(5): p. 1063-73.
148. Murphy, C.T., et al., *Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2003. **424**(6946): p. 277-83.
149. Naito, Y., et al., *MicroRNA-143 regulates collagen type III expression in stromal fibroblasts of scirrhous type gastric cancer*. *Cancer Sci*, 2014. **105**(2): p. 228-35.
150. Nakano, Y., Nagamatsu, Y., and Ohshima, Y., *cGMP and a germ-line signal control body size in C. elegans through cGMP-dependent protein kinase EGL-4*. *Genes Cells*, 2004. **9**(9): p. 773-9.
151. Narasimhan, S.D., et al., *PDP-1 links the TGF-beta and IIS pathways to regulate longevity, development, and metabolism*. *PLoS Genet*, 2011. **7**(4): p. e1001377.
152. Nolan, K.M., et al., *The DAF-7 TGF-beta signaling pathway regulates chemosensory receptor gene expression in C. elegans*. *Genes Dev*, 2002. **16**(23): p. 3061-73.
153. Oh, H. and Irvine, K.D., *Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam*. *Dev Cell*, 2011. **20**(1): p. 109-22.
154. Okkema, P.G., et al., *Sequence requirements for myosin gene expression and regulation in Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 1993. **135**(2): p. 385-404.
155. Ottley, E. and Gold, E., *microRNA and non-canonical TGF-beta signalling: Implications for prostate cancer therapy*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2014.
156. Padua, D. and Massague, J., *Roles of TGFbeta in metastasis*. *Cell Res*, 2009. **19**(1): p. 89-102.
157. Pagano, D.J., Kingston, E.R., and Kim, D.H., *Tissue expression pattern of PMK-2 p38 MAPK is established by the miR-58 family in C. elegans*. *PLoS Genet*, 2015. **11**(2): p. e1004997.
158. Park, D., Estevez, A., and Riddle, D.L., *Antagonistic Smad transcription factors control the dauer/non-dauer switch in C. elegans*. *Development*, 2010. **137**(3): p. 477-85.

159. Park, D., et al., *Repression of a potassium channel by nuclear hormone receptor and TGF-beta signaling modulates insulin signaling in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2012. **8**(2): p. e1002519.
160. Pasquinelli, A.E., *MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship*. Nature reviews. Genetics, 2012. **13**(4): p. 271-82.
161. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
162. Patel, M.N., et al., *Evolution of germ-line signals that regulate growth and aging in nematodes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 769-74.
163. Patterson, G.I., et al., *The DAF-3 Smad protein antagonizes TGF-beta-related receptor signaling in the Caenorhabditis elegans dauer pathway*. Genes Dev, 1997. **11**(20): p. 2679-90.
164. Peterson, S.M., et al., *Common features of microRNA target prediction tools*. Front Genet, 2014. **5**: p. 23.
165. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L., *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(9): p. e36.
166. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1608-13.
167. Portal-Celhay, C., Bradley, E.R., and Blaser, M.J., *Control of intestinal bacterial proliferation in regulation of lifespan in Caenorhabditis elegans*. BMC Microbiol, 2012. **12**: p. 49.
168. Powell, J.R. and Ausubel, F.M., *Models of Caenorhabditis elegans infection by bacterial and fungal pathogens*. Methods Mol Biol, 2008. **415**: p. 403-27.
169. Powell, J.R., Kim, D.H., and Ausubel, F.M., *The G protein-coupled receptor FSHR-1 is required for the Caenorhabditis elegans innate immune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2782-7.
170. Pujol, N., et al., *A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in Caenorhabditis elegans*. Curr Biol, 2001. **11**(11): p. 809-21.
171. Raizen, D.M., Lee, R.Y., and Avery, L., *Interacting genes required for pharyngeal excitation by motor neuron MC in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1995. **141**(4): p. 1365-82.
172. Ramakrishnan, K. and Okkema, P.G., *Regulation of C. elegans neuronal differentiation by the ZEB-family factor ZAG-1 and the NK-2 homeodomain factor CEH-28*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e113893.
173. Ramakrishnan, K., Ray, P., and Okkema, P.G., *CEH-28 activates dbl-1 expression and TGF-beta signaling in the C. elegans M4 neuron*. Dev Biol, 2014. **390**(2): p. 149-59.
174. Ren, P., et al., *Control of C. elegans larval development by neuronal expression of a TGF-beta homolog*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1389-91.
175. Roberts, A.F., et al., *Regulation of genes affecting body size and innate immunity by the DBL-1/BMP-like pathway in Caenorhabditis elegans*. BMC Dev Biol, 2010. **10**: p. 61.
176. Samuelson, A.V., et al., *Identification of Caenorhabditis elegans genes regulating longevity using enhanced RNAi-sensitive strains*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2007. **72**: p. 489-97.
177. Santibanez, J.F., Quintanilla, M., and Bernabeu, C., *TGF-beta/TGF-beta receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2011. **121**(6): p. 233-51.
178. Savage, C., et al., *Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 790-4.
179. Schackwitz, W.S., Inoue, T., and Thomas, J.H., *Chemosensory neurons function in parallel to mediate a pheromone response in C. elegans*. Neuron, 1996. **17**(4): p. 719-28.
180. Seitz, H., *Redefining microRNA targets*. Curr Biol, 2009. **19**(10): p. 870-3.

181. Sha, K. and Fire, A., *Imprinting capacity of gamete lineages in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 2005. **170**(4): p. 1633-52.
182. Shaham, S., *Methods in Cell Biology*, in *Wormbook*. 2006, The C. elegans Research Community.
183. Shaw, W.M., et al., *The C. elegans TGF-beta Dauer pathway regulates longevity via insulin signaling*. Curr Biol, 2007. **17**(19): p. 1635-45.
184. Shivers, R.P., Youngman, M.J., and Kim, D.H., *Transcriptional responses to pathogens in Caenorhabditis elegans*. Curr Opin Microbiol, 2008. **11**(3): p. 251-6.
185. Simion, C., Cedano-Prieto, M.E., and Sweeney, C., *The LRIG family: enigmatic regulators of growth factor receptor signaling*. Endocr Relat Cancer, 2014. **21**(6): p. R431-43.
186. Simmer, F., et al., *Genome-wide RNAi of C. elegans using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions*. PLoS Biol, 2003. **1**(1): p. E12.
187. Simonsen, K.T., et al., *Strength in numbers: "Omics" studies of C. elegans innate immunity*. Virulence, 2012. **3**(6): p. 477-84.
188. Singh, V. and Aballay, A., *Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for Caenorhabditis elegans immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(35): p. 13092-7.
189. Singh, V. and Aballay, A., *Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2009. **284**(51): p. 35580-7.
190. So, S., et al., *Control of lifespan by food bacteria, nutrient limitation and pathogenicity of food in C. elegans*. Mech Ageing Dev, 2011. **132**(4): p. 210-2.
191. Spencer, W.C., et al., *A spatial and temporal map of C. elegans gene expression*. Genome Res, 2011. **21**(2): p. 325-41.
192. Sulston, J., Hodgkin, J., *Methods*, in *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Wood, W., Editor. 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. p. 587-606.
193. Suzuki, Y., et al., *A BMP homolog acts as a dose-dependent regulator of body size and male tail patterning in Caenorhabditis elegans*. Development, 1999. **126**(2): p. 241-50.
194. Tain, L.S., et al., *Dietary regulation of hypodermal polyploidization in C. elegans*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 28.
195. Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S., and Ausubel, F.M., *Killing of Caenorhabditis elegans by Pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 715-20.
196. Teichmann, S.A. and Chothia, C., *Immunoglobulin superfamily proteins in Caenorhabditis elegans*. J Mol Biol, 2000. **296**(5): p. 1367-83.
197. Tenor, J.L. and Aballay, A., *A conserved Toll-like receptor is required for Caenorhabditis elegans innate immunity*. EMBO Rep, 2008. **9**(1): p. 103-9.
198. Than, M.T., Kudlow, B.A., and Han, M., *Functional analysis of neuronal microRNAs in Caenorhabditis elegans dauer formation by combinational genetics and Neuronal miRISC immunoprecipitation*. PLoS Genet, 2013. **9**(6): p. e1003592.
199. Thomas, J.H., Birnby, D.A., and Vowels, J.J., *Evidence for parallel processing of sensory information controlling dauer formation in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1993. **134**(4): p. 1105-17.
200. Thomas, M., Lieberman, J., and Lal, A., *Desperately seeking microRNA targets*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(10): p. 1169-74.
201. Tian, C., et al., *The RGM protein DRAG-1 positively regulates a BMP-like signaling pathway in Caenorhabditis elegans*. Development, 2010. **137**(14): p. 2375-84.
202. Tissenbaum, H.A., *Genetics, life span, health span, and the aging process in Caenorhabditis elegans*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2012. **67**(5): p. 503-10.
203. Tomaselli, S., et al., *ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): p. 22796-816.

