RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Migliori, María Laura

Ritmos circadianos en Caenorhabditis elegans

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Migliori, M. L. (2011). Ritmos circadianos en Caenorhabditis elegans. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/75

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad
Nacional
de Quilmes

Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Migliori, María Laura, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Agosto de 2012, pp. 170,
http://ridaa.demo.unq.edu.ar
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencias Básicas y Aplicadas

Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*

TESIS DOCTORAL

María Laura Migliori

lauramigliori1@gmail.com

Resumen

Los ritmos circadianos (del latín *circa* y *dies*: cerca de 24 horas) tienen un período de aproximadamente 24 horas y son originados por relojes biológicos que en diversos organismos han podido ser estudiados y caracterizados en detalle. Los ritmos circadianos son endógenos, es decir que se mantienen en ausencia de factores externos. Una importante propiedad de estos ritmos es su plasticidad ante la presencia de un sincronizador externo ("*zeitgeber*", o dador del tiempo). El sincronizador ambiental más importante es el ciclo de luz- oscuridad, pero también existen diferentes factores sociales capaces sincronizar al reloj. El sistema circadiano tiene tres componentes principales: 1) una vía de entrada del agente sincronizador; 2) estructuras marcapasos que generan la señal circadiana; y 3) vías eferentes desde las estructuras marcapasos a los sistemas efectores.

El presente trabajo consistió en el estudio de los ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*. Para tal propósito se midieron diferentes comportamientos rítmicos tales como el de actividad locomotora, alimentación, frecuencia de la bomba faríngea, defecación y actividad enzimática y hormonal en cepas controles y mutantes. Nuestros resultados muestran que, bajo condiciones de luz/oscuridad tales comportamientos presentan una variación diaria. Asimismo, para determinar si esos ritmos son endógenos se repitieron las mediciones en condiciones de oscuridad constante. Nuestros resultados sugieren que los ritmos circadianos en las diferentes variables se mantiene en dicha condición.

Una vez determinados los ritmos circadianos a registrar en estos animales, se abordó el estudio de su sincronización a través de estímulos ambientales relevantes (tales como el ciclo luz/oscuridad y la temperatura). Además, se estudió la capacidad de sincronización a ciclos LD en mutantes circadianos y de fotorrecepción. Finalmente, se realizó una búsqueda bioinformática de los principales genes circadianos conocidos en otras especies (tim, per, clock, bmal, cry, etc.) para determinar eventuales homologías que permitirán investigar el rol de los mismos en el reloj biológico de este nematodo, a través de estudios de expresión, localización funcional e inhibición de sus efectos.

Resulta de gran interés contar con modelos animales alternativos para el estudio de las bases genéticas y moleculares de procesos ligados al reloj circadiano. *Caenorhabditis elegans* es un gusano nematodo hermafrodita utilizado extensamente como modelo de investigación por su sencillez estructural y facilidad de realizar estudios genéticos. El presente trabajo permite incluirlo asimismo como un promisorio modelo para el estudio de los ritmos circadianos.

Abstract

Circadian rhythms (from the Latin words circa and dies: around 24 h) have a period of approximately 24 hours and are originated by biological clocks that have been studied and characterized in several species. Circadian rhythms are endogenous; they are maintained in the absence of external factors. An important property of these rhythms is its plasticity in the presence of an external synchronizer ("zeitgeber", or time giver). The main entraining agent is the light-dark cycle, but there are also diverse social factors that are able to synchronize the clock. The circadian system has three main components: (1) an input pathway, (2) the main oscillator, and (3) output pathways from the oscillator to overt rhythms.

The aim of this thesis was to study circadian rhythms in Caenorhabditis elegans. The study was focused on measuring different rhythmic behaviors such as locomotor activity, feeding, pharyngeal pump, defecation and enzymatic and hormonal activity in controls and mutant strains. Our results show that under conditions of light/dark such behaviors showed a daily variation. Also, to determine whether these rhythms are endogenous, measurements were repeated under conditions of constant darkness. Our results suggest that circadian rhythms in several variables are maintained in constant condition.

In addition, we studied circadian synchronization by light and temperature. We also investigated entrainment to LD cycles in circadian and photoreception mutants. Moreover, we performed a bioinformatics search of the key circadian genes known in other species (tim, per, clock, Bmal, cry, etc.) in order to determine eventual homologies that will allow to investigate their roles in the circadian clock f this nematode.

It is of great interest to take advantage of novel animal models in order to study the genetic and molecular processes linked to the circadian clock. Caenorhabditis elegans is a hermaphrodite nematode worm used extensively as a research model for its structural simplicity and ease for genetic studies. Indeed, the present work allows this model to be also included as a promising model for the study of circadian rhythms.

A Susana, Julio, Paula, Pablo, Analía y Marcos, por
acompañarme siempre.
Y a Diego,
por dejarme compartir parte de su tiempo.

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado final de la colaboración de muchas personas a las cuales quiero agradecer.

A Diego Golombek, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y por su confianza y paciencia.

¡Al equipo *C. elegans*! A Sergio Simonetta, Andres Romanowski, Eugenia Goya y Anastasia Herrero, por su ayuda desinteresada y entusiasta, y por la buena onda de todos los días.

A los demás integrantes del laboratorio de cronobiología: Leandro Casiraghi, Fernando Baidanoff, Ivanita Bussi, Patricia Agostino, Natalia Paladino, Jose Duhart, Luciano Marpegan, Juan Chiesa, Malena Mulfedele, Santiago Plano y Juliana Leone. Gracias por los mates y las facturas, y por llegar todos los días con ganas de pasarla bien. ¡Y a Gastón Pizzio!

A la Dra. Ruth Rosenstein y todo su equipo, especialmente a María Inés Keller Sarmiento.

A Matias Garavaglia, por colaborar con los análisis bioinformáticos de esta tesis.

A Mario Guido y la gente de su laboratorio, en especial a Diego Valdez.

A Vanina Rodríguez, Matilde Masini, Sandra Goñi, Julia Ousset, Flavia Cicconi, el Gaita y Mariano Belaich. Al grupo de los diez, a los chicos del laboratorio de Ingeniería y a Facundo Temprana. A ellos les quiero agradecer por haberme bancado todo este tiempo.

Y por supuesto, ¡a mi familia!

Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. El tiempo

II. Ritmos en la naturaleza (los ritmos biológicos)

III. Organización del sistema circadiano

IV. Modelos en cronobiología

V. Control de los ritmos circadianos

V. A. Mamíferos

V. B. Invertebrados

VI. Componentes moleculares de los relojes circadianos

VII. Modelo de estudio: Caenorhabditis elegans

VII. A. Ciclo de vida

VII. B. El sistema nervioso

VIII. Ritmos circadianos en Caenorhabditis elegans

VIII. A. Registro del movimiento y ritmos de actividad locomotora

VIII. B. Ritmos de respuesta a estrés

VIII. C. Proteínas de Caenorhabditis elegans homologas a proteínas reloj de insectos y mamíferos

HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL

CAPÍTULO 1. RITMOS CIRCADIANOS EN VARIABLES METABÓLICAS EN CAENORHABDITIS ELEGANS

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Ritmos circadianos y metabolismo

1.1.1. a. Relojes periféricos

1.1.1. b. Regulación circadiana de la alimentación

1.1.1.c. Control circadiano del metabolismo de la glucosa

1.1.1.d. Genes reloj y disrupciones metabólicas

1.1.2. Comportamiento de alimentación en Caenorhabditis elegans

1.1.3. Comportamiento de defecación en Caenorhabditis elegans

1.1.4. Consumo de oxígeno en Caenorhabditis elegans

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.2. OBJETIVOS

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

1.3.2. Ensayo de alimentación

1.3.3. Registro de la actividad de la bomba faríngea

1.3.4. Registro del ritmo de defecación

1.3.5. Consumo de oxígeno

1.3.6. Análisis de los datos

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Variación diaria en el consumo de alimento de nematodos adultos

1.4.2. Variación diaria y circadiana en la actividad de la bomba faríngea de nematodos adultos

1.4.3. Ritmo diario en el comportamiento de defecación de nematodos

1.4.4. Variación diaria y circadiana en el consumo de oxígeno de Caenorhabditis elegans

1.4.5. Discusión

CAPÍTULO 2. RITMOS DE MELATONINA Y ACTIVIDAD

DE ARILALQUILAMINA N-ACETILTRANSFERASA (AA-NAT) EN CAENORHABDITIS ELEGAS

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Melatonina

2.1.1. a. Síntesis y metabolismo de la melatonina

2.1.1. b. Regulación circadiana de la síntesis de Melatonina

2.1.1. c. Efectos de la luz sobre la síntesis de melatonina

2.1.1. d. Mecanismos de acción y efectos fisiológicos de la melatonina

2.1.2. Estructura y evolución de las AA-NAT

2.1.3. Melatonina y AA-NAT en invertebrados

2.2. OBJETIVOS

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

2.3.2. Determinación del contenido de melatonina

2.3.3. Determinación de la actividad de AA-NAT

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.3.4. Análisis de secuencias 142

2.3.5. Análisis de los datos

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Melatonina y actividad de AA-NAT en Caenorhabditis elegans

2.4.1. a. Síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT bajo condiciones de luz/oscuridad

2.4.1. b. Ritmo diario de actividad de AA-NAT bajo condiciones de oscuridad constante

2.4.1. c. Efecto de la luz en la actividad de AA-NAT

2.4.2. Identificación de posibles AA-NAT en Caenorhabditis elegans

2.4.3. Discusión

CAPÍTULO 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN CAENORHABDITIS ELEGANS

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos

3.1.1. a. Carácter endógeno de los ritmos circadianos

3.1.1. b. Sincronización

3.1.2. Enmascaramiento

3.1.3. Fotorrecepción en Caenorhabditis elegans

3.1.4. Termotaxis en Caenorhabditis elegans

3.1.5. Proteínas de Caenorhabditis elegans homólogas a proteínas reloj

3.2. OBJETIVOS

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

3.3.2. Registro de la actividad locomotora

3.3.3. Adquisición y análisis de los datos

3.3.4. Experimentos de sincronización

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Sincronización en ciclos luz/oscuridad

3.4.2. Sincronización por ciclos de temperatura

3.4.3. Comportamiento en condiciones de oscuridad constante

3.4.4. Compensación por temperatura

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4.5. Mutantes circadianos

3.4.6. Mutantes de fotorrecepción

3.4.7. Discusión

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

APÉNDICE

Lista de abreviaturas

5-HT Serotonina

AA-NAT Arilalquilamina N-acetiltransferasa

aBoc (del inglés, Anterior Body muscle Contraction)

AC Adenilato ciclasa

Ac-CoA Acetil coenzima A

ADN Ácido desoxirribonucleico

Ame Medula accesoria

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

ARNm ARN mensajero

ASMT N-acetilserotonina metiltransferasa

ATP Trifosfato de adenosina

AVP Vasopresina

b-HLH (del inglés, Basic-Helix-Loop-Helix)

cAMP Adenosina monofosfato cíclica

CGC Caenorhabditis Genetics Center

cGMP Guanosina monofosfato cíclica

CKIε Enzima caseína kinasa I épsilon

Cme Contracción del músculo entérico

CNG (del inglés, Cyclic Nucleotide-Gated)

CREB cAMP response element binding protein. Proteína de unión al citio CRE

CT Tiempo circadiano

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

DD	Ciclo de oscuridad constante (del inglés, Dark-Dark)
DMP	(del inglés, Defecation Motor Program)
FMP	Fascículo medial del pro encéfalo
FR	Formación reticular
FuDR	5-fluorodeoxyuridina
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GC	Guanilato ciclasa
GCS	Ganglio cervical superior
GFP	Proteína fluorescente verde
GNAT	GCN5-N-acetyltransferasa
Gr	Receptores gustativos (Gr)
GTP	Guanosina trifosfato
IML	Células intermedio laterales
LD	Ciclo de luz/oscuridad (del inglés, Light-Dark)
NAS	N-acetilserotonina
ND	Neuronas dorsales
NE	Norepinefrina
NGM	(del inglés, Nematode Growth Medium)
NLv	Neuronas ventro laterales
NPV	Núcleos paraventriculares
NPY	Neuropéptido Y
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NT	Neurotensina
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
pBoc	(del inglés, Posterior Body muscle Contraction)
pCREB	Forma fosforilada (activa) de CREB
PDF	(del inglés, Pigment Dispersing Factor)
PI	Pars intercerebralis
PKA	Proteína kinasa dependiente de cAMP
PKC	Proteína kinasa C

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

PKG Proteína kinasa dependiente de cGMP

QO Quiasma óptico

ROS (del inglés, Reactive Oxygen Species)

SNC Sistema nervioso central

SREBP (del inglés, Sterol Regulatory Element-Binding Protein)

Tc Temperatura de cultivo

TRH Tracto retinohipotalámico

TRP (del inglés, Transient Receptor Potential)

VIP Péptido vasoactivo intestinal

WT (del inglés, Wild-type)

ZT Tiempo del Zeitgeber

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Introducción general

I. El tiempo

El tiempo: el contexto primordial, un hecho incrustado en la vida y experimentado por todos los organismos de cualquier época.

JOHN GIBBON

Es extraño que un concepto tan utilizado por los seres humanos como es el tiempo sea tan difícil de definir. Hay múltiples concepciones sobre este concepto y, de hecho, para poder comprender qué pensaban e imaginaban otras civilizaciones sobre el tema, debemos olvidarnos por un momento de nuestra propia idea del tiempo.

Nuestra época está totalmente sumergida dentro de un *tiempo que pasa*, un tiempo que nunca se detiene. La búsqueda casi obsesionada de la juventud eterna es una consecuencia de que vivimos totalmente contenidos en esta variable. Seguramente el hombre primitivo no tenía esta conciencia: el tiempo era percibido como el *gran tiempo*, con un significado que hacía referencia a los mitos, a los dioses y a los espíritus. Un *gran tiempo*, el tiempo del sueño eterno, en el cual -y al igual que ocurre en los sueños- el pasado, presente y futuro se fusionan formando parte de una única realidad (Priestley 1966).

Las civilizaciones más antiguas, como la Mesopotamia y Egipto, tenían un concepto diferente del tiempo. Ya no estamos en presencia de aquellos grupos aislados o tribus de cazadores -el hombre primitivo- sino que estas civilizaciones formaban parte de grandes sociedades extremadamente ordenadas, organizadas, con la capacidad de construir ciudades y administrarlas, con fiestas regulares y ceremonias que se llevaban a cabo en fechas determinadas. Estas sociedades se acercaron más a un concepto de tiempo que no difiere mucho del de nuestra época: el *tiempo que pasa*, una cosa detrás de otra. Pero este concepto de tiempo era diferente a nuestro conocimiento abstracto, nuestro tiempo vacío e impersonal. Lo que ellos aceptaban era lo que Cassirer llamó *tiempo biológico* (Priestley 1966):

> Una secuencia de fases diferentes, siempre renovadas (pero mediante la voluntad, no automáticamente), tanto en la vida del hombre con sus *tiempos* profundamente diferentes entre la infancia y la vejez, como en la de la naturaleza, con el ritmo recurrente de las estaciones (Y aún no habían sido separados el hombre y la naturaleza; nada era todavía enteramente objetivo, un *ello* impersonal).

Los griegos tenían una idea *cíclica* del tiempo. De acuerdo a su cultura, creían que solamente los dioses eran inmortales y que el hombre tenía que morir. Pero esa idea cíclica del tiempo hacía que, de alguna manera, todos los seres humanos y sus bienes poseyeran cierta inmortalidad,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

justamente porque el tiempo, en lugar de hacerlos desaparecer de la faz de la Tierra, los traía de nuevo (Priestley 1966).

Trasladémonos ahora, y por un instante, al otro lado del mundo donde surgía la civilización maya (habitaron un área que hoy incluye el sur de México, Yucatán, Honduras y Guatemala). Los mayas estaban obsesionados por el tiempo. Creían en la existencia de *tiempos malos* y *tiempos buenos*, dado que pensaban que estaban a merced de dioses porteadores del tiempo benévolos y malévolos. Algunos historiadores piensan que para los mayas el tiempo avanzaba en línea recta, del pasado al futuro, transportados por dioses que llevaban a los hombres el bien, el mal o la indiferencia (Priestley 1966).

Pero, ¿qué entiende la ciencia por tiempo? Se podría afirmar que son los físicos las personas más preocupadas por el tiempo. Entre los hombres de ciencia, Newton fue uno de los primeros en establecer una definición del tiempo, como una magnitud absoluta, que fluye uniformemente, sin relación con nada externo. Para Newton era posible medir el intervalo de tiempo entre dos sucesos, siendo dicho intervalo igual para todas las personas que lo midieran. Sin embargo, hacia principios del siglo XX Einstein estableció que el tiempo no es absoluto, sino relativo a la ubicación del observador – es decir, si un rayo de luz necesita tiempo para llegar a nuestros ojos, necesitará más tiempo cuanto más lejos estemos de él – (Priestley 1966).

Sin embargo, ¿son los físicos las únicas personas preocupadas por el tiempo? Hasta no hace mucho tiempo, para la Biología y la Medicina lo más importante era saber *dónde* y *cómo* sucedían las cosas. Pero fue recién a mediados del siglo XX, con el surgimiento de la Cronobiología, que comenzó a tomar importancia el *cuándo* ocurren las cosas. Esta ciencia joven supo demostrar que todas las funciones fisiológicas, bioquímicas y de comportamiento se repiten con un determinado período. Seguramente, el hecho de vivir en un planeta que gira con un período de 24 horas condicionó a muchos de nuestros ritmos biológicos a la presencia de ritmos diarios.

Claro que este tiempo biológico también es relativo. El paso del tiempo es algo individual, diferente en cada situación. Para el niño o el apresurado viajero, puede parecer que el tiempo se mueve de manera penosamente lenta. Para quienes disfrutan de sus vacaciones en sillas de lona o para la abrazada pareja, el tiempo quizá casi se ha inmovilizado.

II. Ritmos en la naturaleza (los ritmos biológicos)

Una primera evidencia acerca de cambios periódicos y rítmicos en la fisiología humana fue reportada por el fisiólogo y físico Sanctorius en 1647. Construyó una gran balanza en la cual se pesaba en cada una de sus comidas; así, durante 30 años anotó su peso y los cambios en su condición física y observó que su peso fluctuaba con un ritmo mensual y diario, de forma paralela a la turbidez de la orina.

Pero las primeras observaciones reportadas de los ritmos biológicos se remontan a los tiempos de Alejandro Magno. Fue en una de sus expediciones que Andróstenes, uno de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cronistas que acompañaba a Alejandro en sus campañas, observó que las hojas de las plantas de tamarindo se elevaban hacía el sol durante el día y se retraían durante la noche. Esta temprana observación fue confirmada experimentalmente recién en el siglo XVIII por un astrónomo francés, Jean Jacques d'Ortous de Mairan, quien estudió el movimiento de las hojas de una planta sensitiva, *Mimosa pudica*. Observó que las hojas de la planta se mantenían extendidas durante el día y se retraían durante la noche. Para demostrar que ese movimiento no era una simple respuesta pasiva a un estímulo cíclico ambiental, De Mairan realizó un nuevo experimento: colocó la maceta en una habitación dentro de la cual no llegaba la luz solar y observó que las hojas de la *Mimosa* aún se seguían moviendo. Este trabajo, el cual fue publicado en el año 1729, sugería la presencia de un reloj endógeno con un período cercano a las 24 horas capaz de mantener el movimiento rítmico de las hojas aún en ausencia de estímulos ambientales.

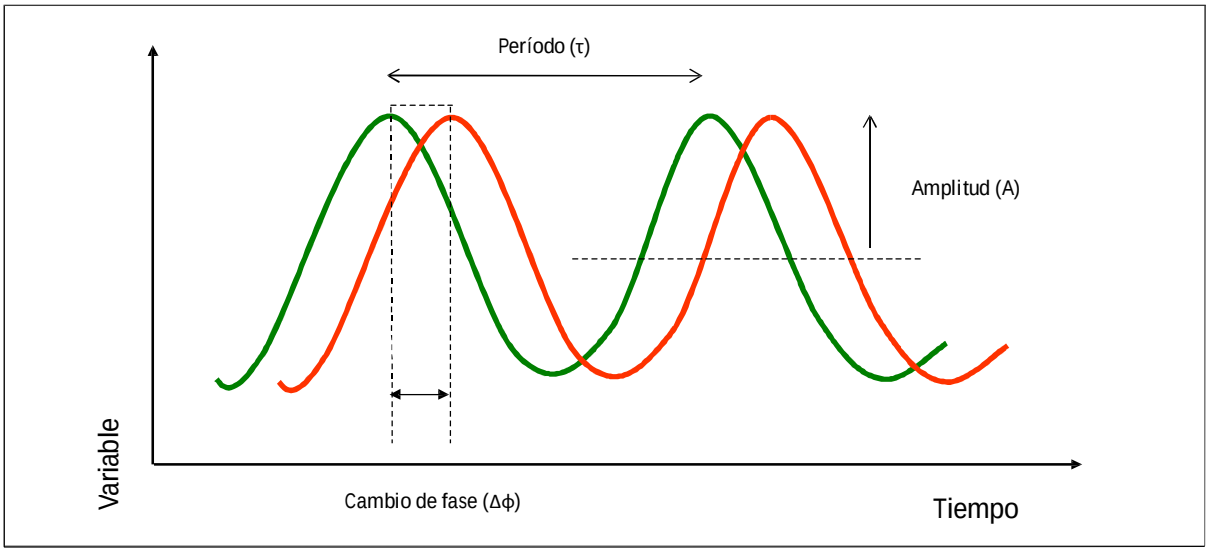
Muchas otras observaciones acerca de ritmos biológicos fueron realizadas también en plantas. Es el caso de Linneo, un conocido botánico sueco, que también estudió el movimiento rítmico de las plantas. Linneo observó que ciertas plantas abrían y cerraban sus flores en diferentes momentos del día. Esto lo llevó a crear un "reloj floral", en el cual se puede saber la hora dependiendo de que flores están abiertas o cerradas (Figura 1).

Hoy en día se sabe que la mayoría de los organismos estudiados poseen un reloj endógeno que les permite anticiparse a la naturaleza cíclica del universo. Por ejemplo, los animales capaces de anticipar la llegada de la estación fría pueden iniciar la migración con tiempo suficiente para no morir congelados o bien programar la reproducción de modo que las crías nazcan en el momento más adecuando. El cambio de pelaje de ciertos animales y el movimiento rítmico de las hojas de muchas plantas son algunos otros ejemplos que demuestran esta naturaleza predictiva que permite a los individuos anticiparse a los cambios ambientales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 1. El reloj floral de Lineo en el cual se puede saber la hora de acuerdo a qué flores están abiertas o cerradas.

Un ritmo puede definirse como un conjunto de eventos que se suceden de una manera ordenada y periódica. Para caracterizar un ritmo se pueden definir una serie de parámetros: período (τ), amplitud (A) y fase (φ). El *período* se define como el intervalo de tiempo entre dos sucesos idénticos, o sea, la duración de un ciclo; la *amplitud* es la distancia entre el valor medio de la variable y el máximo valor que alcanza dicha variable a lo largo del período; y la *fase* nos dice en qué momento del ciclo temporal está situada la variable en estudio (Figura 2).



Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Figura 2. Parámetros característicos de un ritmo: período, amplitud y fase.

Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo a su período (Tabla 1). En particular, el hecho de vivir en un planeta que gira con un período de 24 horas condicionó a muchos ritmos biológicos a la presencia de esos ciclos diarios. Estos ritmos se denominan **circadianos** (del latín *circa*, cerca de y *dies*, día). Por ejemplo, en los seres humanos existe una diferencia diaria de más de 1ºC en la temperatura corporal entre el punto más alto (que ocurre a la tarde) y el más bajo (que ocurre durante la noche). Los ritmos **ultradianos** son aquellos que tienen un período menor a las 24 horas, como por ejemplo el ritmo respiratorio, cuyo período es de aproximadamente 6 segundos. Los ritmos con período mayor a 24 horas se llaman **infradianos**, y ejemplo de ellos son el ciclo menstrual y el ciclo de hibernación.

TIPO DE RITMO	PERIODO	EJEMPLOS
Ultradiano	0,1 seg. 1 seg. 6 seg. 60 min.	Electroencefalograma Ritmo cardíaco Ritmo respiratorio Secreciones hormonales
Circadiano	24 horas	Actividad – Reposo Temperatura corporal
Infradiano	28 días 365 días	Ciclo menstrual Hibernación

Tabla 1. Frecuencia de los ritmos biológicos.

III. Organización del sistema circadiano

Los ritmos biológicos se encuentran en todos los niveles de organización de un organismo y ocurren en todas las especies estudiadas, sean procariontes o eucariontes, plantas o animales. Bajo condiciones naturales, y en el caso de ritmos diarios, se observa que el período de un organismo es de exactamente 24 horas. Sin embargo, en ausencia de cambios ambientales (o sea en condiciones constantes, también denominado libre curso o *free running*), los ritmos continúan con un período cercano pero diferente a las 24 horas. Bajo estas condiciones, se dice que un organismo expresa ritmos *circadianos*. Ciertos animales nocturnos como el ratón presentan en general un período circadiano menor a las 24 horas, mientras que el hombre tiene un período circadiano mayor a las 24

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

horas (Aschoff 1960). Esto sugiere la existencia de un reloj endógeno, llamado reloj circadiano, cuya periodicidad es de aproximadamente 24 horas.

Los ritmos circadianos presentan ciertas propiedades fundamentales que fueron definidas por Colin Pittendrigh en 1960: (1) los ritmos circadianos son endógenos, (2) el período endógeno (τ) es diferente en distintas especies y es independiente de la temperatura, es decir que compensa sus variaciones ($Q_{10} \cong 1$), y (3) los ritmos circadianos se sincronizan por ciclos medioambientales de período T, siendo el más importante el ciclo de luz/oscuridad (Pittendrigh 1960).

Al sistema circadiano se lo puede resumir como un sistema de tres componentes principales (Figura 3): un agente sincronizador, o componente exógeno (usualmente denominado *zeitgeber*, que significa "dador de tiempo"); un oscilador central, o componente endógeno (también denominado reloj circadiano o reloj biológico); y los ritmos biológicos (Moore 1983; Moore y Card 1985; Morin y Allen 2006). Cabe destacar que tanto o más importante que estos componentes son las relaciones entre ellos: el mecanismo de sincronización entre el *zeitgeber* y el reloj y el mecanismo de acoplamiento entre el reloj y los ritmos que controla.

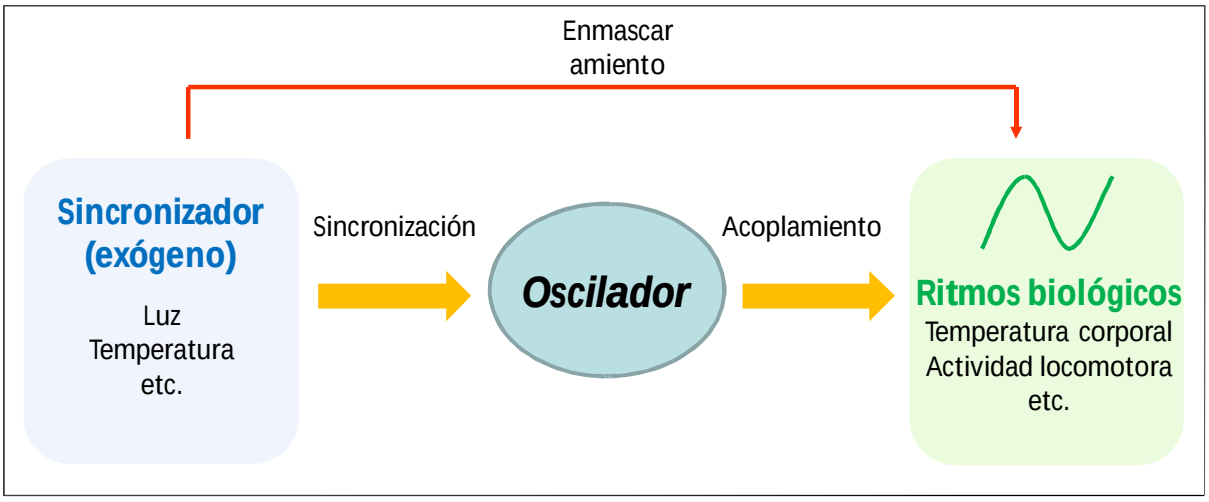


Figura 3. Componentes principales del sistema circadiano.

Los ciclos ambientales actúan como sincronizadores del reloj circadiano. El sincronizador ambiental más poderoso, tanto para los animales como para las plantas, es el ciclo de luz/oscuridad (Aschoff, et al. 1975). Sin embargo, bajo determinadas condiciones el *Zeitgeber* no sincroniza al reloj sino que afecta directamente la salida del mismo. A ese fenómeno se lo conoce como enmascaramiento (Mrosovsky 1999).

IV. Modelos en cronobiología

La importancia adaptativa de poseer un reloj endógeno que nos permite poder anticiparnos a la naturaleza cíclica del universo ha sido estudiada en diferentes sistemas modelos, tales como hongos, bacterias, plantas y animales. Por otra parte, estos sistemas nos ayudan a poder descifrar y entender los mecanismos moleculares del reloj circadiano.

El hongo filamentoso *Nuerospora crassa* es un organismo modelo que ha sido extensamente utilizado en el estudio de los ritmos circadianos. La utilidad de *N. crassa* como un organismo modelo en esta área de investigación se debe tanto a la posibilidad de poder registrar fácilmente su comportamiento circadiano, así como también a la utilización de herramientas tanto moleculares como genéticas para su estudio (Heintzen y Liu 2007). Su genoma completamente secuenciado ha impulsado aún más el valor de *N. crassa* como modelo en el estudio de los ritmos circadianos así como también en otras áreas de investigación (Borkovich, et al. 2004). El método que comúnmente es utilizado para poder estudiar el comportamiento circadiano de *N. carassa* consiste en cultivar a los hongos en un tubo de vidrio en el cual previamente se coloca un medio de cultivo adecuado para su crecimiento (Loros y Dunlap 2001). Esta metodología permite visualizar fácilmente la producción de conidias. Por otra parte, su analogía con el mecanismo molecular de oscilación circadiana de otros organismos permitió también realizar en este hongo estudios de las vías de sincronización por luz y temperatura (Liu 2003).