204. Toscano-Garibay, J.D. and Aquino-Jarquín, G., *Transcriptional regulation mechanism mediated by miRNA-DNA*DNA triplex structure stabilized by Argonaute*. Biochim Biophys Acta, 2014.
205. Troemel, E.R., et al., *p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in C. elegans*. PLoS Genet, 2006. **2**(11): p. e183.
206. Turner, M.J., Jiao, A.L., and Slack, F.J., *Autoregulation of lin-4 microRNA transcription by RNA activation (RNAa) in C. elegans*. Cell Cycle, 2014. **13**(5): p. 772-81.
207. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
208. Vashlishan, A.B., et al., *An RNAi screen identifies genes that regulate GABA synapses*. Neuron, 2008. **58**(3): p. 346-61.
209. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A., *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
210. Vogel, C., Teichmann, S.A., and Chothia, C., *The immunoglobulin superfamily in Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans and the evolution of complexity*. Development, 2003. **130**(25): p. 6317-28.
211. Vora, M., et al., *Deletion of microRNA-80 activates dietary restriction to extend C. elegans healthspan and lifespan*. PLoS Genet, 2013. **9**(8): p. e1003737.
212. Vowels, J.J. and Thomas, J.H., *Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1992. **130**(1): p. 105-23.
213. Wakefield, L.M. and Hill, C.S., *Beyond TGFbeta: roles of other TGFbeta superfamily members in cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(5): p. 328-41.
214. Wang, J., Tokarz, R., and Savage-Dunn, C., *The expression of TGFbeta signal transducers in the hypodermis regulates body size in C. elegans*. Development, 2002. **129**(21): p. 4989-98.
215. Wang, M.C., et al., *Gene pathways that delay Caenorhabditis elegans reproductive senescence*. PLoS Genet, 2014. **10**(12): p. e1004752.
216. Wang, Y., et al., *Understanding the mechanism of the dormant dauer formation of C. elegans: from genetics to biochemistry*. IUBMB Life, 2009. **61**(6): p. 607-12.
217. Warf, M.B., Johnson, W.E., and Bass, B.L., *Improved annotation of C. elegans microRNAs by deep sequencing reveals structures associated with processing by Drosha and Dicer*. RNA, 2011. **17**(4): p. 563-77.
218. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G., *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
219. Wolkow, C.A., Hall, D.H., *The Dauer Cuticle*, in Wormatlas. 2011.
220. Wu, E., et al., *Pervasive and cooperative deadenylation of 3'UTRs by embryonic microRNA families*. Mol Cell, 2010. **40**(4): p. 558-70.
221. Wu, M.Y. and Hill, C.S., *Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis*. Dev Cell, 2009. **16**(3): p. 329-43.
222. Xue, Y., et al., *Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits*. Cell, 2013. **152**(1-2): p. 82-96.
223. Yang, J.H., et al., *starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data*. Nucleic Acids Res, 2010. **39**(Database issue): p. D202-9.
224. Yanos, M.E., Bennett, C.F., and Kaeberlein, M., *Genome-Wide RNAi Longevity Screens in Caenorhabditis elegans*. Curr Genomics, 2012. **13**(7): p. 508-18.
225. Yates, L.A., Norbury, C.J., and Gilbert, R.J., *The long and short of microRNA*. Cell, 2013. **153**(3): p. 516-9.
226. Yin, J., Teegala, S., Yzeiraj, E., & Savage-Dunn, C., *Regulation of gene expression by DBL-1/BMP*, in International Worm Meeting. 2011.

227. Yoshida, S., et al., *Hypodermal expression of Caenorhabditis elegans TGF-beta type I receptor SMA-6 is essential for the growth and maintenance of body length*. Dev Biol, 2001. **240**(1): p. 32-45.
228. You, Y.J., et al., *Insulin, cGMP, and TGF-beta signals regulate food intake and quiescence in C. elegans: a model for satiety*. Cell Metab, 2008. **7**(3): p. 249-57.
229. Zhang, H. and Emmons, S.W., *Regulation of the Caenorhabditis elegans posterior Hox gene egl-5 by microRNA and the polycomb-like gene sop-2*. Dev Dyn, 2009. **238**(3): p. 595-603.
230. Zhang, P., et al., *Direct and indirect gene regulation by a life-extending FOXO protein in C. elegans: roles for GATA factors and lipid gene regulators*. Cell Metab, 2013. **17**(1): p. 85-100.
231. Zhang, X. and Zhang, Y., *DBL-1, a TGF-beta, is essential for Caenorhabditis elegans aversive olfactory learning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(42): p. 17081-6.
232. Zhao, N., et al., *MicroRNA miR145 regulates TGFBR2 expression and matrix synthesis in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2015. **116**(1): p. 23-34.
233. Zhao, Z., et al., *A negative regulatory loop between microRNA and Hox gene controls posterior identities in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2010. **6**(9): p. e1001089.
234. Zisoulis, D.G., et al., *Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute*. Nature, 2012. **486**(7404): p. 541-4.
235. Zisoulis, D.G., et al., *Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in Caenorhabditis elegans*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(2): p. 173-9.
236. Zugasti, O. and Ewbank, J.J., *Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF-beta signaling pathway in Caenorhabditis elegans epidermis*. Nat Immunol, 2009. **10**(3): p. 249-56.
237. Zwaal, R.R., et al., *The sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase is required for development and muscle function in Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43557-63.

ANEXO I

ANEXO I – PARTE I: Figuras y Tablas adicionales.