Las cianobacterias se encuentran entre los organismos más antiguos conocidos y con el correr de los años se han convertido en organismos modelo para el estudio de los ritmos circadianos en procariotas. Algunas de las características que hace de las cianobacterias un organismo modelo son su pequeño tamaño genómico, la facilidad con la que pueden ser manipuladas genéticamente por transformación o conjugación (Golden y Sherman 1984; Elhai y Wolk 1988), y la disponibilidad de vectores para estudios genéticos y moleculares (Golden y Sherman 1983). Actualmente se sabe que muchas especies poseen un sistema circadiano que controla su metabolismo y ciclo de división celular (Golden, et al. 1997; Wijnen y Young 2006). Experimentos de co- cultivo realizados con cepas de *Synechococcus elongatus* que presentan diferentes propiedades en el funcionamiento de su sistema circadiano demostraron una clara ventaja reproductiva en aquellas células cuyo reloj biológico estaba intacto (Woelfle, et al. 2004).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

El mecanismo molecular del reloj circadiano ha sido extensamente estudiado en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Ashmore y Sehgal 2003). Su genoma totalmente secuenciado, la gran capacidad de mapeo de mutaciones conjuntamente con la automatización del registro locomotor y de eclosión, permitieron establecer las pautas genéticas que determinan los ritmos circadianos en *D. melanogaster*, y descubrir más tarde que existe una estrecha homología entre invertebrados y mamíferos en el control de este comportamiento. Asimismo, el hallazgo de las neuronas laterales encargadas de controlar el ritmo locomotor en las moscas permitió descubrir que esta homología no es tan sólo a nivel genético, sino también fisiológico (Panda, et al. 2002b). El estudio cronobiológico de las moscas ofrece un excelente ejemplo de cómo los organismos modelo pueden facilitar el estudio de mecanismos moleculares tan complejos como lo es el ritmo de sueño/vigilia en humanos.

El ratón (*Mus musculus*) es uno de los modelos vertebrados más cercano a los humanos, y ha sido el organismo modelo más extensamente utilizado en el estudio de los ritmos circadianos. El primer gen reloj identificado en mamíferos fue *Clock*, descubierto a través de un ensayo de búsqueda por mutagénesis en ratones (Vitaterna, et al. 1994). Su genoma completamente secuenciado, su relativamente corto periodo de gestación (de 19 a 21 días) y la posibilidad de poder realizar genética reversa son algunas de las características que hacen del ratón un organismo modelo en cronobiología, así como también en otras áreas de investigación. Por otra parte, el hamster dorado (*Mesocricetus auratus*) es un roedor comúnmente usado en laboratorio para una variedad de temas de investigación. La elección de este modelo en cronobiología se basa en el extenso conocimiento de su sistema circadiano, debido a la robustez y predictibilidad de sus ritmos.

Un organismo modelo que es muy utilizado en diversos estudios genéticos, muy especialmente en genética del desarrollo, es el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Su genoma totalmente secuenciado, la cantidad de mutaciones puntuales caracterizadas disponibles a través del Caenorhabditis Genetics Center (CGC), su corto periodo de vida y su fácil manipulación y cultivo, hacen de este nematodo un modelo ideal de estudio para interacciones entre genes y comportamiento. En años recientes se ha propuesto a este organismo como modelo en cronobiología debido tanto a las características mencionadas anteriormente así como también a la automatización del registro de su comportamiento locomotor (Simonetta y Golombek 2007).

Todos estos sistemas nos permiten conocer en detalle la anatomía y fisiología de los relojes circadianos, así como también descifrar y entender los mecanismos moleculares mediante los cuales opera. En varios organismos se conocen y se aislaron mutaciones genéticas que alteran el período circadiano y/o la respuesta a la luz de los

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mismos, como por ejemplo en *D. melanogaster* (Konopka y Benzer 1971) y en Neurospora (Feldman y Hoyle 1973).

V. Control de los ritmos circadianos

La mayoría de los organismos sensibles a la luz -desde las cianobacterias hasta los humanos- poseen un reloj circadiano que controla su fisiología y comportamiento, permitiéndoles de esa manera adaptarse a los cambios cíclicos que ocurren en la naturaleza. La identificación anatómica del reloj biológico de diferentes organismos, la caracterización de sus componentes moleculares, y como el reloj circadiano se sincroniza con el medio ambiente ha sido tema de estudio por muchos años (y lo sigue siendo aún).

V. A. Mamíferos

El componente principal del reloj biológico de mamíferos son los núcleos supraquiasmaticos (NSQ), dos grupos de células nerviosas que están localizadas en la base del tercer ventrículo, sobre el quiasma óptico, en la parte anterior del hipotálamo (Figura 4). Los NSQ están compuestos por una población heterogénea de células, incluyendo múltiples clases de neuronas y astrocitos (Welsh, et al. 2010). La lesión o ablación de los NSQ provoca la desaparición de los ritmos circadianos de secreción hormonal, actividad locomotora y bebida, entre otros. Más aún, transplantes de tejido hipotalámico conteniendo los NSQ en animales lesionados restauran los ritmos circadianos de estos últimos, induciendo la ritmicidad del donante en el receptor (Ralph y Lehman 1991).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

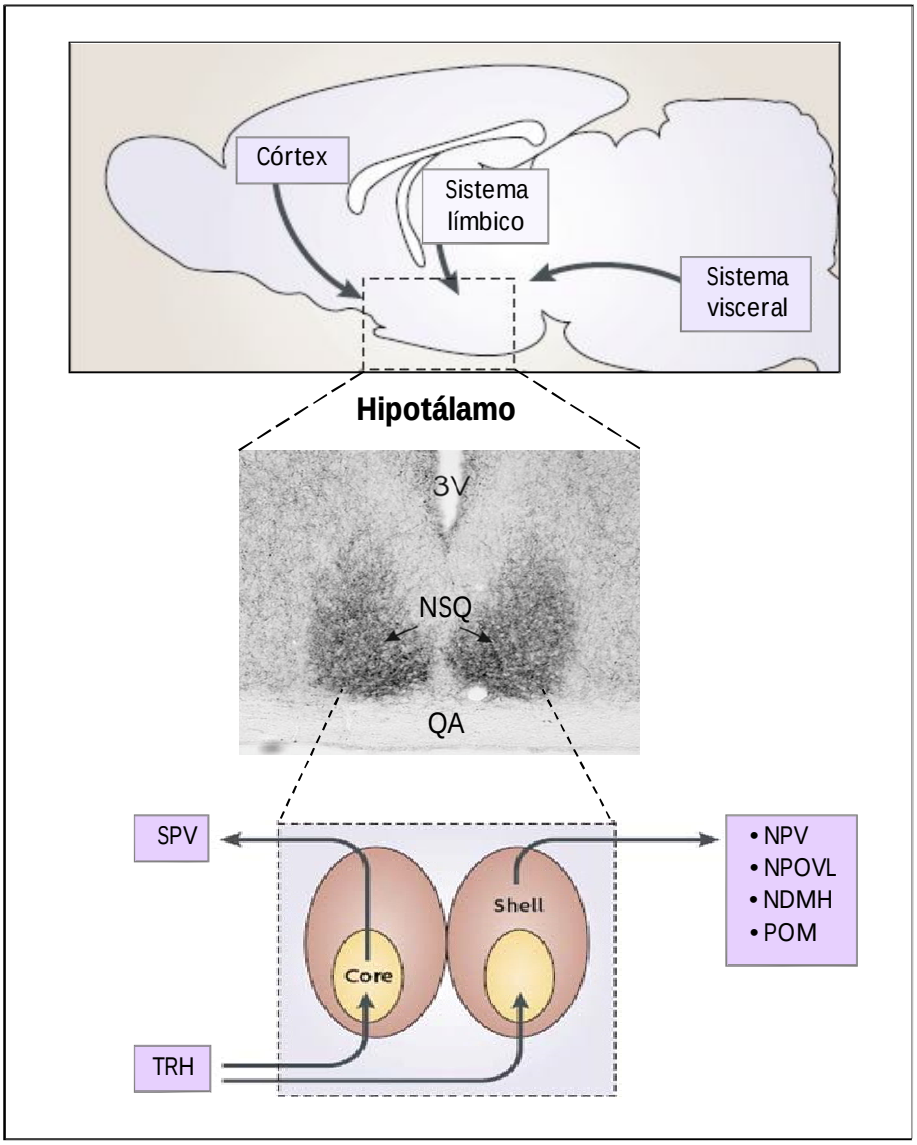


Figura 4. Los núcleos supraquiasmáticos. En ratones, los NSQ están divididos en dos regiones: una región ventral (también denominada "core"), y una región dorsal (también denominada "shell"). La región ventral recibe información del fotoperíodo a través del tracto retino hipotalámico (TRH). Los mecanismos de salida de los NSQ son los responsables de los ritmos circadianos en diversas funciones fisiológicas tales como el ciclo sueño/vigilia, la alimentación, la termorregulación y las secreciones hormonales. Las señales de salida de los NSQ de la zona supraventricular (SPV) retransmite la señal a la región pre óptica media (POM) para controlar el ritmo circadiano de la temperatura corporal, y una proyección separada a través del núcleo dorsomedial del hipotálamo (NDMH) controla los ritmos diarios de las secreciones hormonales a través de el núcleo paraventricular (NPV) y el ciclo sueño/vigilia a través del núcleo pre óptico ventro lateral (NPOVL). Modificado de Takahashi et al., 2008.

En ratones, cada NSQ contiene aproximadamente 10.000 neuronas distribuidas en dos regiones anatómicas diferentes, una región ventral (también denominada "*core*") la cual está en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

contacto con el quiasma óptico y recibe el *input* de la retina, y una región dorsal (también denominada "*shell"*) la cual recibe el *input* desde el *core* (Figura 4).

La región ventral se distingue de la región dorsal por su contenido neuroquímico (Welsh, et al. 2010). Dentro de cada región ventral hay aproximadamente 1.100 neuronas que contienen el polipéptido vasoactivo intestinal (VIP), y un pequeño número de células que contiene calretinina (900), neurotensina (NT; 700), y el péptido liberador de gastrina (500). Dentro de cada región dorsal hay aproximadamente 2.100 neuronas que contienen vasopresina (AVP), aproximadamente 1.100 neuronas que contienen angiotensina II y 500 neuronas que contienen met-encefalina. En la mayoría de las neuronas de cada NSQ los neuropéptidos mencionados anteriormente colocalizan con GABA (ácido γ-aminobutírico), aunque algunas células pueden ser glutamatérgicas (Moore y Speh 1993; Cui, et al. 2001). La mayoría de las sinapsis entre las neuronas de los núcleos supraquiasmaticos son GABAérgicas (Strecker, et al. 1997). Los NSQ se comunican con el resto del organismo vía proyecciones nerviosas y humorales, tanto para las vías de entrada como para las de salidas.

El reloj biológico puede ser sincronizado por diferentes estímulos del ambiente. Cualquier ciclo ambiental puede actuar como *zeitgeber*, siempre que la especie sea sensible a él. Sin embargo, en la mayoría de los organismos el principal agente sincronizador es el ciclo de luz/oscuridad. La luz es percibida por el sistema circadiano a través de fotorreceptores especializados. En mamíferos el fotorreceptor circadiano principal es la melanopsina. Este fotorreceptor pertenece a la familia de las opsinas y está localizado en un grupo de células ganglionares en la retina del ojo.La luz llega al reloj biológico a través de una vía denominada tracto retino-hipotalámico (TRH) (Dibner, et al. 2010). La misma está formada por axones provenientes de las células ganglionares de la retina que contienen melanopsina, y el principal neurotransmisor involucrado es el glutamato (Ebling 1996) (Figura 5).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

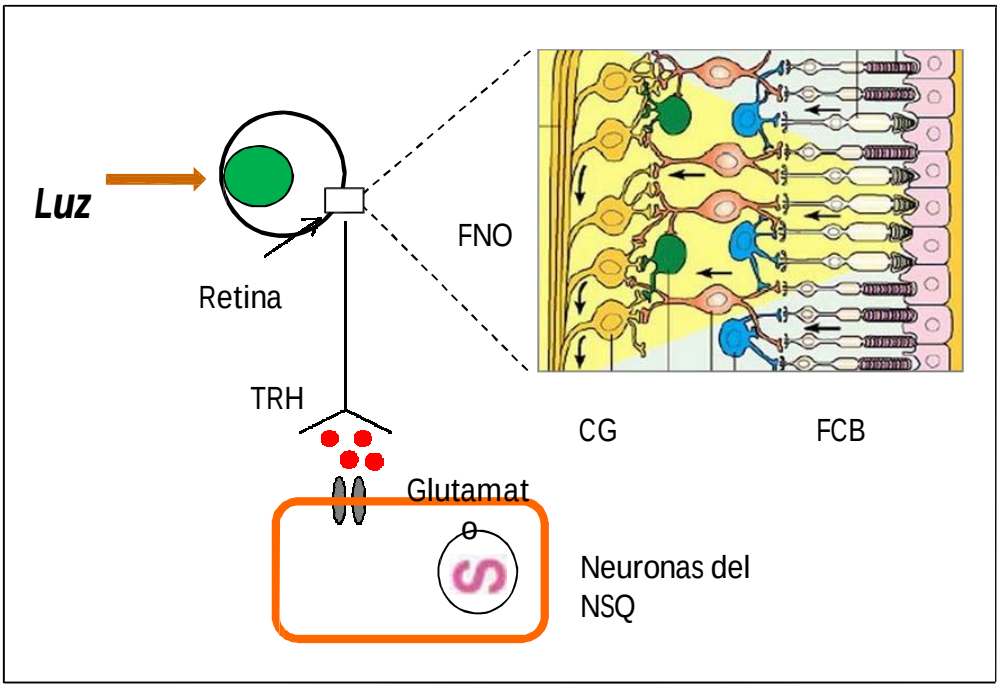


Figura 5. Esquema de la vía de entrada del reloj. La luz llega al reloj biológico a través de una vía denominada tracto retino hipotalámico (TRH). La misma está formada por axones provenientes de las células ganglionares de la retina que contienen melanopsina. Abreviaturas: FNO = fibras del nervio óptico, CG = células ganglionares, FCB = fotorreceptores, conos y bastones.

Actualmente se sabe que tanto las células ganglionares que expresan melanopsina como los fotorreceptores tradicionales (conos y bastones) participan en la sincronización fótica (Berson, et al. 2002; Hattar, et al. 2003; Panda, et al. 2003; Doyle, et al. 2006; Nayak, et al. 2007).

V. B. Invertebrados

En la mayoría de los animales el reloj biológico principal está ubicado en el cerebro, y los insectos se encuentran entre los primeros animales en los cuales se ha descubierto que su reloj circadiano se ubica en áreas específicas dentro del cerebro (Helfrich-Forster, et al. 1998).

El reloj biológico de mamíferos e insectos presenta ciertas similitudes: (1) ambos relojes están anatómicamente y funcionalmente conectados a órganos fotorreceptivos, permitiendo de esa manera su sincronización con el ciclo de luz/oscuridad del medio ambiente, (2) ambos poseen múltiples mecanismos de salida que controlan sus funciones endocrinas, metabólicas y de comportamiento, y (3) ambos relojes están compuestos por poblaciones de neuronas con diferente morfología, fisiología y contenido en neurotransmisores (Helfrich-Forster 2004).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En una gran variedad de insectos (escarabajos, cucarachas, grillos y moscas) el reloj circadiano central se localiza en una región específica del cerebro denominada medula accesoria (AMe), ubicada en la base del lóbulo óptico (Helfrich-Forster 2004). Diversos estudios indican que la AMe por sí sola es capaz de controlar los ritmos comportamentales en estos organismos, al igual que ocurre en mamíferos con los NSQ. En insectos, el neuropéptido PDF (del inglés *Pigment Dispersing Factor*) participa en la sincronización de las neuronas individuales del reloj, y es esencial para un comportamiento rítmico normal en estos animales (Renn, et al. 1999; Wulbeck, et al. 2008). El neuropéptido VIP juega un rol similar en el sistema circadiano de mamíferos.

Una de las AMe mas caracterizadas es la de la cucaracha *Leucophaea maderae* (Figura 6A). Cada AMe contiene aproximadamente 300 neuronas, y al igual que los NSQ está dividida en dos regiones: dorsal y ventral. Ambas regiones están constituidas por diferentes poblaciones neuronales (Homberg, et al. 2003). Todas las neuronas que forman parte de la AMe expresan el neuropéptido PDF, serotonina y GABA, entre otros. En *L. maderae* la luz llega al sistema circadiano indirectamente a través de fotorreceptores ubicados en el ojo compuesto (o cera de él), vía el tracto distal (Homberg, et al. 2003).

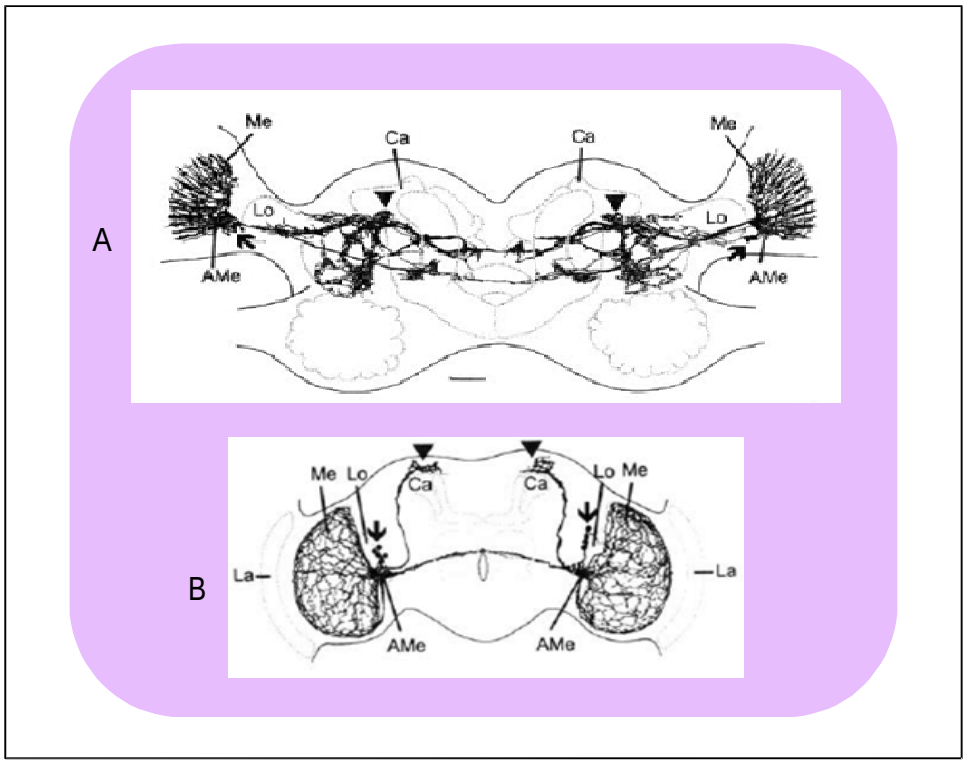


Figura 6. Localización del reloj circadiano en el cerebro de insectos. El reloj biológico central de una gran variedad de insectos se localiza en una región específica del cerebro denominada medula accesoria (AMe), ubicada en la base del lóbulo óptico (Lo). A) Cerebro de la cucaracha Leucophaea maderae. B) Cerebro de Drosophila melanogaster. Abreviaturas: Ca = calyces, Me = médula), La = lámina. Modificado de Helfrich-Forster et al., 1998.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En la mosca de la fruta *D. melanogaster* la región del cerebro responsable de los ritmos circadianos también ha sido caracterizada (Figura 6B). En este organismo la AMe está rodeada por un grupo de células denominadas neuronas ventro laterales (NLv) que expresan el neuropéptido PDF, pero también recibe axones provenientes de algunas neuronas dorsales (ND_1 y ND_3). El componente principal del reloj biológico de *D. melanogaster* son las NL (NLv y NLd), y el protocerebro dorsal tiene un rol importante en la vía de salida del reloj (Helfrich- Forster 2004). El reloj circadiano de *D. melanogaster* recibe la luz de forma directa a través del órgano fotorreceptor extra retinal, vía el tracto H-B (Helfrich- Forster 2005).

Otro organismo en el cual su reloj biológico ha sido identificado anatómicamente es en el escarabajo *Anthia sexguttata*. Diversos experimentos mostraron que los ganglios ópticos (derecho e izquierdo) de este animal son el componente principal de su reloj circadiano. Estas neuronas pueden funcionar de manera independiente al resto del cerebro controlando los ritmos circadianos en su fisiología y comportamiento (Fleissner 1982).

Existen similitudes anatómicas y funcionales en la estructura jerárquica del oscilador central entre las diferentes especies de animales. Estos circuitos neuronales son los encargados de coordinar el comportamiento rítmico de la fisiología de los organismos multicelulares a través de vías de señalización (salida del reloj). Asimismo, muchos de los genes que forman parte de la maquinaria molecular del reloj circadiano de mamíferos se encuentran conservados en la mayoría de los organismos.

VI. Componentes moleculares de los relojes circadianos

La base molecular de todos los relojes circadianos estudiados hasta el momento consiste en una serie de mecanismos de retroalimentación negativa entre componentes genéticos específicos (Dunlap 1999). Estos componentes genéticos (denominados “genes reloj”) y sus productos proteicos, generan un patrón de oscilación mediante su expresión cíclica. En el sistema básico de oscilación del reloj, un componente positivo promueve la síntesis de un componente negativo que, al acumularse, reprime su propia síntesis (Figura 7). Todos estos mecanismos de oscilación están fuertemente regulados, tanto a nivel transcripcional como traduccional y post-traduccional (Dunlap 1999; Okamura, et al. 2002).

Mediante técnicas de mutagénesis dirigida varios componentes del reloj molecular fueron descubiertos en diferentes organismos, primero en moscas y hongos (Hall y Rosbash 1987), y posteriormente en ratones (Takahashi, et al. 1994). El primer gen reloj fue aislado en *D. melanogaster* y se lo denomino *Period* (*Per*) (Konopka y Benzer 1971; Bargiello, et al. 1984; Zehring, et al. 1984).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

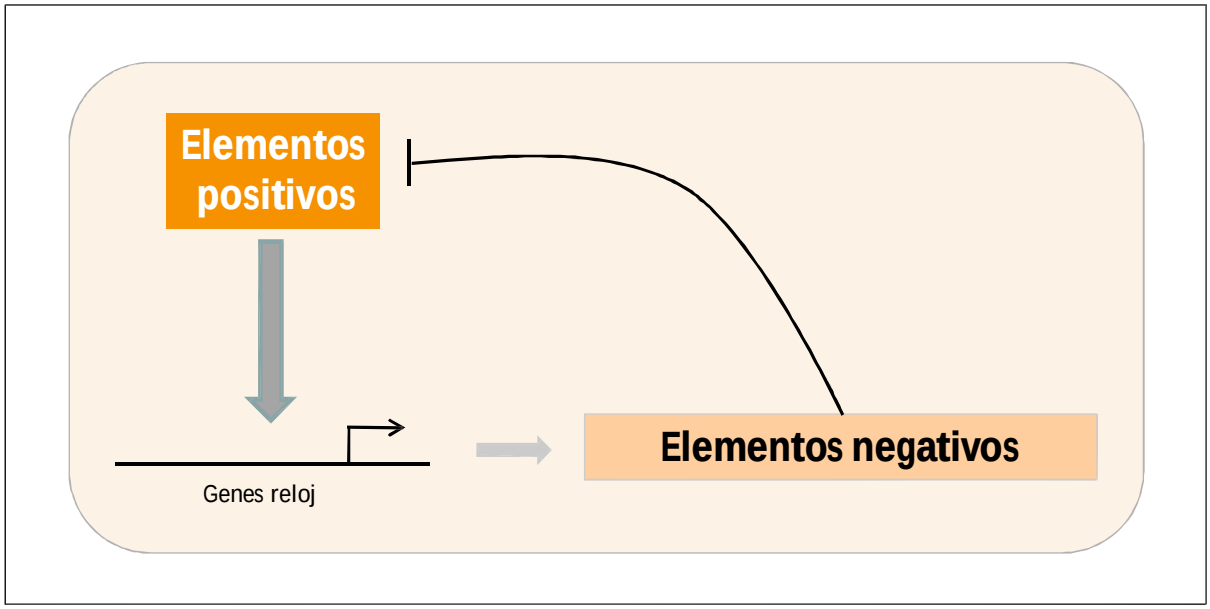


Figura 7. Sistema básico de oscilación de los relojes biológicos. En el sistema básico de oscilación del reloj, un componente positivo promueve la síntesis de un componente negativo que, al acumularse, reprime su propia síntesis. Este mecanismo de retroalimentación negativa se encuentra conservado desde bacterias hasta mamíferos.

En mamíferos, el reloj circadiano está formado por un mecanismo primario de retroalimentación negativa que involucra los genes *Clock* (del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*), *Bmal1* (del inglés *Brain and Muscle ARNT-Like protein*), el homólogo a *Period* (*Per1*), *Per2*, *Criptocromo 1* (*Cry1*) y *Cry2* (Takahashi, et al. 2008). CLOCK y BMAL1 funcionan como elementos positivos del reloj, ambas proteínas pertenecen a las proteínas de la familia PAS (en referencia a las proteínas PER, ARNT y SIM de *D. melanogster*). Los miembros de la familia PAS poseen un dominio b-HLH (del inglés *basic-Helix-Loop-Helix*) y la capacidad de activación transcripcional. PAS es un dominio de dimerización que permite la unión a otras proteínas con dominio PAS y el dominio b-HLH permite la unión al ADN (ácido desoxirribonucleico). De esta manera, el heterodímero formado por CLOCK y BMAL se une a una región del ADN llamada E-box (cuya secuencia es CACGTG) (Munoz, et al. 2002) y regula positivamente la transcripción de los genes *Per* y *Cry*. Las proteínas PER1, PER2, CRY1 y CRY2 funcionan como elementos negativos del reloj. PER y CRY se unen formando heterodímeros que regulan negativamente su propia transcripción interactuando con el complejo CLOCK-BMAL1 (Figura 8).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

El mecanismo secundario de retroalimentación negativa involucra al gen *Rev-erbα*, un receptor nuclear cuya transcripción es activada por el dímero CLOCK-BMAL. A su vez, la proteína REV-ERB es capaz de reprimir la síntesis de *Bmal* actuando sobre los elementos de respuesta a Rev-Erb/ROR presentes en el promotor de *Bmal* (Preitner, et al. 2002; Ueda, et al. 2002) (Figura 8).

Durante los ciclos de retroalimentación negativa, activadores y represores transcripcionales, modificaciones post-traduccionales y degradación de proteínas reloj son cruciales para mantener la periodicidad circadiana. La principal proteína kinasa capaz de fosforilar a PER (y CRY) es la enzima caseína kinasa I epsilon (CKIε). La fosforilación de las proteínas por CKIε promueve su ubiquitinización y degradación vía el proteosoma. Todos estos mecanismos de oscilación y regulación hacen que los componentes positivos se expresen en antifase con respecto a los componentes negativos, esto genera un ritmo circadiano con *Cry*, *Per1* y *Per2* máximos durante el día, y *Bmal* máximo durante la noche (en mamíferos la expresión de *Clock* es constitutiva o presenta oscilaciones circadianas de muy baja amplitud).

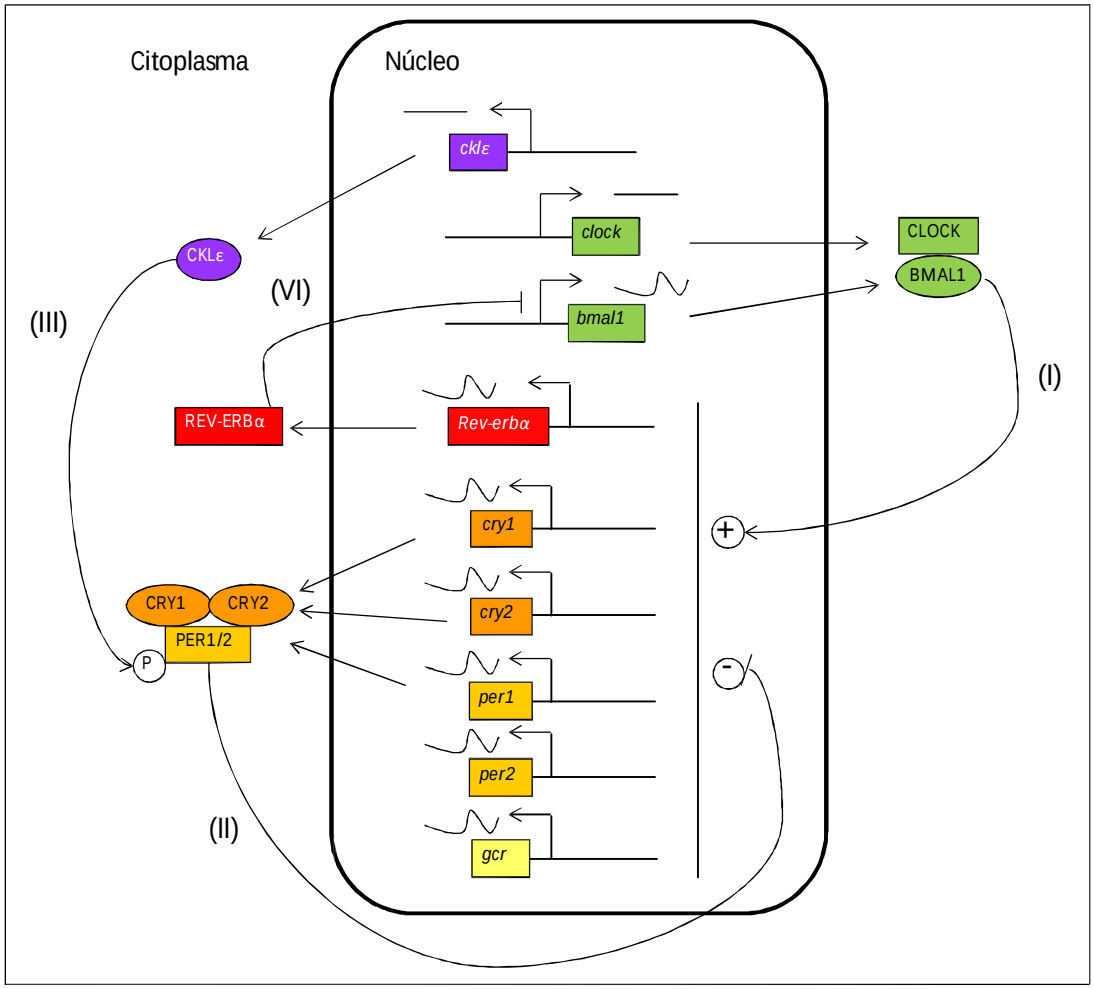


Figura 8. Esquema del mecanismo molecular de oscilación del reloj en mamíferos. La base molecular del reloj circadiano consiste en una serie de mecanismos de retroalimentación negativa

entre componentes genéticos específicos. (I) El dímero entre las proteínas CLOCK y BMAL1 (elementos positivos) activan la transcripción de los genes *per* y *cry*. (II) Los elementos negativos PER (PER1 y PER2) y CRY (CRY1 y CRY2) forman multímeros que translocan al núcleo e inhiben la activación de la transcripción inducida por CLOCK y BMAL1. (III) La retroalimentación negativa de las proteínas CRY y PER sobre la transcripción de sus propios genes es retrasada por la fosforilación de las proteínas PER por la acción de CKIε. (VI) La transcripción de REV-Erbα es también activada por CLOCK-BMAL1 e inhibida por el complejo PER-CRY, produciendo una oscilación en los niveles de REV-Erbα, una proteína que, a su vez, inhibe la transcripción de *bmal1*. El resultado de estos ciclos de retroalimentación es la oscilación en los niveles de ARNm y proteínas de varios de los genes reloj y de genes controlados por el reloj (GCR).