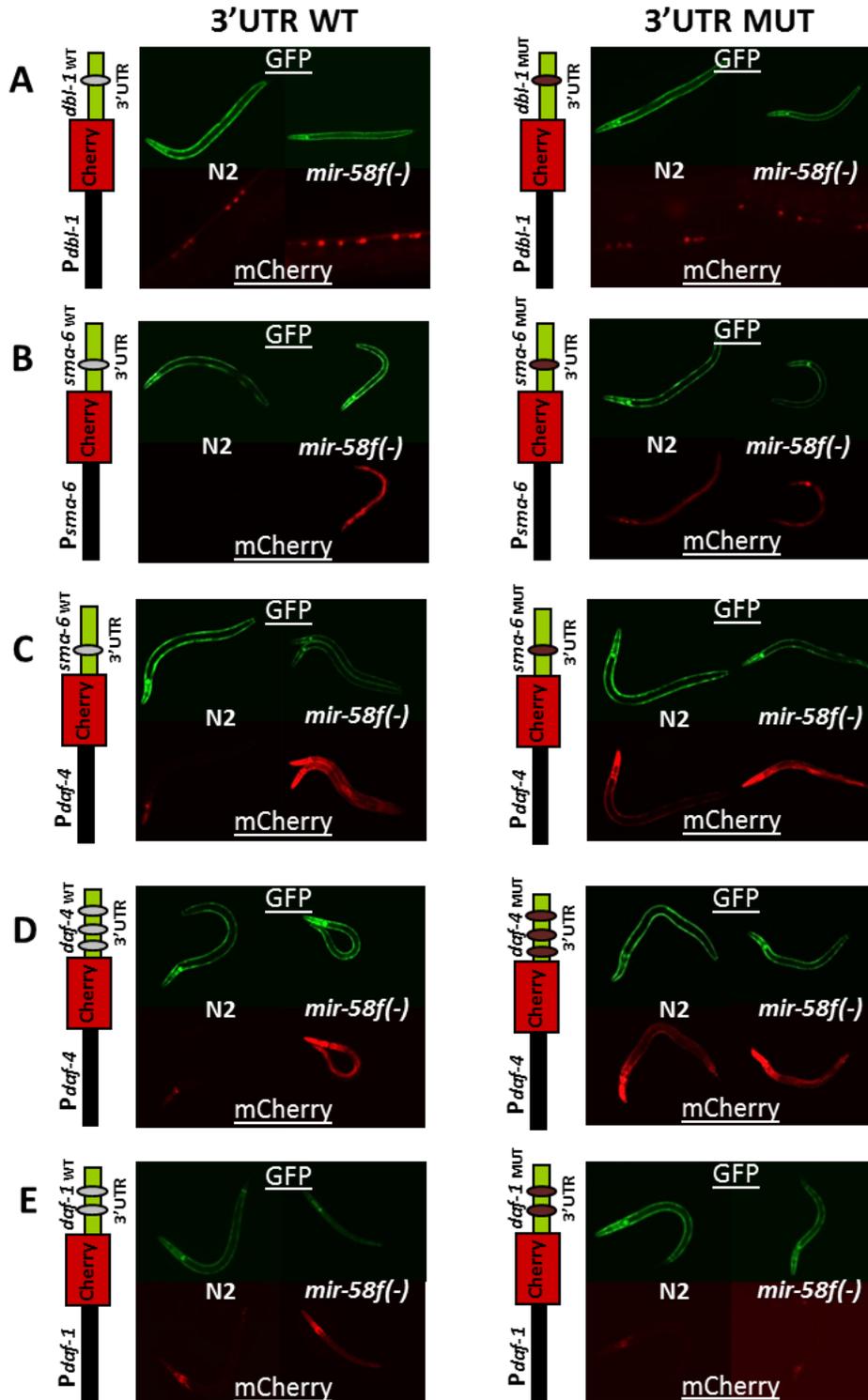


Figura A-1: La familia de *mir-58* reduce la expresión de mCherry bajo el control de los 3'UTRs de los receptores de TGF β y del ligando DBL-1 de TGF β Sma/Mab. Se muestran imágenes representativas de los transgénicos de N2 y *mir-58f(-)* que expresan el marcador de microinyección $P_{sca-1}::GFP$ (GFP) y el reportero mCherry (mCherry) bajo la regulación de los 3'UTR silvestre (WT) y mutado (MUT) para *dbl-1* (A), *sma-6* (B y C), *daf-4* (D) y *daf-1* (E). También se indican esquemas de las construcciones de los reporteros utilizadas (izquierda de las fotos), en las que se indican los sitios de unión de la familia de *mir-58* mediante elipses grises (regiones silvestres) y las regiones que se han mutado mediante elipses marrones.

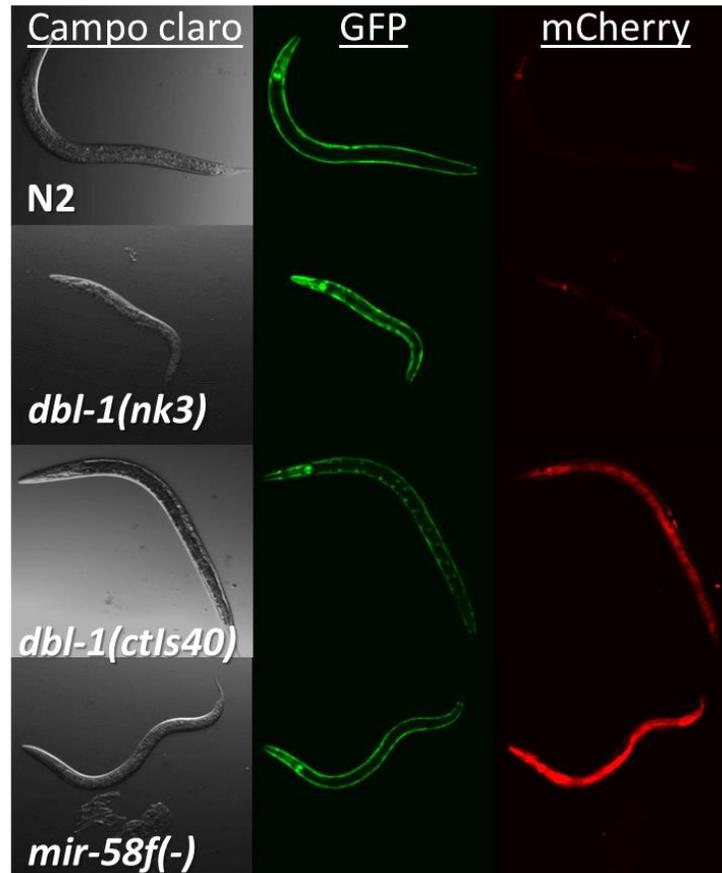


Figura A-2: Imágenes del reportero de la actividad de TGF β Sma/Mab ($P_{sma-6}::GFP$) en estadio L4 en diferentes cepas. Imágenes representativas de nematodos en campo claro (izquierda), del marcador de GFP (centro) y del reportero $P_{sma-6}::mCherry$ (derecha).



Figura A-3: Alineamiento de tres regiones del 3'UTR de *mir-58* consigo mismo. En sombreado amarillo se muestra el anillamiento de la región "seed" de miR-58 con su 3'UTR.



Figura A-4: Imágenes del reportero de células precursoras de los núcleos hipodérmicos ($P_{SCM}::GFP$) en adultos de diferentes cepas. Se muestran imágenes representativas en campo claro (izquierda) y de GFP (derecha) de transgénicos de la cepa silvestre N2 y transgénicos mutantes *mir-58(n4640)*.

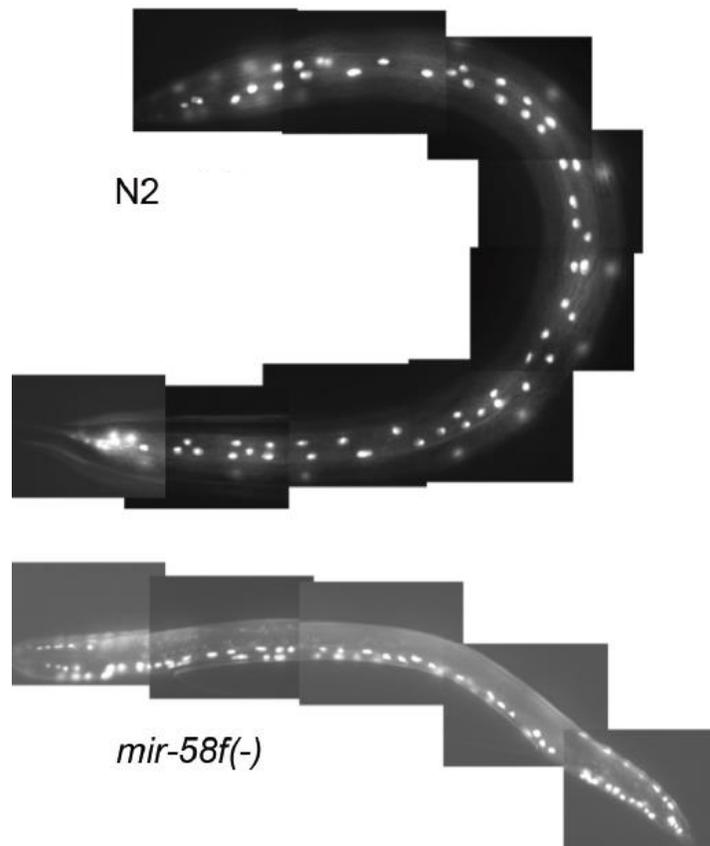


Figura A-5: Imágenes del reportero $P_{dpy-7}::4xNLS::GFP$ en N2 y *mir-58f(-)*. Imágenes de GFP obtenidas por el A. G. Sáez.

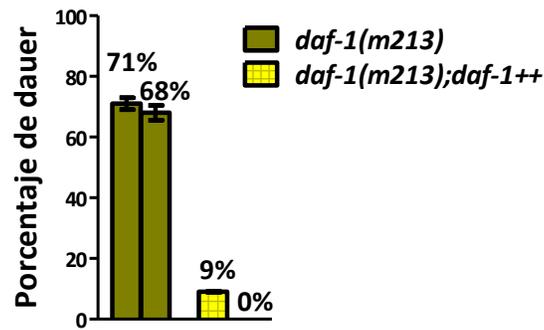


Figura A-6: La sobreexpresión de DAF-1 rescata el fenotipo de dauer en *daf-1(m213)*. Porcentaje de entrada en dauer a 20 °C de cuatro líneas transgénicas de *daf-1(m213)* que sobreexpresan o no DAF-1 (sin su 3'UTR). Se muestra la media de dos experimentos independientes con su desviación estándar. $n > 358$ individuos por línea transgénica.