El reloj circadiano de *D. melanogaster* está formado por un mecanismo de retroalimentación negativa que involucra los genes *Period* y *Timeless* (*Tim*) y dos genes adicionales *dClock* (*dClk*) y *Cycle* (*Cyc*) (ortólogos a mamíferos) (Benito, et al. 2007). dCLOCK y CYC contienen tanto un dominio de unión al ADN (b-HLH) como un dominio PAS. De esta manera, el heterodímero formado por dCLOCK y CYC se une al ADN en el elemento E-box encontrado en los promotores de losgenes *Per* y *Tim*, activando de esta manera la transcripción de los mismos. Las proteínas PER y TIM funcionan como elementos negativos del reloj. Al igual que ocurre en mamíferos, la expresión de *Clock* es constitutiva o presenta oscilaciones circadianas de muy baja amplitud. Adicionalmente, otros tres componentes del reloj han sido identificados en este organismo: *Doubletime* (*Dbt*), *Shaggy* (*Sgg*) and *Vrille* (*Vri*) (Price, et al. 1998; Martinek, et al. 2001). El gen *Dbt* codifica para una CKIε homologa a la de mamíferos, la cual se expresa constitutivamente.

En la actualidad existen varios organismos que poseen alteraciones genéticas de los genes circadianos; algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar, existe una gran similitud en la función de los genes reloj entre distintas especies.

ESPECIE	GEN	FENOTIPO MUTANTE	FUNCIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
***Synechococcus* sp. Cepa PCC 7942**	kaiA (cycle)	Varios alelos de período largo, mutantes nulos arrítmicos	Elemento positivo	(Ishiura, et al. 1998; Ditty, et al. 2005)
	kaiC (cycle)	Alelos de período corto y de período largo, mutantes nulos arrítmicos	Elemento negativo	
Neurospora crassa	frq (frequency)	Alelos con período corto y período largo, mutantes nulos con arritmicidad condicional	Elemento negativo	(McClung, et al. 1989)
	wc-1, wc-2 (white collar)	Arrítmico bajo ciertas condiciones	Elementos positivos	(Crosthwaite, et al. 1997)
Droshophila melanogaster	per (period)	Período corto, período largo, alelos arrítmicos	Elemento negativo	(Konopka y Benzer 1971)

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

ESPECIE	GEN	FENOTIPO MUTANTE	FUNCIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
	tim (timeless)	Período corto, período largo, alelos arrítmicos	Elemento negativo	(Sehgal, et al. 1994; Sehgal, et al. 1995)
	clk (clock)	Arrítmico	Elemento positivo	(Allada, et al. 1998)
	cyc (cycle)	Arrítmico	Elemento positivo	(Rutila, et al. 1998)
	cry (cryptochrome)	Arrítmico en LD pero no en Tt	Fotorreceptor	(Stanewsky, et al. 1998)
Mamíferos (ratón)	per1, per2, per3 (period)	Los ratones *kockout* para per2 tienen período más corto y pérdida gradual de la ritmicidad	Elemento negativo	(Shearman, et al. 2000; Bae, et al. 2001; Cermakian, et al. 2001; Zheng, et al. 2001)
	clk (clock)	Período largo, pérdida gradual de la ritmicidad	Elemento positivo	(Vitaterna, et al. 1994)
	BMAL1 (MOP3)	Arrítmico	Elemento positive	(Bunger, et al. 2000)
	cry1, cry2 (cryptochrome)	Período corto o largo, dobles mutantes arrítmicos	Elemento negativo	(Thresher, et al. 1998; van der Horst, et al. 1999)

Tabla 2. Ejemplo de mutantes en los genes circadianos.

VII. Modelo de estudio: *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (Figura 9) es un gusano nematodo que mide aproximadamente 1 milímetro de longitud y vive libre en el suelo en ambientes templados, alimentándose de microorganismos, tales como la bacteria *E. coli* (Kiontke K 2006). Fue propuesto como modelo de estudio en los años ´70 por el científico Sydney Brenner, y desde entonces ha sido utilizado en diversos estudios genéticos, debido a su caracterizada genética (Brenner 1974).

C. elegans es un organismo hermafrodita, aunque se produce en condiciones naturales un pequeño porcentaje de nematodos machos (menos del 0,05% del total). Los nematodos adultos de ambos sexos están formados por un número fijo de células: 959 células somáticas en el hermafrodita y 1.031 células somáticas en el macho (Sulston y Horvitz 1977; Sulston, et al. 1983).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Estas células conforman la epidermis, el sistema muscular, el tracto digestivo, las gónadas y el sistema nervioso de *C. elegans*. La mayoría de los estudios de comportamiento son realizados con nematodos hermafroditas, a excepción de las investigaciones sobre apareamiento.

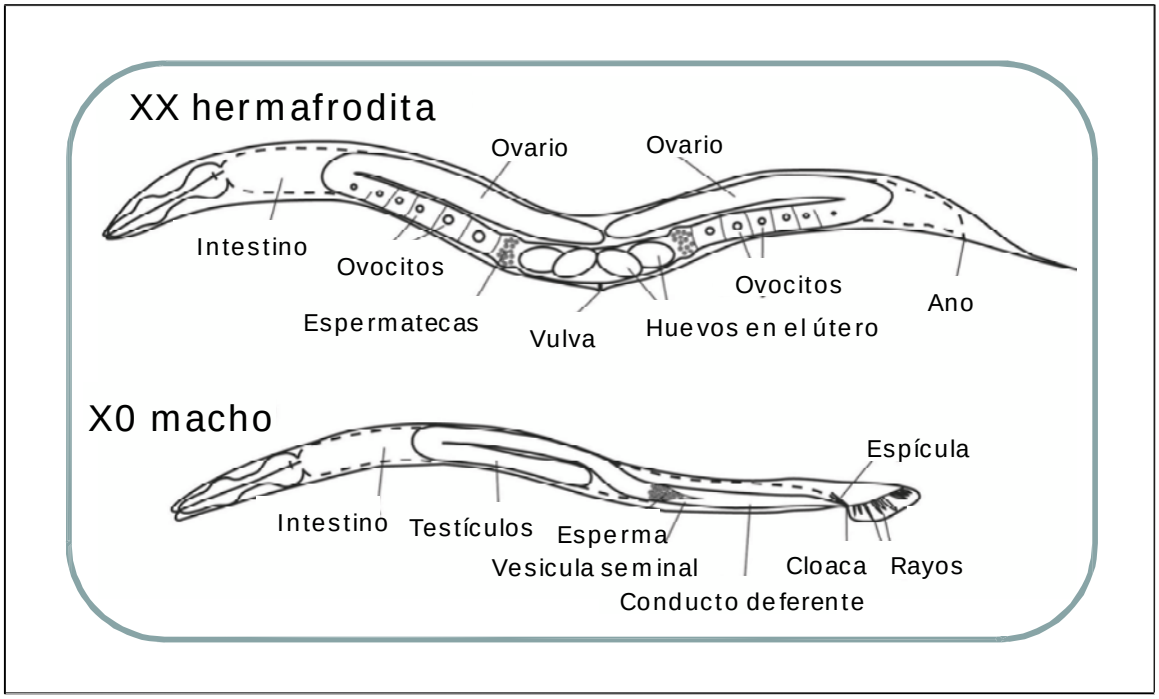


Figura 9. Dibujo esquemático de *Caenorhabditis elegans* hermafrodita/macho.

Algunas ventajas que proporciona *C. elegans* como sistema experimental son: (1) es un animal con los rudimentos de los sistemas fisiológicos (alimentario, nervioso, muscular y reproductivo) que se encuentran en los animales superiores como los ratones y los humanos, (2) se pueden crecer fácilmente sobre agar -en placas de *Petri*- o en medio líquido, en ambos casos suplementado con *E. coli* como fuente de alimento, (4) puede poner de 200 a 300 huevos que en dos días llegan a estado semiadulto, (5) posee 17.800 genes diferentes que forman su mapa genético, secuenciado completamente (sus células contiene 5 pares de autosomas y, usualmente, 2 cromosomas X), (6) la mayoría del tiempo se autofecundan, de manera que cualquier alelo recesivo se vuelve rápidamente homocigoto y afecta al fenotipo, (7) después de 3 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento, y (8) el proceso *screening* genético resulta relativamente sencillo.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

VII. A. Ciclo de vida

Una de las ventajas que presenta *C. elegans* es su corto ciclo de vida. Similar a otros nematodos, el ciclo de vida de *C. elegans* comprende un estadio embrionario, 4 estadios larvales (L1-L4) y un estadio adulto (Figura 10). Los cigotos se desarrollan en el cuerpo del nematodo adulto hermafrodita hasta el estadio en el cual están compuestos por aproximadamente 40 células, momento en el cual son expulsados por la vulva. Luego los huevos se convierten en gusanos semiadultos en: 5,5 días a 15ºC; 3,5 días a 20ºC y 2,5 días a 25ºC. Después de 3 semanas muere, mostrando signos de envejecimiento. Durante el final de cada estadio larval se produce un cambio en la cutícula de los nematodos. Durante este proceso -denominado *molt*- la vieja cutícula es reemplazada por una nueva cutícula específica de cada estadio (Cassada y Russell 1975).

El ciclo de vida de *C. elegans* depende no sólo de la temperatura, sino también de las condiciones del medio de cultivo. Hacia el final del estadio L2, si las condiciones del medio son desfavorables los animales pueden entrar en un estadio larval alternativo denominado *dauer* (también llamado diapausa). Factores del medio ambiente tales como feromonas, ausencia de comida o altas temperaturas, disparan la formación de un estadio larval intermedio –denominado L2d– que es morfológicamente diferente al estadio L2. La larva L2d tiene el potencial de transformarse en *dauer* o en larva L3 dependiendo de la persistencia de las señales del medio ambiente (Riddle 1988). Los nematodos pueden permanecer en estadio *dauer* aproximadamente por 4 meses. El estadio *dauer* finaliza cuando las condiciones medioambientales son nuevamente favorables, pasando de *dauer* directamente al estadio de larva L4 (Figura 10).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

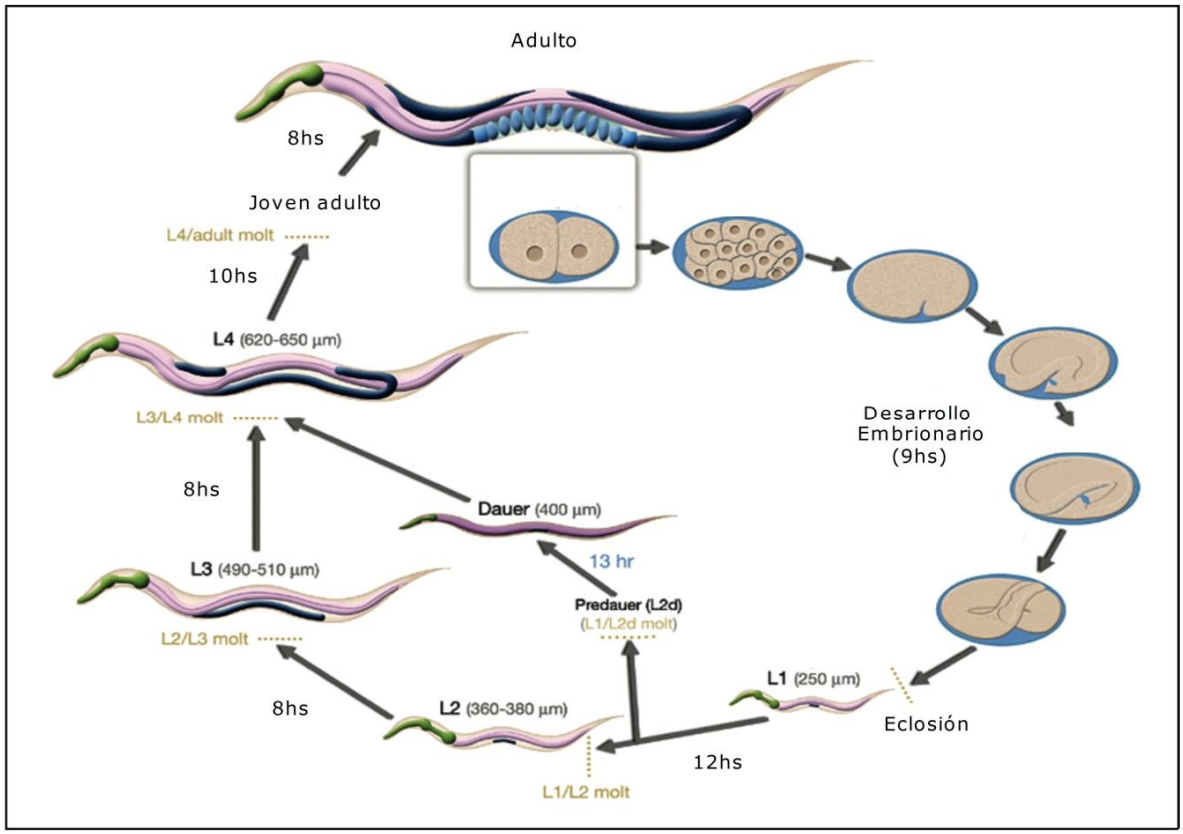


Figura 10. Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans* a 22°C. Modificado de Wormatlas (Introduction to *C. elegans* Anatomy, 2006).

VII. B. El sistema nervioso

El sistema nervioso de *C. elegans* adulto está compuesto por 302 neuronas y 56 células de la glía en el nematodo hermafrodita, y por 381 neuronas y 92 células de la glía en el macho. Mediante micrografía electrónica fue posible reconstruir todo el sistema nervioso de *C. elegans*, y de esta manera conocer la ubicación y morfología de cada una de las neuronas, así como también sus sinapsis químicas y uniones en hendidura (Albertson y Thomson 1976; White, et al. 1976; Sulston y Horvitz 1977; Sulston, et al. 1983; White JG 1986). Aproximadamente la mitad de los cuerpos neuronales están localizados en la cabeza de los nematodos -formando un anillo nervioso-; el resto de los cuerpos neuronales se distribuyen a lo largo del cordón ventral y en los ganglios de la cola (White, et al. 1976) (Figura 11).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

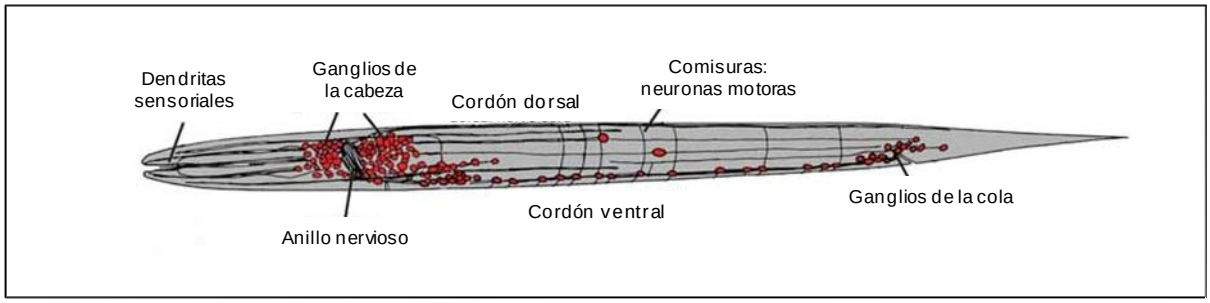


Figura 11. Dibujo esquemático de la organización del sistema nervioso de *Caenorhabditis elegans*. Las neuronas se muestran en color rojo. Modificado de WormBook (Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*, 2010).

Para facilitar el estudio y la comprensión del sistema nervioso de *C. elegans*, las 302 neuronas que forman parte del nematodo hermafrodita adulto se han agrupado en 118 clases diferentes de acuerdo a su función y distribución anatómica. 39 clases pertenecen a neuronas sensoriales, de las cuales 21 tienen terminaciones nerviosas especializadas en la punta de la cabeza (Ward, et al. 1975). Otras 27 clases son motoneuronas, y las restantes son interneuronas. Muchas de las funciones de cada una de las neuronas de *C. elegans* se han descubierto mediante experimentos de ablación neuronal por láser (Sulston y White 1980; Bargmann y Avery 1995; Rankin 2002).

En *C. elegans*, la mayoría de las neuronas sensoriales e interneuronas se ubican de a pares formando parte del anillo nervioso, y poseen similares conexiones sinápticas. Muchos de esos pares neuronales están conectados por uniones en hendidura y probablemente actúen cooperativamente. A pesar de que los cuerpos neuronales de las interneuronas se ubican principalmente en los ganglios de la cabeza y de la cola, muchas de ellas poseen largos axones que se proyectan desde la cabeza hacia la cola de los nematodos. Las motoneuronas están distribuidas a lo largo de todo el cuerpo del animal. Todo el sistema nervioso de *C. elegans* contiene un total de 5000 sinapsis químicas, 600 uniones en hendiduras y 2000 uniones neuromusculares. Muchas de las conexiones entre los diferentes tipos neuronales han sido mostradas por diferentes autores (Hobert 2003; Tsalik y Hobert 2003; de Bono y Maricq 2005). En este nematodo las sinapsis viajan en paquetes y hacen sinapsis en *passant*.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La comunicación entre las neuronas de los nematodos y sus células blanco es llevada a cabo por la liberación de neurotransmisores durante las sinapsis. *C. elegans* posee muchos de los neurotransmisores clásicos que se encuentran en vertebrados, incluyendo acetilcolina, glutamato, GABA, serotonina y dopamina. La identificación y función de cada uno de estos neuropeptidos ha sido llevada a cabo por estudios farmacológicos, análisis genético de mutantes defectivos en la síntesis del neurotransmisor, mediante técnicas basadas en fluorescencia o por medida directa en extracto de gusanos (Sulston, et al. 1975; Lewis, et al. 1980; Horvitz, et al. 1982; McIntire, et al. 1993a; McIntire, et al. 1993b; Nguyen, et al. 1995).

Como se mencionó antes, la mayor parte del sistema nervioso de *C. elegans* se ubica en la cabeza de los nematodos. Esta región está muy enriquecida en receptores sensoriales, los cuales median una gran variedad de comportamientos tales como quimiotaxis, termotaxis, fototaxis, escape osmótico y formación de *dauer*. Mediante micrografía electrónica se pudo conocer la ubicación y morfología de cada una de las neuronas sensoriales (Figura 12). Así, se determino que dos órganos con simetría bilateral, denominados *amphids*, se localizan en la cabeza de los nematodos. Cada uno de ellos contiene terminaciones nerviosas de 12 tipos diferentes de neuronas sensoriales. Dos órganos con simetría bilateral, denominados *phasmids*, se ubican en la cola de los nematodos. Cada uno de ellos contiene terminaciones nerviosas de 2 tipos diferentes de neuronas sensoriales. Además, seis neuronas del labio interno ubicados en la cabeza de los nematodos contiene terminaciones nerviosas de 2 tipos diferentes de neuronas sensoriales

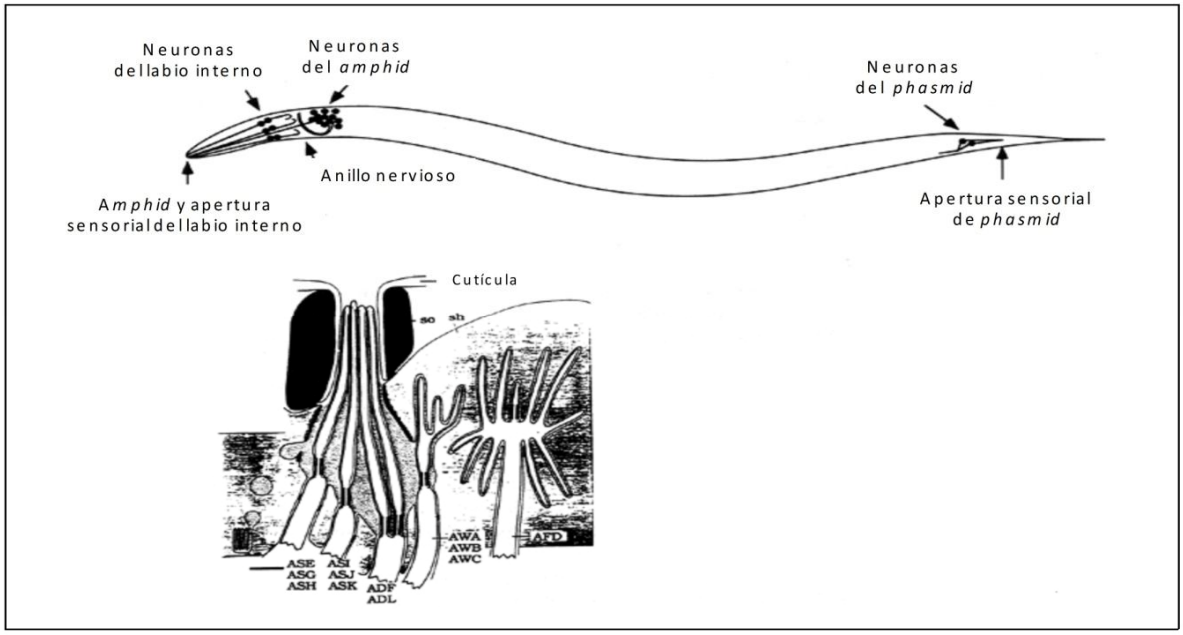


Figura 12. Arriba. Dibujo esquemático de la posición relativa de la mayoría de las neuronas sensoriales de *Caenorhabditis elegans*. Abajo. Estructura de *amphid*. Modificado de *C. elegans* II. 2nd edition (Section IV: Cellular Analysis of Chemosensory and Thermosensory Neurons, 1997).

Las neuronas sensoriales del *amphids*se dividen en tres clases, dependiendo de su morfología y función: (1) 8 tipos neuronales que poseen largas y delgadas cilias expuestas al medio ambiente, implicados en la detección de la mayoría de los químicos disueltos en agua (ADF, ADL, ASE, ASG, ASH, ASI, ASJ, ASK), (2) 3 tipos de neuronas implicadas en la detección de odorantes volátiles (AWA, AWB, AWC), y (3) 1 tipo de neurona (AFD) implicada en el sensado de la temperatura.

La temperatura es un importante factor medioambiental que influye en el comportamiento de *C. elegans*. Cuando los nematodos son colocados en un gradiente de temperatura, ellos migran y se mueven isotérmicamente a la temperatura a la cual fueron cultivados (Tc) (Hedgecock y Russell 1975). Además, los investigadores hallaron un grupo de mutantes que carecen de la capacidad de moverse isotérmicamente a la Tc, clasificándolos en termofílicos (movimiento de los nematodos hacia regiones cálidas de la placa de cultivo), criofílicos (movimiento de los nematodos hacia regiones frías de la placa de cultivo) o atácticos (movimiento de los nematodos hacia cualquier región de la placa de cultivo). Mediante experimentos de ablación neuronal por láser se determino que la principal neurona termosensorial es la AFD (Mori y Ohshima 1995); algunos de los fenotipos mutantes definidos como criofílicos y termofílicos fueron obtenidos cuando las interneuronas AIY y AIZ fueron escindidas por láser, indicando que AIY es responsable del movimiento termófilo y AIZ es responsable del movimiento criófilo.

La capacidad de poder sensar la luz es fundamental para la sobrevivencia de la mayoría de los organismos estudiados hasta el momento. *C. elegans* es un nematodo que vive en la superficie del suelo expuesto a la luz solar. Recientemente se descubrió que un estimulo lumínico genera una respuesta fototáxica negativa en los nematodos (Ward, et al. 2008). A partir de la demostración de que *C. elegans* puede responder a la luz, ha crecido el interés por encontrar qué neurona, o grupo de neuronas, son responsables de percibir la luz en estos nematodos. Así, mediante experimentos de ablación neuronal por láser se identificaron posibles neuronas fotorreceptoras (ASJ, AWB, ASK y ASH) (Ward, et al. 2008). Además, una cascada de fototransducción en la neurona fotorreceptora ASJ fue identificada (Liu, et al. 2010). Por otra parte, la proteína Lite-1 fue propuesta como un receptor de luz que actúa en neuronas (Edwards, et al. 2008; Liu, et al. 2010).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

VIII. Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*

Como ya hemos mencionado, como consecuencia de la rotación de la Tierra, los organismos -desde las cianobacterias hasta los humanos- muestran ritmos circadianos en su fisiología, bioquímica y comportamiento. *C. elegans* es un organismo modelo que es muy utilizado en diversas áreas de investigación, principalmente en genética del desarrollo, pero en años recientes se ha propuesto a este nematodo como modelo en cronobiología. Su corto periodo de vida y su fácil manipulación y cultivo, son algunas de las características que hacen de este nematodo un modelo ideal de estudio para interacciones entre genes y comportamiento.

Los primeros estudios que mostraron la existencia de ritmos circadianos en *C. elegans* comenzaron en el año 2002, cuando dos grupos de investigación caracterizaron dos comportamientos rítmicos en estos animales: velocidad de nado y resistencia a estrés osmótico (Kippert, et al. 2002; Saigusa, et al. 2002). Desde entonces, diferentes ritmos diarios y circadianos han sido caracterizados en este nematodo (Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2008; Simonetta, et al. 2009; van der Linden, et al. 2010; Migliori, et al. 2011a; Migliori, et al. 2011b; Romanowski, et al. 2011).

VIII. A. Registro del movimiento y ritmos de actividad locomotora

C. elegans es un nematodo que mide aproximadamente 1 milímetro de longitud en su estado adulto. Esa característica ha sido uno de los principales inconvenientes al momento de llevar a cabo el registro de su actividad locomotora. El primer trabajo en el cual se midieron ritmos de actividad locomotora en estos nematodos consistió en la filmación del movimiento de los mismos y posterior procesamiento digital de las imágenes obtenidas (Saigusa, et al. 2002). En años recientes, diferentes laboratorios han desarrollado diferentes metodologías para tratar de automatizar el registro de actividad locomotora en *C. elegans* (Simonetta y Golombek 2007; Buckingham y Sattelle 2008).

En *D. melanogaster*, el sistema por excelencia que es utilizado en cronobiología para medir sus ritmos de actividad locomotora se basa en alojar moscas individuales en un tubo de vidrio el cual es atravesado por un haz de luz infrarroja (Dimitrijevic, et al. 2004; Rosato y Kyriacou 2006). Este sistema -*Trikinetics, Waltham, MA, USA*- permite registrar un gran número de animales a la vez. En este sentido, en *C. elegans* una de las metodologías que permite el registro automatizado de los animales de una manera similar a *D. melanogaster* es el descripto en (Simonetta y Golombek 2007). El mismo consiste en cultivar gusanos individuales -o una población de los mismos- en medio líquido, en placas de 96 *wells*. Cada uno de los *wells* de la placa es atravesado por un haz de luz infrarroja, y posteriormente la señal es filtrada y analizada adecuadamente (Figura 13).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

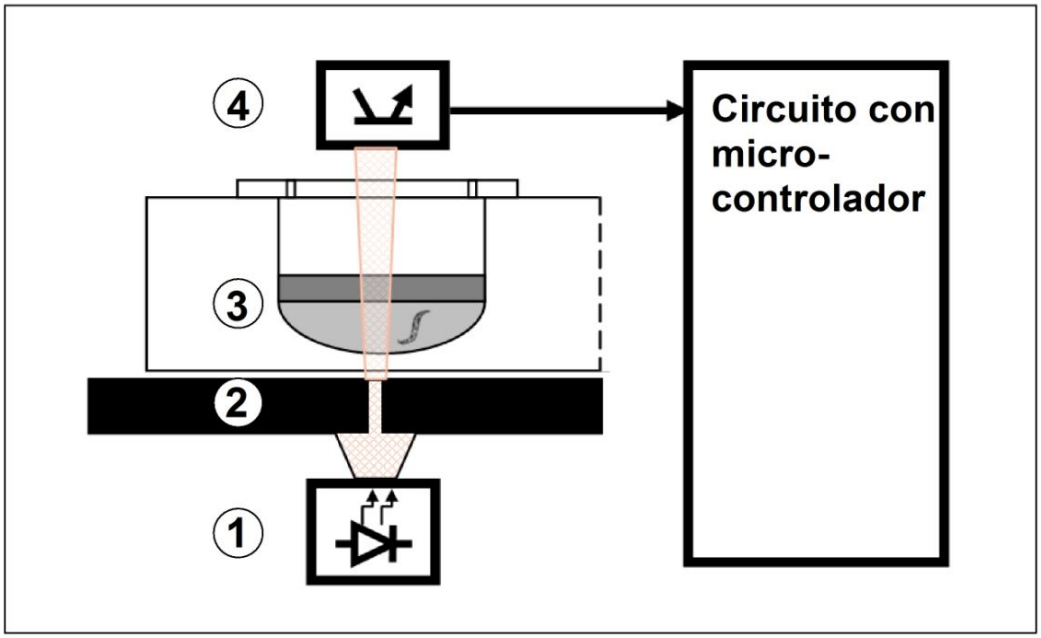


Figura 13. Dibujo esquemático del sistema de registro de *C. elegans*. Los nematodos son alojados en el well de la placa. 1. Emisor de luz infrarroja, 2. Plataforma con un micro agujero, 3. Well de la placa, 4. Fototransistor. Modificado de Simonetta et al., 2009.

En cronobiología, cuando la variable que se registra es la actividad locomotora, la representación más común es un gráfico llamado actograma. En él se representan los días sucesivos en el eje de las ordenadas y las horas del día (de 0 a 24) en el eje de las abscisas (Figura 14). El momento de actividad se representa con una barra negra, y el momento en el que se apagan las luces convencionalmente es denominado *Zeitgeber time* 12 o ZT 12. En condiciones de luz/oscuridad, el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora y por lo tanto su período es de 24 horas. En condiciones constantes, sin embargo, el período endógeno de los animales puede variar. Esto hace que, en ausencia de un ciclo de luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comiencen a estar activos cada día un poco más tarde (Figura 14 B), o un poco más temprano, dependiendo de la especie en estudio. En condiciones constantes, dada la ausencia de señales ambientales, el animal mantiene sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico: podemos así hablar de día subjetivo (aquel momento en que el animal se comporta como si fuera de día) y noche subjetiva (cuando el reloj endógeno indica que debería ser de noche).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

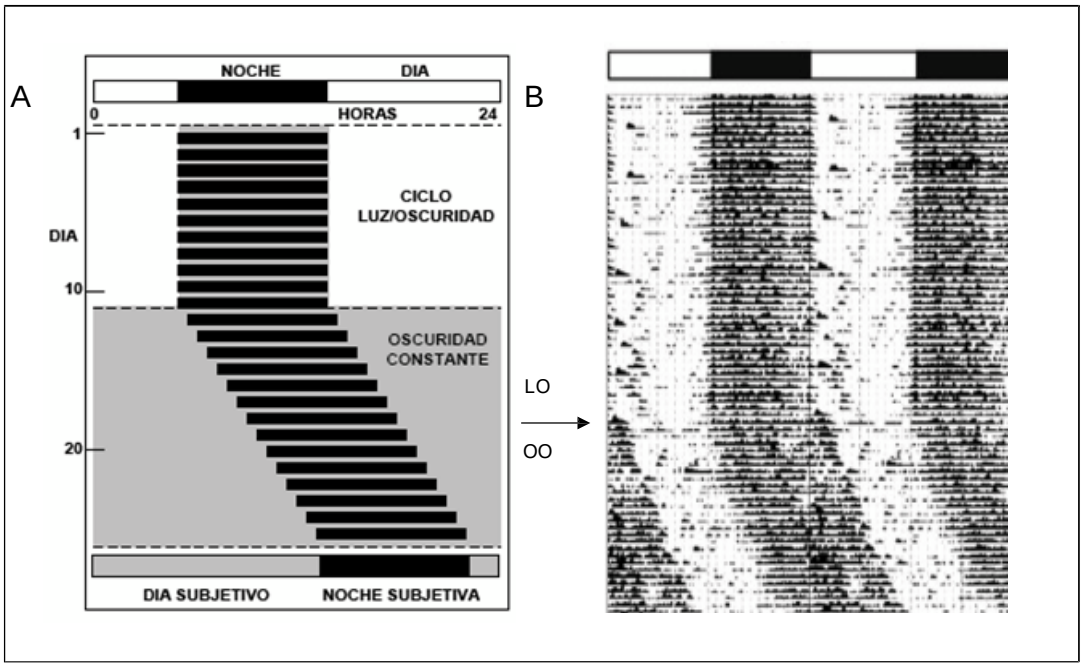


Figura 14. A) Dibujo esquemático de un actograma. Se representan los días sucesivos en el eje de las ordenadas y las horas del día (de 0 a 24) en el eje de las abscisas. B) Actograma representativo de la actividad locomotora en rueda de una rata expuesta bajo un ciclo de luz/oscuridad (LO) y luego en condiciones de oscuridad constante (OO). En ausencia de un ciclo de LO, la rata comienza a estar más activa cada día un poco más tarde. Las barras negras indican el momento de actividad del animal.