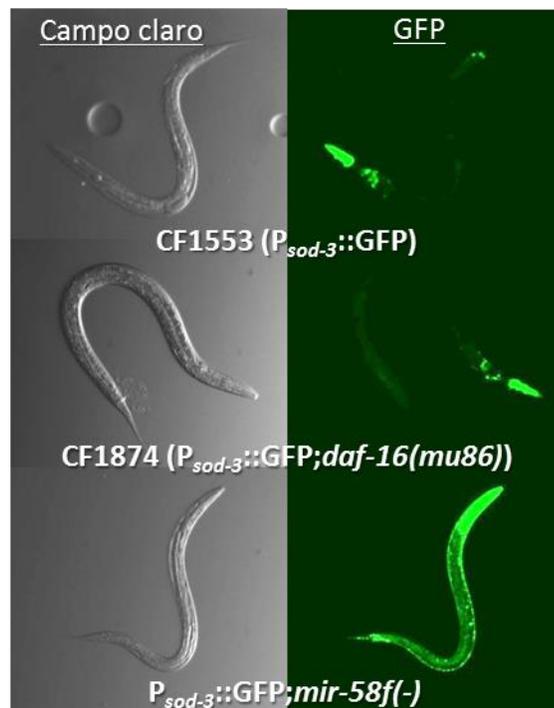


Figura A-7: Imágenes del reportero $P_{sod-3}::GFP$ en estadio L4 en diferentes cepas. Se muestran imágenes representativas en campo claro (izquierda) y de GFP de las cepas transgénicas CF1553, CF1874 y $P_{sod-3}::GFP;mir-58f(-)$.

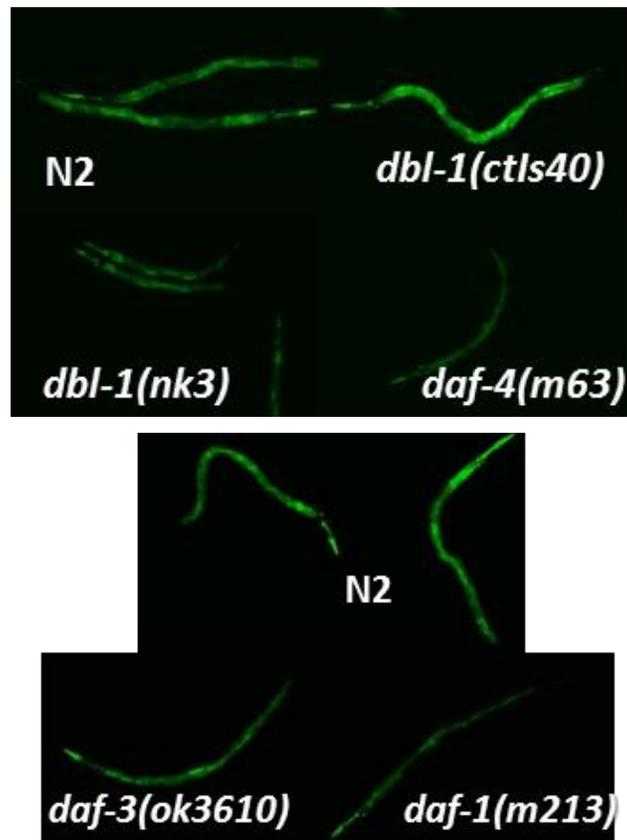


Figura A-8: Imágenes de nematodos en estadio L4 con el reportero de la actividad transcripcional de *mir-58* ($P_{mir-58}::GFP$). Imágenes representativas de transgénicos de la cepa silvestre N2 y de mutantes de la ruta TGF β Sma/Mab (A) y de la ruta TGF β Dauer (B).

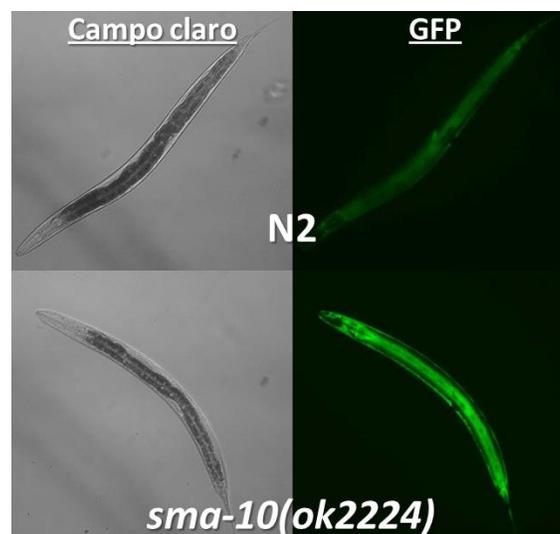


Figura A-9: Los mutantes *sma-10(ok2224)* tienen mayor actividad de la región 5' flanqueante de *lon-1*. Imágenes representativas de la actividad de $P_{lon-1}::GFP$ en N2 y mutantes *sma-10(ok2224)*.

Genotipo	valor <i>p</i> N2	valor <i>p</i> <i>mir-58(n4640)</i>	n
N2	-		138
<i>mir-81/82(nDf54)</i>	0,546		92
<i>mir-80(nDf53); mir-81/82(nDf54)</i>	0,824		48
<i>mir-80(nDf53)</i>	0,052	< 0,001	60
<i>mir-58(n4640)</i>	< 0,001	< 0,001	131
<i>mir-58(n4640); mir-81/82(nDf54)</i>	< 0,001	< 0,001	52
<i>mir-58(n4640); mir-80(nDf53)</i>	< 0,001	< 0,001	49
<i>mir-58f(-)</i>	< 0,001	< 0,001	53

Tabla A-1: Estadística asociada a la Figura R-5. Se muestran las probabilidades de que los mutantes de la familia de *mir-58* y sus diferentes combinaciones se asemejen a N2 (valor *p* N2) o a *mir-58(n4640)* (valor *p* *mir-58*) y el número de individuos analizados (n).

Genotipo	valor <i>p</i> N2	valor <i>p</i> <i>dbl-1(nk3)^a/</i> <i>dbl-1(ctIs40)^b</i>	n
N2			138
<i>mir-58(n4640)</i>	< 0,001		131
<i>dbl-1(ctIs40)</i>	< 0,001		54
<i>mir-58(n4640); dbl-1(ctIs40)</i>	0,216	< 0,001 ^b	41
<i>dbl-1(nk3)</i>	< 0,001		40
<i>mir-58(n4640); dbl-1(nk3)</i>	< 0,001	< 0,001 ^a	39

Tabla A-2: Estadística asociada a la Figura R-7. Se muestran las probabilidades de que las diferentes cepas se asemejen a la cepa silvestre N2 (valor *p* N2), a *dbl-1(nk3)* y a *dbl-1(ctIs40)* (valor *p* *dbl-1(nk3)^a/dbl-1(ctIs40)^b*) y el número de individuos analizados (n).

<i>mir-58f(-)</i>	% reducción	valor <i>p</i> control	n
RNAi control			109
RNAi <i>daf-4</i>	4%	< 0,001	30
RNAi <i>sma-10</i>	5%	< 0,001	50
RNAi <i>sma-6</i>	23%	< 0,001	73

Tabla A-3: Estadística asociada a la Figura R-8. Se muestran los porcentajes de reducción de cada tratamiento de RNAi respecto al control, las probabilidades de que los diferentes tratamientos de RNAi tengan el mismo efecto sobre *mir-58f(-)* que el vector control (valor *p* control) y el número de individuos analizados (n).

Genotipo	Longitud Relativa a N2	valor p N2	valor p $dbl-1(nk3)^a/eat-2(ad465)^b$	n
N2	100%			84
<i>sma-10(ok2224)</i>	73%	< 0,001		77
<i>dbl-1(nk3)</i>	65%	< 0,001		55
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	63%	< 0,001	0,053 ^a	54
<i>eat-2(ad465)</i>	72%	< 0,001		20
<i>sma-10(ok2224);eat-2(ad465)</i>	50%	< 0,001	< 0,001 ^b	20

Tabla A-4: Estadística asociada a la Figura R-17. Se muestra la longitud de cada genotipo en relación a la cepa silvestre N2, las probabilidades de que el tamaño de las diferentes cepas no sea significativamente diferente al de N2 (valor p N2), al de *dbl-1(nk3)* y al de *eat-2(ad465)* (valor p $dbl-1(nk3)^a/eat-2(ad465)^b$), y número de individuos analizados (n).