C. elegans muestra dos tipos diferentes de movimiento dependiendo de la forma en la que estos nematodos son cultivados: (1) pueden arrastrarse (*crawling*) cuando son crecidos sobre agar, o (2) pueden nadar (*swimming*) cuando son cultivados en medio líquido. Cada tipo de comportamiento locomotor muestra patrones de actividad neuromusculares diferentes (Pierce-Shimomura, et al. 2008). Cuando los nematodos son crecidos en medio sólido bajo un ciclo de luz/oscuridad, ellos muestran alta actividad locomotora durante el día, reduciendo la velocidad de su movimiento durante la noche (Figura 15A) (Saigusa, et al. 2002). Es interesante que, cuando *C. elegans* es cultivado en medio liquido ese patrón de comportamiento locomotor es alterado, mostrando mayor actividad durante el final de la noche y principio del día (Figura 15B) (Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009). Si bien ambos tipos de movimiento -*crawling* o *swimming*- pueden ser utilizados para registrar la actividad diaria en los nematodos, los resultados obtenidos a partir de un tipo de comportamiento no pueden ser directamente comparados con el otro.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

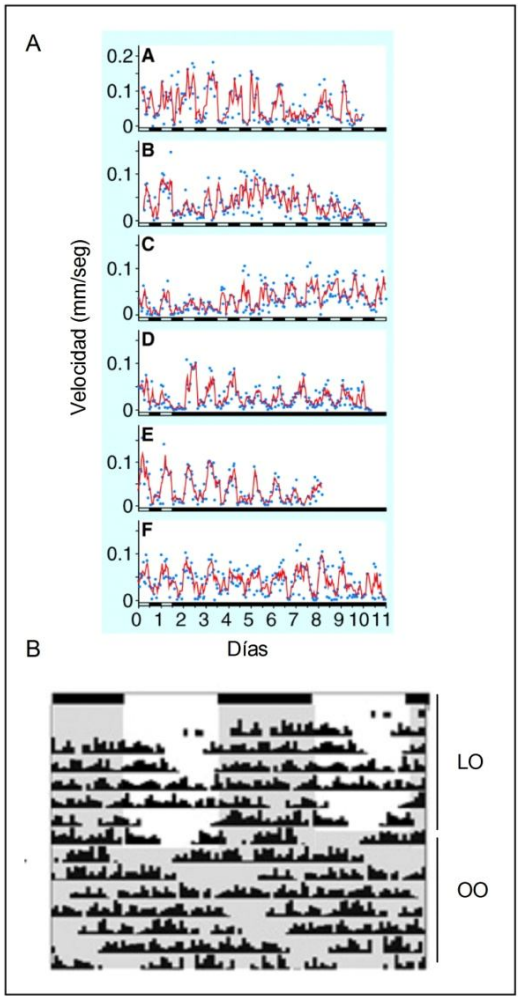


Figura 15. Comportamiento locomotor en *C. elegans*. A) Registro de la actividad locomotora de nematodos crecidos en medio sólido. Las líneas sólidas representan la velocidad media en: (A) luz/oscuridad (LO), y LO invertida comenzando con (B) L y (C) O a 20^0C, (D) oscuridad constante (OO) a 15^0C, (E) 20^0C, y (F) 25^0C. B) Actograma representativo de la actividad locomotora de *C. elegans* en medio liquido. Los nematodos fueron expuestos a un ciclo LO y luego en condiciones de oscuridad constante. Modificado de Saigusa et al., 2002 y Simonetta et al., 2006.

VIII. B. Ritmos de respuesta a estrés

C. elegans es un gusano nematodo que vive libre en el suelo en ambientes templados (Kiontke K 2006), y al igual que ocurre en todos los organismos, el medio ambiente juega un rol importante en su ecología y supervivencia. La presencia y la actividad de muchos de los factores que inducen estrés en los animales -tales como la luz ultravioleta, la temperatura, la humedad y las toxinas liberadas por determinados microorganismos- varía a lo largo del día, por lo tanto es lógico pensar que los organismos puedan predecir esos cambios y de esa manera estar mejor preparados para sobrevivir.

En su nicho ecológico estos nematodos están expuestos a cambios diarios tanto en factores estresantes abióticos como bióticos. Por lo tanto, la presencia de un reloj biológico en C. *elegans* le permitiría poder anticiparse a la naturaleza cíclica del medio ambiente. La primer evidencia de un reloj circadiano en las larvas de *C. elegans* fue en el año 2002, cuando un grupo de investigadores estudió la respuesta de los nematodos frente a un *shock* osmótico (Kippert, et al.

2002). Sus resultados mostraron que en estos organismos la resistencia al estrés hiperosmótico aumenta durante la fase de luz, disminuyendo durante la noche. Resultados similares en nematodos adultos fueron obtenidos por nuestro grupo de investigación. Asimismo, dos genes que están involucrados en la respuesta a estrés, C11E4.1 (el cual codifica para la enzima glutatión peroxidasa) y gpdh-1 (el cual codifica para la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) mostraron cambios circadianos en sus niveles de expresión (Simonetta, et al. 2008).

C. elegans coexiste con una gran variedad de microorganismos de los cuales se alimenta. Es lógico pensar que estos microorganismos hayan desarrollado mecanismos mediante los cuales puedan defenderse de los nematodos. En *C. elegans*, las infecciones que lo conducen a la muerte -o enfermedad- pueden ser causadas por la presencia de microorganismos vivos dentro de los animales o unidos a su cutícula, o por toxinas liberadas por determinados microorganismos (Tan, et al. 1999; Darby 2005). *Pseudomonas fluorescens* es una bacteria gran negativa que se encuentra en el suelo y en el agua. Las infecciones generadas por este microorganismo, así como también la liberación de sus toxinas, generan un efecto estresante para *C. elegans*. Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que la respuesta de estos nematodos frente a las infecciones causadas por *P. fluorescens* (cepa CHA0) varía a través del día, siendo más sensible durante la noche (Romanowski, et al. 2011).

VIII. C. Proteínas de *Caenorhabditis elegans* homólogas a proteínas reloj de insectos y mamíferos

El genoma de *C. elegans* codifica para ciertos genes cuyas secuencias tienen diverso grado de homología con genes reloj de insectos (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011). La mayoría de estos genes participan en procesos relacionados con el desarrollo de los nematodos. La proteína Lin-42, homologa a la proteína reloj Per, posee una ritmicidad de 6 horas durante los cambios de cutícula del nematodo (Jeon, et al. 1999). A pesar de que el rol principal de Lin- 42 está asociado al desarrollo de *C. elegans*, trabajos recientes tiene mostrado que *lin-42*, juega un rol en el reloj circadiano de los nematodos (Simonetta, et al. 2009). Además, en *C. elegans* existe un homólogo del gen *timeless* -que posee un patrón de expresión similar a la proteína Lin-42- pero el mismo está involucrado en la regulación de la cohesión cromosomal (Chan, et al. 2003; Banerjee, et al. 2005). Algunos otros ejemplos de genes de *C. elegans* homólogos a genes reloj de *D. melanogaster* son *kin-20* (*doubletime*), *sma-9* (*clock*), *aha-1* (*cycle*) y *atf-2* (*vrille*).

El reloj biológico de mamíferos se comunica con el resto del organismo vía proyecciones nerviosas y humorales, tanto para las vías de entrada como para las de salidas. Como se mencionó en la sección V.a, las diferentes poblaciones neuronales que se encuentran dentro de los NSQ de los mamíferos expresan diferentes neuropéptidos, los cuales son los encargados de transmitir la señales circadianas. Por ejemplo, muchas de las neuronas que es encuentran

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

en la región ventrolateral de los NSQ expresan el neuropéptido VIP, y muchas de las neuronas ubicadas en la parte dorsomedial expresan vasopresina. Las funciones adjudicadas al neuropéptido VIP dentro del sistema circadiano de mamíferos son: (1) sincroniza las oscilaciones de neuronas individuales dentro de los NSQ, (2) transfiere la señal circadiana a neuronas adyacentes, y (3) sincroniza las neuronas de los NSQ con la luz (Vosko, et al. 2007). Al igual que ocurre en mamíferos, las interacciones sinápticas que involucran la participación de neuropéptidos juegan un rol crítico en mantener y sincronizar los ritmos circadianos en invertebrados. El neuropéptido PDF (del inglés *Pigment Dispersing Factor*) fue inicialmente descubierto en crustáceos (Meelkop, et al. 2011), y actualmente se sabe que -al igual que VIP- tiene una participación importante en el sistema circadiano de insectos (Renn, et al. 1999; Peng, et al. 2003; Schneider y Stengl 2005; Vosko, et al. 2007; Meelkop, et al. 2011). Semejante a VIP, PDF se une a receptores acoplados a proteínas G presentes en las neuronas de reloj biológico, desencadenando de esta forma un mecanismo de señalización vía AMPc/PKA (Adenosín monofosfato cíclico/fosfoquinasa A) (Vosko, et al. 2007).

En años recientes se ha incluido a PDF dentro de la lista de genes homólogos al reloj en *C. elegans*. En estos nematodos, el sistema de PDF está formado por tres péptidos diferentes denominados PDF-1a, PDF-1b y PDF-2 y tres receptores para PDF denominados PDFR-1a, PDFR-1b y PDFR-1c. El gen precursor de PDF-1 codifica tanto para el péptido PDF-1a como para el PDF-1b. Tanto PDF-1a, PDF-1b como PDF-2 son capaces de activar cada uno de los tres receptores presentes en *C. elegans* de manera dosis-dependiente, aunque con diferentes afinidades (Janssen, et al. 2008; Janssen, et al. 2009). Asimismo, mediante el uso de construcciones reporteras -utilizando la proteína fluorescente verde (GFP)- fue posible localizar los sitios de expresión de PDF. *Pdf-1* se expresa durante todos los estadios post-embriónico en interneuronas, neuronas quimio-sensoriales y neuronas motoras, así como también en tejidos no neuronales (células del recto y células intestinales). *Pdf-2* presenta un patrón de expresión similar a *pdf-1*. Una característica interesante es que la expresión de *pdf* se observa no sólo en el soma de las células neuronales sino también en sus axones y dendritas, indicando que PDF podría participar en la neuromodulación y transmisión de diferentes señales (Janssen, et al. 2009).

Como ya fue mencionado, los ritmos circadianos han sido estudiados en diferentes organismos modelos, tales como *Nuerospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis*, roedores, entre otros. Todos estos sistemas nos permiten conocer la anatomía y el funcionamiento de los relojes circadianos. Cada especie aporta una ventaja en un tópico particular de estudio. Sin embargo, a pesar de los grandes avances que se han producido en los campos de la biología del desarrollo, genética y microRNA utilizando al nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio, su empleo en cronobiología ha sido escaso. En el presente trabajo de tesis se busca caracterizar los ritmos circadianos en *C. elegans* y las vías de sincronización ambiental de los mismos, así como evaluar cómo la presencia de variables cíclicas le permite al nematodo adaptarse de manera adecuada a su ambiente. La cantidad de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

mutaciones puntuales caracterizadas disponibles a través del *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), su facilidad de manipulación genética, conocimiento celular, corta longitud de vida y económica manutención, hacen de este nematodo un modelo ideal para estudiar la sincronía celular y molecular de los ritmos biológicos en animales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Hipótesis y objetivo general

HIPÓTESIS

1- El reloj biológico de *Caenorhabditis elegans* ayuda a coordinar muchos de los procesos fisiológicos y metabólicos que ocurren en estos organismos.

2- Los ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans* son ubicuos en su fisiología y comportamiento y están generados por circuitos genéticos que presentan homología con los genes reloj conocidos en otras especies.

3- Los ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans* se sincronizan por estímulos fóticos (luz) y no fóticos (temperatura).

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la presente tesis es determinar los ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*. Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos particulares:

- Estudiar parámetros circadianos en *Caenorhabditis elegans* en comportamientos tales como actividad locomotora, alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de oxígeno.
- Estudiar la variación diaria en la síntesis de melatonina y actividad de AA- NAT (enzima clave involucrada en la síntesis de la melatonina).
- Determinar si el reloj es capaz de responder a estímulos sincronizadores.
- Analizar cepas mutantes de genes circadianos y ultradianos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CAPÍTULO 1

RITMOS CIRCADIANOS EN VARIABLES METABÓLICAS EN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Ritmos circadianos y metabolismo

Como se mencionó en la introducción general, los ritmos circadianos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, y se encuentran en todos los niveles de organización de un individuo. Por otro lado, el sistema circadiano es el principal componente encargado de regular temporalmente muchos procesos fisiológicos y bioquímicos que ocurren en los organismos (Kohsaka y Bass 2007; Green, et al. 2008). Así, el control circadiano de estas variables es importante para que los animales puedan optimizar el uso de su energía, así como también adaptarse a los cambios cíclicos de luz y nutrientes de su medio ambiente.

1.1.1.a. Relojes periféricos

En mamíferos, el componente principal del reloj biológico son los núcleos supraquiasmaticos (NSQ) del hipotálamo, pero diferentes estudios han demostrado que también existen oscilaciones circadianas en otras áreas del cerebro y en tejidos periféricos (Yamazaki, et al. 2000; Yagita, et al. 2001). Por otra parte, las oscilaciones moleculares de los relojes periféricos parecen ser similares a las que ocurren en los NSQ (Yagita, et al. 2001; Welsh, et al. 2010). Así, tanto en los NSQ como en las células de los tejidos periféricos, el circuito de oscilación circadiana consiste en una serie de mecanismos de retroalimentación negativa que involucran los mismos componentes génicos. Se ha demostrado experimentalmente que los llamados “genes reloj” se expresan en gran cantidad y muestran un claro ritmo circadiano tanto en células en cultivo (Balsalobre, et al. 1998) como en explantes de tejidos de hígado, pulmón, riñón, bazo, páncreas, corazón, estómago, músculo esquelético, córnea, glándula tiroides y glándula suprarrenal (Storch, et al. 2002; Shibata 2004; Yamamoto, et al. 2004).