Genotipo	Ploidía (C)	valor p N2	n
N2	10,2		6
<i>sma-10(ok2224)</i>	8,7	< 0,001	15
<i>dbl-1(nk3)</i>	7,4	< 0,001	7
<i>sma-10(ok2224);dbl-1(nk3)</i>	7,8	< 0,001	12

Tabla A-5: Estadística asociada a la Figura R-18A. Se muestra la media de la ploidía de cada cepa, la probabilidad de que las cepas tengan la misma ploidía que N2 (valor p N2) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p <i>sma-10(ok2224)</i>	valor p N2	n
N2	116			24
<i>sma-10(ok2224)</i>	70	-	< 0,001	60
<i>sma-10(ok2224);P_{myo-2}::sma-10</i>	77	< 0,001	< 0,001	55
<i>sma-10(ok2224);P_{dpy-7}::sma-10</i>	122	< 0,001	0,081	58
<i>sma-10(ok2224);P_{trx-3}::sma-10</i>	116	< 0,001	0,884	60
<i>sma-10(ok2224);P_{sma-10}::sma-10</i>	116	< 0,001	0,336	47

Tabla A-6: Estadística asociada a la Figura R-23. Se muestra la vida media de cada transgénico, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a *sma-10(ok2224)* (valor p *sma-10(ok2224)*) o a N2 (valor p N2) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>sma-10(ok2224)</i>	n
N2	93			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	69	< 0,001		40
<i>tol-1(nr2033)</i>	94,5	0,910		40
<i>sma-10(ok2224);tol-1(nr2033)</i>	67	< 0,001	0,286	40

Tabla A-7: Estadística asociada a la Figura R-25A. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *sma-10(ok2224)* (valor p *sma-10(ok2224)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>fshr-1(ok778)</i>	n
N2	93			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	69	< 0,001		40
<i>fshr-1(ok778)</i>	42	< 0,001		40
<i>sma-10(ok2224);fshr-1(ok778)</i>	17	< 0,001	< 0,001	40

Tabla A-8: Estadística asociada a la Figura R-25B. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *fshr-1(ok778)* (valor p *fshr-1(ok778)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>sek-1(km4)</i>	n
N2	115			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	91	< 0,001		40
<i>sek-1(km4)</i>	48,5	< 0,001		40
<i>sma-10(ok2224);sek-1(km4)</i>	42	< 0,001	< 0,001	40

Tabla A-9: Estadística asociada a la Figura R-25C. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *sek-1(km4)* (valor p *sek-1(km4)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>bar-1(ga80)</i>	n
N2	117			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	73	< 0,001		40
<i>bar-1(ga80)</i>	70	< 0,001		40
<i>sma-10(ok2224);bar-1(ga80)</i>	21	< 0,001	< 0,001	40

Tabla A-10: Estadística asociada a la Figura R-25D. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *bar-1(ga80)* (valor p *bar-1(ga80)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>daf-2(e1370)</i>	n
N2	90			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	68	< 0,001		40
<i>daf-2(e1370)</i>	140	< 0,001		40
<i>sma-10(ok2224);daf-2(e1370)</i>	135	< 0,001	0,893	40

Tabla A-11: Estadística asociada a la Figura R-25E. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *daf-2(e1370)* (valor p *daf-2(e1370)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>daf-2(e1370)</i>	n
N2	91,5			40
<i>dbl-1(nk3)</i>	67	< 0,001	< 0,001	40
<i>daf-2(e1370)</i>	164	< 0,001		40
<i>dbl-1(nk3);daf-2(e1370)</i>	95,5	0,980	< 0,001	40

Tabla A-12: Estadística asociada a la Figura R-25F. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *daf-2(e1370)* (valor p *daf-2(e1370)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>sma-10(ok2224)</i>	n
N2	115			40
<i>sma-10(ok2224)</i>	91	< 0,001		40
<i>daf-16(mu86)</i>	115	0,597		40
<i>sma-10(ok2224);daf-16(mu86)</i>	67	< 0,001	0,003	40

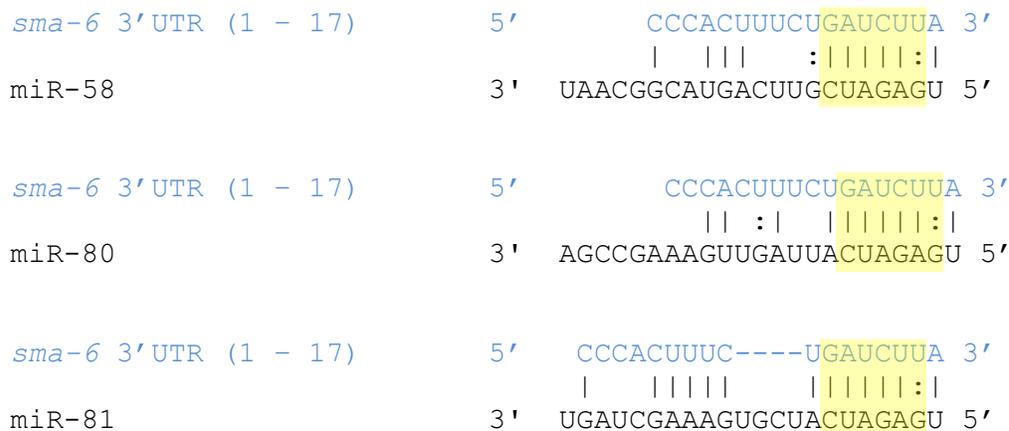
Tabla A-13: Estadística asociada a la Figura R-26A. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o a *sma-10(ok2224)* (valor p *sma-10(ok2224)*) y el número de individuos analizados (n).

Cepa	Vida media (horas)	valor p N2	valor p <i>daf-16(zIs356)</i>	n
N2	90			75
<i>sma-10(ok2224)</i>	70	< 0,001		75
<i>daf-16(zIs356)</i>	94	0,037		78
<i>sma-10(ok2224); daf-16(zIs356)</i>	73,5	0,084	< 0,001	76

Tabla A-14: Estadística asociada a la Figura R-26B. Se muestra la vida media de cada cepa, la probabilidad de que la curva de supervivencia sea parecida a N2 (valor p N2) o la cepa transgénica *daf-16(zIs356)* (valor p *daf-16(zIs356)*) y el número de individuos analizados (n).

ANEXO I – PARTE II: Alineamiento de la familia de *mir-58* con los 3'UTRs de los genes candidatos.

Se muestran los alineamientos de las regiones de los 3'UTRs con las que interaccionan los diferentes miembros de la familia de *mir-58*. En amarillo se ha resaltado la región de ambas moléculas correspondiente a la unión de la región “seed”. En rojo se han señalado los nucleótidos que se han mutado en los ensayos de las Figuras R-2, R-3 y R-9.

1. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *dbl-1***2. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *sma-6***

<i>sma-6</i> 3' UTR (1 - 17)	5'	CCCACUUUC----UGAUCUUA 3'
miR-82	3'	UGACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (1 - 17)	5'	CCCACUUUCUGAUCUUA 3'
miR-1834	3'	AACCUAGAGUUACCAACUAGAGA 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (93 - 114)	5'	G-U-CAAAAU-UUAAAGCGAUCUCU 3'
miR-58	3'	UAACG--GCAUGA-CUUGCUCUAGAGU 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (93 - 114)	5'	GUCAAAAUUUAA--AGCGAUCUCU 3'
miR-80	3'	AGCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (93 - 114)	5'	GUCAAAAUUU-AAAGCGAUCUCU 3'
miR-81	3'	UGAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (93 - 114)	5'	GUCAAAAUUU-AAAGCGAUCUCU 3'
miR-82	3'	UGACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
<i>sma-6</i> 3' UTR (93 - 114)	5'	GUCAAAAUUUAAAG--CGAUCUCU 3'
miR-1834	3'	AACCUAGAGUUACCAACUAGAGA 5'

3. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *daf-4*

<i>daf-4</i> 3' UTR (127 - 148)	5'	UACGCGUCCCCUAAUGAUCUCA 3'
miR-58	3'	UAACGGCA-UGACUUGCUCUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (127 - 148)	5'	UAC-GC-GUCCCCUAAUGAUCUCA 3'
miR-80	3'	A-GCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (127 - 148)	5'	UAC--GCGUCCCCUAAUGAUCUCA 3'
miR-81	3'	UGAUCGAAAGUG-CUACUAGAGU 5'

ANEXO I

<i>daf-4</i> 3' UTR (127 - 148)	5'	UAC-GCGUCCCCUAAUGAUCUCA 3'
miR-82	3'	UGACCGAAAGUG-CUACUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (127 - 148)	5'	UACGCG-UCCCCU-AA----UGAUCUCA 3'
miR-1834	3'	A-AC-CUA---GAGUUACCAACUAGAGA 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (234 - 255)	5'	UCUUCCAAAUCU--CUGAUCUCU 3'
miR-58	3'	UA-ACGG---CAUGACUUGCUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (234 - 255)	5'	U---CUUCCAAAUCU-CUGAUCUCU 3'
miR-80	3'	AGCCGAAAG--UU-GAUUACUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (234 - 255)	5'	U--CUUCCAAAUCUCUGAUCUCU 3'
miR-81	3'	UGAUCGAAAG---U-GCUACUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (234 - 255)	5'	U--CUUCCAAAUCUCUGAUCUCU 3'
miR-82	3'	UGACCGAAAG---U-GCUACUAGAGU 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (234 - 255)	5'	UCU---UC-CAAAU-CUCUGAUCUCU 3'
miR-1834	3'	A-ACCUAGAG--UUACCA-ACUAGAGA 5'
<i>daf-4</i> 3' UTR (351 - 372)	5'	UUCACUAUAUCAUUGAUCUGU 5'
miR-58	3'	UAA-CGGCAUGACUUGCUAGA-GU 3'
<i>daf-4</i> 3' UTR (351 - 372)	5'	UUCACUAUAJU--CAU--UGAUCUGU 5'
miR-80	3'	AGCCGAAAGUUGAUUACUAGA-GU 3'
<i>daf-4</i> 3' UTR (351 - 372)	5'	UUCACUA--UAUCAU--UGAUCUGU 5'
miR-81	3'	UGAUCGA-AAGUGCUACUAGA-GU 3'

daf-4 3'UTR (351 - 372) 5' UUCACUA-UAUUCAU--UGAUCUGU 5'
 ||| : |||: ||||| :
 miR-82 3' UGACCGAAAGUGCUACUAGA-GU 3'

daf-4 3'UTR (351 - 372) 5' UUCACUAUAUUCAUUGAUCUGU 5'
 || : | | | ||||| |
 miR-1834 3' AACCUAGA-GUUACCAACUAGAGA 3'

4. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *daf-1*

daf-1 3'UTR (98 - 119) 5' CACCCCAUAUC-G-AUGAUCUCA 3'
 | ||| | | | : ||||| |
 miR-58 3' UAACGGCAU-GACUUGCUCAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (98 - 119) 5' C-ACCCCAUAUC-GAUGAUCUCA 3'
 | | || | | : ||||| |
 miR-80 3' AGCCGAAAGU-U-GAUUACUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (98 - 119) 5' CACCCCA--UAU--CGAUGAUCUCA 3'
 | | | | | ||||| |
 miR-81 3' U---GAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (98 - 119) 5' CACCCCAUAU--CGAUGAUCUCA 3'
 || | | | ||||| |
 miR-82 3' UGACCG-AAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (98 - 119) 5' CACCCCAUAUCGAUGAUCUCA 3'
 | | || | | | ||||| |
 miR-1834 3' AACCU-AGAGU-UACCAACUAGAGA 5'

daf-1 3'UTR (325 - 348) 5' UUUUUUUUCUGUACCAUGAUUUCA 3'
 || :: |:: | : ||| : |||
 miR-58 3' UAACGGCAUGACUUGCUCAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (325 - 348) 5' UUUUUUUUCUGUACCAUGAUUUCA 3'
 | : : ||| : : ||||| : |||
 miR-80 3' AGCCGAAAGUUG-AUUAUCUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (325 - 348) 5' UUUUUUUUCUGUACCAUGAUUUCA 3'
 : | : | : || ||||| : |||
 miR-81 3' UGAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (325 - 348) 5' UUUUUUUUCUGUACCAUGAUUUUCA 3'
 :| : | :|| ||||:|
 miR-82 3' UGACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-1 3'UTR (325 - 348) 5' UUUUUUUUCUGUACCAUGAUUUUCA 3'
 || |:|| :| |||:|
 miR-1834 3' AACCUAGAGUUA-CCAACUAGAGA 5'

5. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *daf-7*

daf-7 3'UTR (54 - 77) 5' AAUGAAUCAAAAUU-CAUGAUUUUCA 3'
 :| |:|| |:|||:|
 miR-58 3' UAACGG-CAUGACUUGCUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (54 - 77) 5' AAUGAAUCAAAAUUCAUGAUUUUCA 3'
 :| | ||:| ||||:|
 miR-80 3' AGCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (54 - 77) 5' AAUGAAUCAAAAUUCAUGAUUUUCA 3'
 |: | | : ||||:|
 miR-81 3' UGA-UCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (54 - 77) 5' AAUGAAUCAAAAUUCAUGAUUUUCA 3'
 |: | : ||||:|
 miR-82 3' UGA-CCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (54 - 77) 5' AAUGAAUCAAAAUUCAUGAUUUUCA 3'
 || ||| || | |||:|
 miR-1834 3' AACCUAGAGUUACCAACUAGAGA 5'

daf-7 3'UTR (148 - 171) 5' GGAGCUUCUCUUCUG-UCGGUCUCC 3'
 : | |: | ||| | |||||
 miR-58 3' UAACGGCAUGACUUGCUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (148 - 171) 5' GGAGCUUCUCUUCUGUCGGUCUCC 3'
 | :| || ||: | :|||
 miR-80 3' AGCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'

daf-7 3'UTR (148 - 171) 5' GGAGCU-UCUCUUCUGUCGGUCUCC 3'
 :|| || |: :| | :|||
 miR-81 3' UGAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

<i>daf-7</i> 3'UTR (148 - 171)	5'	GGAGCU-UCUCUUCUGUCGGUCUCC 3'
miR-82	3'	UGACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
		: :
<i>daf-7</i> 3'UTR (148 - 171)	5'	GGAGCUUCUCUUCUGUCGGUCUCC 3'
miR-1834	3'	AACCUAGAGUUACCAACUAGAGA 5'
<i>daf-7</i> 3'UTR (165 - 186)	5'	GGUCU-CCUUUCCU---CGAUCUCA 3'
miR-58	3'	UA-ACGG-CA-UGACUUGCAGAGU 5'
		:
<i>daf-7</i> 3'UTR (165 - 186)	5'	GGUCUCCUUUC-CCU--CGAUCUCA 3'
miR-80	3'	AGCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'
<i>daf-7</i> 3'UTR (165 - 186)	5'	GGUCU-CCUUUC-CCUCGAUCUCA 3'
miR-81	3'	U-GAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
		:
<i>daf-7</i> 3'UTR (165 - 186)	5'	GGUCU-CCUUUC-CCUCGAUCUCA 3'
miR-82	3'	U-GACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'
		:
<i>daf-7</i> 3'UTR (165 - 186)	5'	GGUCUCCUUUCCUCGAUCUCA 3'
miR-1834	3'	AACC-UAGAGUUACCAACUAGAGA 5'
		:

6. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *mcm-4*

<i>mcm-4</i> 3'UTR (28 - 49)	5'	CACUUUUUAU-CAUUGGAUCUCA 3'
miR-58	3'	UAACGGCAUGAC-UUG-CUAGAGU 5'
		:: :
<i>mcm-4</i> 3'UTR (28 - 49)	5'	CACUUUUUAUCAUUGGAUCUCA 3'
miR-80	3'	AGCCGAAAGUUGAUUA-CUAGAGU 5'
		: :
<i>mcm-4</i> 3'UTR (28 - 49)	5'	CACUUUUUAUCAUUGGAUCUCA 3'
miR-81	3'	UGAUCGAAAGUGCU--ACUAGAGU 5'
		: : :

<i>mcm-4</i> 3' UTR (28 - 49)	5'	CACUUUUUAUCAUUGGAUCUCA 3'
		: : :
miR-82	3'	UGACCGAAAGUGCU--ACUAGAGU 5'
<i>mcm-4</i> 3' UTR (28 - 49)	5'	CACUU--UUUAUC-AU--UGGAUCUCA 3'
		:
miR-1834	3'	AACCUAG-AGUUACCAACUAGAGA 5'

7. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *cyb-1*

<i>cyb-1</i> 3' UTR (259 - 280)	5'	GCCCU-CUUUUGUAUCGAUCUCG 3'
		:
miR-58	3'	UAACGGCAUG---AC-UUGCUCUAGAGU 5'

<i>cyb-1</i> 3' UTR (259 - 280)	5'	GC-CCUCUUUUG-UAUCGAUCUCG 3'
		: : :
miR-80	3'	AGCCGA-AAGUUGAUUACUAGAGU 5'

<i>cyb-1</i> 3' UTR (259 - 280)	5'	GCCCU--CUUUUGU-AUCGAUCUCG 3'
		: : : :
miR-81	3'	U--GAUCGAAAGUGCU-ACUAGAGU 5'

<i>cyb-1</i> 3' UTR (259 - 280)	5'	GCCCU--CUUUUGU-AUCGAUCUCG 3'
		: : : :
miR-82	3'	U--GACCGAAAGUGCU-ACUAGAGU 5'

<i>cyb-1</i> 3' UTR (259 - 280)	5'	GCCUCUU-UUGUAUCGAUCUCG 3'
		:
miR-1834	3'	AAC-CUAGAGUUAC-CAACUAGAGA 5'

8. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *cyb-2.2*

<i>cyb-2.2</i> 3' UTR (144 - 165)	5'	ACCUUCGU-UUGUAUCGAUCUCA 3'
		: :
miR-58	3'	UAACGGCAUGAC-UUGCUCUAGAGU 5'

<i>cyb-2.2</i> 3' UTR (144 - 165)	5'	ACCUUCGUUUGUAUCGAUCUCA 3'
		: : :
miR-80	3'	AGCCGAAAGUUGAU-UA-CUAGAGU 5'

<i>cyb-2.2</i> 3'UTR (144 - 165)	5'	ACCUUCG-UUUGUAU--CGAUCUCA 3'
		: :
miR-81	3'	U-G-AUCGAAA-GUGCUACUAGAGU 5'
<i>cyb-2.2</i> 3'UTR (144 - 165)	5'	ACCUUCG-UUUGUAU--CGAUCUCA 3'
		: :
miR-82	3'	U-G-ACCGAAA-GUGCUACUAGAGU 5'
<i>cyb-2.2</i> 3'UTR (144 - 165)	5'	ACCTTCG-T-TT-GT-ATCGATCTCA 3'
		: :
miR-1834	3'	AACCUAGAGUUACCAACUAGAGA 5'

9. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *daf-25*

<i>daf-25</i> 3'UTR (1 - 22)	5'	AAGUGCCGAUAUU--UCGAUCUCA 3'
		:
miR-58	3'	UAACGGC-AUGACUUGCUCUAGAGU 5'
<i>daf-25</i> 3'UTR (1 - 22)	5'	AAGUGCCGAUA-UU-UCGAUCUCA 3'
		: :
miR-80	3'	AGC-CGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'
<i>daf-25</i> 3'UTR (1 - 22)	5'	AAGUGCCGAUAUU-UCGAUCUCA 3'
		: :
miR-81	3'	UGAUCGAAAGUG-CUACUAGAGU 5'
<i>daf-25</i> 3'UTR (1 - 22)	5'	AAGUGCCGAUAUU-UCGAUCUCA 3'
		: :
miR-82	3'	UGACCGAAAGUG-CUACUAGAGU 5'
<i>daf-25</i> 3'UTR (1 - 22)	5'	AAGUGCCGAUAUU-UCGAUCUCA 3'
		:
miR-1834	3'	AACCUA-GAGU-UACCAACUAGAGA 5'

10. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *daf-16*

<i>daf-16</i> 3'UTR (99 - 122)	5'	CUACACACACUCAACGAUCAUCA 3'
miR-58	3'	UAACGGCAUGACUUGCUCUAG-AGU 5'

daf-16 3'UTR (99 - 122) 5' CUACACACACUCAACGAUCAUCA 3'
 | | | | : | | | | | | | |
 miR-80 3' AGCCGAAAGUUGAUUACUAG-AGU 5'

daf-16 3'UTR (99 - 122) 5' CUACACACACUCAACGAUCAUCA 3'
 | | | | | | | | | |
 miR-81 3' UGAUCGAAAGUGCUACUAG-AGU 5'

daf-16 3'UTR (99 - 122) 5' CUACACACACUCAACGAUCAUCA 3'
 | | | | | | | | | |
 miR-82 3' UGACCGAAAGUGCUACUAG-AGU 5'

daf-16 3'UTR (99 - 122) 5' CUACACACACUCAACGAUCAUCA 3'
 | | | | | | | | | |
 miR-1834 3' AACCUAGAGUUACCAACUAG-AGA 5'

11. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *ins-1*

ins-1 3'UTR (331 - 352) 5' AAU-CCAGU-UUGACCUGAUCUCA 3'
 | | | | | | : | | | : | | | | | |
 miR-58 3' UAACGG-CAUGACU-UGCUGAGAGU 5'

ins-1 3'UTR (331 - 352) 5' AAUCCAG-UUU-GAC--CUGAUCUCA 3'
 | | | | | | : | | | | | | | | | |
 miR-80 3' A-GCCGAAAGUUGAUUACUAGAGU 5'

ins-1 3'UTR (331 - 352) 5' AAUCCAG-UUUGAC-CUGAUCUCA 3'
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 miR-81 3' U-GAUCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

ins-1 3'UTR (331 - 352) 5' AAUCCAG-UUUGAC-CUGAUCUCA 3'
 | | | | | | | | | | | | | | | |
 miR-82 3' U-GACCGAAAGUGCUACUAGAGU 5'

ins-1 3'UTR (331 - 352) 5' AAUC-CAGUUUGACCUGAUCUCA 3'
 | | | | | | : | | | | | | | | | |
 miR-1834 3' AACCUAGAGUU--AC-CAACUAGAGA 5'

12. Unión de la familia de *mir-58* al 3'UTR de *ins-17*

<i>ins-17</i> 3'UTR (142 - 163)	5'	UGCU-UGUUGGGUUUA	GAUCUCA	3'
		: :: ::		
miR-58	3'	UAACGGCAUGACUU---	CUAGAGU	5'
<i>ins-17</i> 3'UTR (142 - 163)	5'	UGCUUGUUGGGUU-UA	GAUCUCA	3'
		: : :::		
miR-80	3'	AGCCGA-AAGUUGAUUA	CUAGAGU	5'
<i>ins-17</i> 3'UTR (142 - 163)	5'	UGCUUGUUGGGUUUA-	GAUCUCA	3'
		: : :		
miR-81	3'	UGAUCGAAAGUGCUA	CUAGAGU	5'
<i>ins-17</i> 3'UTR (142 - 163)	5'	UGCUUGUUGGGUUUA-	GAUCUCA	3'
		: : :		
miR-82	3'	UGACCGAAAGUGCUA	CUAGAGU	5'
<i>ins-17</i> 3'UTR (142 - 163)	5'	UGCUUGUUGGGUUUA	GAUCUCA	3'
		::		
miR-1834	3'	AACCUAGAGUUA-CCAA--	CUAGAGA	5'

ANEXO I – PARTE III

Tabla con cepas generadas en este trabajo. Se muestra la nomenclatura, genotipo y Figura/Tabla donde aparecen.

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL12.1	<i>daf-1(m213) IV; madEx12 [(P_{daf-1}::genomic daf-1::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-12, A-6
ENL12.2	<i>daf-1(m213) IV; madEx12 [(P_{daf-1}::genomic daf-1::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-12, A-6
ENL13	<i>sma-6(wk7) II; madEx13 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL14	<i>sma-6(wk7) II; madEx14 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL16.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx13 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL16.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx13 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL17.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx14 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL17.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx14 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL17.3	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx14 [(P_{sma-6}::genomic sma-6::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL19	<i>mir-58(n4640) IV; ctIs40 X [ZC421(dbl-1(+)) + pTG98(sur-5::gfp)]</i>	Figura R-7; Tabla A-2
ENL20	<i>mir-80(nDf53) III; daf-1(m213) mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X</i>	Tabla R-3; Figura R-14
ENL21	<i>daf-2(e1370) mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X</i>	Tabla R-4; Figura R-14
ENL22	<i>madEx16 [(P_{dpy-7}::4xNLS::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura A-5
ENL23	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx16 [(P_{dpy-7}::4xNLS::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura A-5
ENL24.1	<i>madEx17 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL24.2	<i>madEx17 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL25.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx17 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL25.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx17 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL26	<i>madEx18 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL27	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx18 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL28.1	<i>madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL28.2	<i>madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL28.3	<i>madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL28.4	<i>madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL29.1	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL29.2	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx19 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL30.1	<i>madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL30.2	<i>madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL30.3	<i>madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL30.4	<i>madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL31.1	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL31.2	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL31.3	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL31.4	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx20 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{sma-6}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL32.1	<i>madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL32.2	<i>madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL32.3	<i>madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL33.1	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL33.2	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL33.3	<i>mir-80(nDf53) III;mir-58(n4640) IV;mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx21 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR WT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL34.1	<i>madEx22 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL34.2	<i>madEx22 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL35.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx22 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL35.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx22 [(P_{daf-4}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-4}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL36.1	<i>madEx23 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR WT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL36.2	<i>madEx23 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR WT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL37.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx23 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR WT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL37.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx23 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR WT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL75	<i>madEx24 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR MUT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL39	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx24 [(P_{dbl-1}::mCherry::3'UTR MUT_{dbl-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL40.1	<i>madEx25 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR WT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL40.2	<i>madEx25 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR WT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL41.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx25 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR WT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL41.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx25 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR WT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL42.1	<i>madEx26 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL42.2	<i>madEx26 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL43.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx26 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL43.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx26 [(P_{daf-1}::mCherry::3'UTR MUT_{daf-1}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-3, A-1
ENL44	<i>madEx27 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-6, A-2
ENL45	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx27 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-6, A-2
ENL46	<i>dbl-1(nk3) V; madEx27 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-6, A-2

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL47	<i>ctIs40 X [ZC421(dbl-1(+)) + pTG98(sur-5::gfp)]; madEx27 [(P_{sma-6}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-6, A-2
ENL48	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; mIs27 [(P_{daf-8}::gfp::daf-8) + rol-6(su1006)]</i>	Figura R-11
ENL76	EUB0032 (P _{mir-58} ::gfp); <i>dbl-1(nk3) V</i>	Figuras R-16, A-8
ENL77	EUB0032 (P _{mir-58} ::gfp); <i>sma-10(ok2224) IV</i>	Figura R-16
ENL78	EUB0032 (P _{mir-58} ::gfp); <i>daf-4(m63) III</i>	Figuras R-16, A-8
ENL79	EUB0032 (P _{mir-58} ::gfp); <i>madEx28 [WRM0624CB02 + p374 (P_{trx-3}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-16, A-8
ENL80	EUB0032 (P _{mir-58} ::gfp); <i>madEx29 [p374 (P_{trx-3}::mCherry::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-16
ENL81.1	<i>madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-9, R-12; Tablas R-2, R-5, A-6
ENL81.2	<i>madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figuras R-9, R-12; Tablas R-2, R-5, A-6
ENL82.1	<i>sma-6(wk7) II; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL82.2	<i>sma-6(wk7) II; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9
ENL83.1	<i>daf-1(m213) IV; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-12, A-6
ENL83.2	<i>daf-1(m213) IV; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-12, A-6
ENL85.1	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9; Tablas R-2, R-5
ENL85.2	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-9; Tablas R-2, R-5
ENL87	<i>daf-3(ok3610) X; mIs27 [(P_{daf-8}::gfp::daf-8) + rol-6(su1006)]</i>	Figura R-11
ENL88	EUB0032 (P _{mir-58} ::GFP); <i>daf-3(ok3610) X</i>	Figuras R-16, A-8
ENL89	EUB0032 (P _{mir-58} ::GFP); <i>daf-1(m213) IV</i>	Figuras R-16, A-8
ENL90	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV</i>	Figura R-5; Tabla A-1
ENL91	<i>mir-80(nDf53) III; mir-81&mir-82(nDf54) X</i>	Figura R-5; Tabla A-1
ENL92	<i>mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X</i>	Figura R-5; Tabla A-1
ENL93	<i>mir-58(n4640) IV; dbl-1(nk3) V</i>	Figura R-7; Tabla A-2
ENL94	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; mIs84 [pAD76 (P_{sod-3}::GFP) + rol-6]</i>	Figuras R-13, A-7
ENL104	<i>mir-58(n4640) IV; P_{SCM}::gfp</i>	Figura A-4
ENL105	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx35 [pCR2.1(mir-58++); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tablas R-2, R-5

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL106	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx36 [pCR2.1(mir-80++); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tabla R-2
ENL107	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx37 [(P_{mir-58}::premir-58); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tablas R-2, R-5
ENL108	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx38 [(P_{mir-80}::premir-58); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tabla R-2
ENL109	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx39 [(P_{rpl-28}::premir-58); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tabla R-2
ENL110	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx40 [(P_{ges-1}::premir-58); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tablas R-2, R-5
ENL111	<i>mir-80(nDf53) III; mir-58(n4640) IV; mir-81&mir-82(nDf54) X; madEx41 [(P_{dpy-7}::premir-58); pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}); pHygroSfi]</i>	Tablas R-2, R-5
ENL95	<i>sma-10(ok2224) IV</i> retrocruzada x6	Figuras R-17 – R-26; Tablas A-4, A-5
ENL59	<i>sma-10(ok2224) IV; dbl-1(nu3) V</i>	Figuras R-17 – R-22; Tablas A-4, A-5
ENL62	<i>daf-16(mu86) I; sma-10(ok2224) IV</i>	Figura R-26; Tabla A-13
ENL64	<i>sma-10(ok2224) IV; fshr-1(ok778) V</i>	Figura R-25; Tabla A-8
ENL65	<i>sma-10(ok2224) IV; sek-1(km4) X</i>	Figura R-25; Tabla A-9
ENL66	<i>eat-2(ad465) II; sma-10(ok2224) IV</i>	Figura R-17; Tabla A-4
ENL68	<i>sma-10(ok2224) IV; zls356 IV [P_{daf-16}::daf-16a/b::gfp + rol-6]</i>	Figura R-26; Tabla A-14
ENL69	<i>tol-1(nr2033) I; sma-10(ok2224) IV</i>	Figura R-25; Tabla A-7
ENL70	<i>daf-2(e1370) III; sma-10(ok2224) IV</i>	Figura R-25; Tabla A-11
ENL71	<i>daf-2(e1370) III; dbl-1(nk3) V</i>	Figura R-25; Tabla A-12
ENL96.1	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL96.2	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx30 [pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL98.1	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx31 [(P_{myo-2}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL98.2	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx31 [(P_{myo-2}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL98.3	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx31 [(P_{myo-2}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL99	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx32 [(P_{dpy-7}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{sca-1}::gfp::3'UTR_{unc-54}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6

Cepa	Genotipo	Referencia en tesis
ENL100.1	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx33 [(P_{trx-3}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{<i>sca-1</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL100.2	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx33 [(P_{trx-3}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{<i>sca-1</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL101.1	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx34 [(P_{<i>sma-10</i>}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{<i>sca-1</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL101.2	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx34 [(P_{<i>sma-10</i>}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{<i>sca-1</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL101.3	<i>sma-10(ok2224) IV; madEx34 [(P_{<i>sma-10</i>}::genomic <i>sma-10</i>::3'UTR_{<i>sma-10</i>}) + pGK10 (P_{<i>sca-1</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-23; Tabla A-6
ENL102	<i>sma-10 (ok2224) IV; P_{<i>lon-1</i>}::gfp</i>	Figuras R-18, A-9
ENL103	<i>sma-10 (ok2224) IV; bar-1(ga80) X</i>	Figura R-25; Tabla A-10
ENL114.1	<i>madEx44 [(P_{<i>sma-10</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pPD185.114 (P_{<i>myo-3</i>}::rfp::3'UTR_{<i>let-858</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-22
ENL114.2	<i>madEx44 [(P_{<i>sma-10</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pPD185.114 (P_{<i>myo-3</i>}::rfp::3'UTR_{<i>let-858</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-22
ENL114.3	<i>madEx44 [(P_{<i>sma-10</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pPD185.114 (P_{<i>myo-3</i>}::rfp::3'UTR_{<i>let-858</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-22
ENL114.4	<i>madEx44 [(P_{<i>sma-10</i>}::gfp::3'UTR_{<i>unc-54</i>}) + pPD185.114 (P_{<i>myo-3</i>}::rfp::3'UTR_{<i>let-858</i>}) + pHygroSfi]</i>	Figura R-22

ANEXO II