En órganos periféricos una gran variedad de funciones fisiológicas y metabólicas muestran ritmos diarios, tales como el metabolismo de carbohidratos y lípidos por el hígado, músculo y tejido adiposo, detoxificación hepática y fosforilación oxidativa, entre otras (Gachon, et al. 2006; Lamia, et al. 2008; Le Martelot, et al. 2009). Estas funciones periféricas están coordinadas por el reloj circadiano vía señales neuronales y hormonales, así como también por oscilaciones locales sincronizadas por el reloj biológico central (Gachon, et al. 2004) (Figura 16).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

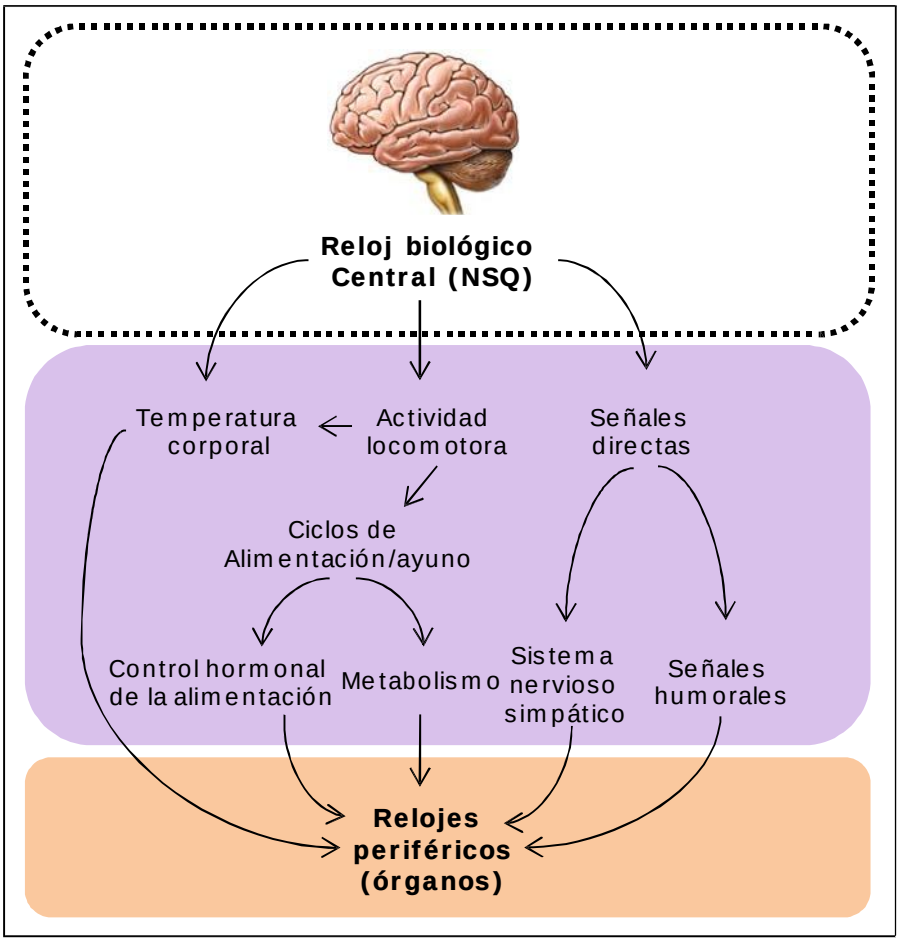


Figura 16. Esquema de las vías de acoplamiento de los relojes periféricos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otro lado, el control circadiano del metabolismo fue demostrado en diferentes organismos mediante experimentos circadianos de expresión diferencial de genes.En el hígado de mamíferos, musculo esquelético y tejido adiposo, el número de genes rítmicos encontrados fue entre el 3-20%, indicando que en esos tejidos una importante proporción del transcriptoma está bajo control circadiano (Akhtar, et al. 2002; Kita, et al. 2002; Panda, et al. 2002a; Storch, et al. 2002; Ueda, et al. 2002; Reddy, et al. 2006; Zvonic, et al. 2006; McCarthy, et al. 2007). Muchos de los genes rítmicos identificados participan en proceso metabólicos y de biosíntesis, tales como el metabolismo de lípidos y colesterol, glucolisis y gluconeogénesis, fosforilación oxidativa y procesamiento de alimentos. La regulación circadiana en la expresión génica contribuye a que todas las células y tejidos lleven adecuadamente su función. En particular, las oscilaciones circadianas en el hígado ayudan a regular los ritmos diarios de exportación de glucosa hepática de manera tal de contrarrestar el ciclo diario de ingesta de glucosa llevado a cabo mediante la alimentación (Lamia, et al. 2008).

Al igual que en mamíferos, *Drosophila melanogaster* y otros insectos expresan genes reloj en diferentes áreas del cerebro y en tejidos periféricos (Giebultowicz 2001; Levine 2004; Schuckel, et al. 2007). En *D. melanogaster*, distintos grupos de investigación han demostrado la expresión del gen *per* en el intestino, sistema excretor y testículos de estos animales (Liu, et al. 1988; Plautz, et al. 1997). Por otra parte, el reloj biológico de las moscas ayuda a coordinar muchos de los procesos fisiológicos y metabólicos que ocurren en estos organismos. Estudios realizados con *microarray* demostraron que un porcentaje significativo de genes metabólicos están regulados circadianamente (Claridge- Chang, et al. 2001). Específicamente, se han encontrado genes que participan en el metabolismo de los lípidos, aminoácidos, carbohidratos y biosíntesis de glicoproteínas. En *Danio rerio* (pez cebra), genes reloj son expresados rítmicamente tanto en líneas celulares como en tejidos periféricos (Cahill 2002). Trabajos de Kaneko y colaboradores (2006) demostraron ritmos bioluminiscentes en retina, corazón, bazo y vesícula biliar de peces cebra transgénicos *period3- luciferasa* (Kaneko, et al. 2006).

1.1.1.b. Regulación circadiana de la alimentación

Como se mencionó en la introducción general, una primera evidencia acerca de cambios periódicos y rítmicos en la fisiología humana fue reportada por el fisiólogo y físico Sanctorius en 1647. Construyó una gran balanza en la cual se pesaba en cada una de sus comidas; así, durante 30 años anotó su peso y los cambios en su condición física y observó que su peso fluctuaba con un ritmo mensual y diario, de forma paralela a la turbidez de la orina.

La ingesta de alimentos es una actividad que está fuertemente relacionada con el metabolismo energético, por eso es importante poder optimizarla adecuadamente. Para la mayoría de los organismos la alimentación constituye un fenómeno cíclico, y la frecuencia de alimentación

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

depende de la especie estudiada. Por otra parte, la alimentación es una actividad que está fuertemente regulada por órganos quimio sensoriales, tejidos metabólicos y por centros especializados del cerebro. A su vez, diferentes investigadores han demostrado que el comportamiento de alimentación también se encuentra bajo regulación circadiana.

En 1946, Brooks et al. demostraron que las ratas consumen aproximadamente el 70% de su ingesta diaria durante la noche (Brooks, et al. 1946). Se determinó además que el patrón de alimentación de estos animales está constituido por dos picos de actividad que se presentan al principio y al final del periodo de oscuridad (Rosenwasser, et al. 1981). Experimentos realizados en oscuridad constante demostraron que las ratas continúan mostrando ritmos de alimentación aun en ausencia de señales ambientales (Rosenwasser, et al. 1983). Por otro lado, lesiones de los núcleos supraquiasmaticos generan la perdida de los ritmos de alimentación nocturnos en estos animales (Brooks, et al. 1946).

Ritmos diarios y circadianos en el consumo de alimento fueron demostrados en diversas variedades de insectos. En *D. melanogaster*, el comportamiento de alimentación está bajo control circadiano. Recientemente se descubrió que el consumo de alimento en estos organismos ocurre en un momento determinado del día (Xu, et al. 2008). En condiciones de luz/oscuridad se encontró un patrón rítmico en el comportamiento de alimentación de las moscas, con un máximo durante la mañana y un mínimo durante la noche. Este ritmo persistió bajo condiciones de oscuridad constante. Por otra parte, la cucaracha *Periplaneta americana* es un insecto nocturno que se alimenta durante la fase de oscuridad. En condiciones de LO, estos organismos muestran un ritmo en el consumo de alimento con el inicio de la alimentación una hora después del comienzo de la oscuridad (Lipton y Sutherland 1970). En *P. americana*, los lóbulos ópticos son el componente principal del reloj circadiano, y la región del *pars intercerebralis* (PI) participa en la modulación de los niveles de actividad en estos organismos. Trabajos de Matsui y colaboradores (2009) demostraron que el comportamiento de alimentación de *P. americana* se ve afectado en cucarachas que carecen del PI (Matsui, et al. 2009). En condiciones de oscuridad constante, estos investigadores observaron un aumento en el consumo de comida y pérdida en el ritmo de actividad locomotora en estos animales. Ritmos diarios en el comportamiento de alimentación también fueron observados en *Gryllus domesticus* (Woodring y Clifford 1986). En este trabajo, los resultados mostraron que los grillos poseen mayor actividad alimenticia durante la primera mitad de la noche.

1.1.1.c. Control circadiano del metabolismo de la glucosa

El control circadiano en los niveles hormonales es importante para mantener un adecuado estado metabólico de salud. Por ejemplo, altos niveles en sangre de la hormona cortisol durante la medianoche es un indicativo de la enfermedad de Cushing. Del mismo modo, elevados niveles de glucosa en sangre están presentes en pacientes con Diabetes, debido a una mayor producción de glucocorticoides durante la madrugada. Trabajos de Yang, et al. (2006) demostraron una fuerte

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

oscilación circadiana en los niveles de expresión de receptores nucleares para glucocorticoides (Yang, et al. 2006).

La glucosa es la principal fuente de energía que los organismos utilizan para mantener el buen funcionamiento de sus órganos. En humanos y otros vertebrados, el sistema circadiano tiene un rol importante en la periodicidad diaria del metabolismo de la glucosa. El reloj biológico central (así como relojes periféricos) son necesarios para mantener la homeostasis de la glucosa a través del ciclo luz/oscuridad. Experimentos realizados en ratón mostraron que el glucagon, una de las principales hormonas que activa la gluconeogenesis hepática, ejerce su máxima acción cuando los animales se despiertan y empiezan a comer (Zhang, et al. 2010).

Actualmente se sabe que la proteína Cry (elemento negativo del reloj biológico) actúa como un sensor del estado energético celular (Bass 2010, 2011). Cry interactúa específicamente con receptores glucocorticoides (Gr), regulando así la homeostasis de la glucosa (Figura 17). Resultados recientes mostraron que la interacción entre Cry y Gr reduce la potencial activación de Gr para la expresión del gen *pck1* (*pck1* codifica para la proteína fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima clave en la gluconeogénesis) (Lamia, et al. 2011). Además, Cry interactúa con dos receptores hormonales nucleares activando la transcripción de Bmail1 (proteína activadora del reloj circadiano). Estas evidencias sugieren que Cry podría contribuir a la robustez de las oscilaciones participando de un mecanismo de retroalimentación corto controlando la expresión de Bmail1.

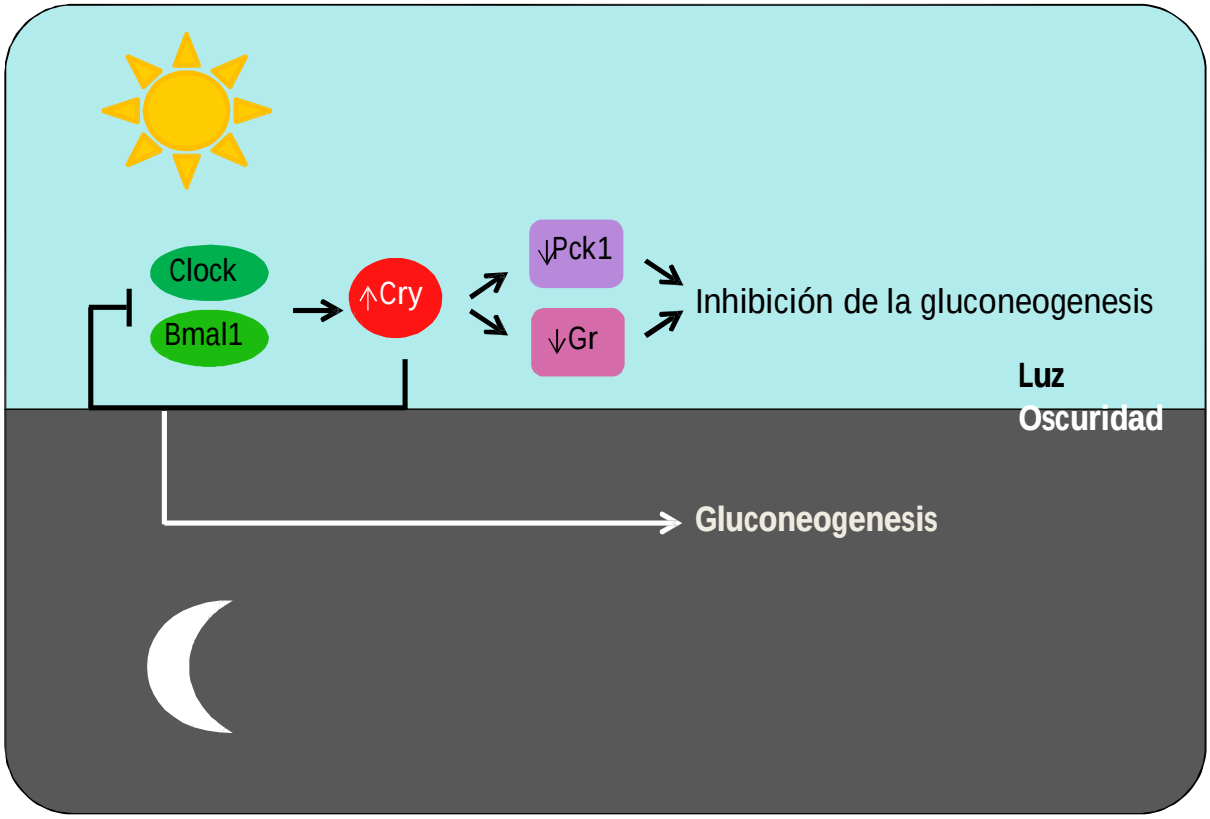


Figura 17. Regulación circadiana del metabolismo de la glucosa. En las células del hígado, los elementos positivos del reloj biológico (Clock y Bmal1) aumentan los niveles de transcripción de la proteína Cry, la cual regula negativamente la gluconoegenesis, por inhibición de receptores glucocorticoides (Gr), reduciendo así la expresión de la enzima Pck1 (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa). Además, altos niveles de Cry regulan negativamente la transcripción de Clock y Bmail1 mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, reduciendo sus niveles y promoviendo la gluconeogenesis durante la fase de oscuridad del ciclo luz/oscuridad. Modificado de Bass, 2011.

1.1.1.d. Genes reloj y disrupciones metabólicas

Diversos modelos genéticos son ampliamente utilizados para estudiar la relación entre el reloj biológico y el metabolismo. Estudios realizados con ratones homocigotas para la mutación del gen *clock* mostraron una disminución en el ritmo diario de alimentación, hiperfagia y obesidad, y desarrollaron un síndrome metabólico de hiperleptinemia, hiperlipidemia, esteatosis hepática, hiperglucemia e hiperinsulinemia (Turek, et al. 2005). Por otro lado, una supresión en la variación diurna de glucosa y triglicéridos fue observada en ratones *clock*mut y *Bmal1*-/-, sugiriendo que las proteínas Clock y Bamil1 cumplen un rol importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Rudic, et al. 2004).

Actualmente se sabe que la proteína SREBP (del inglés *sterol regulatory element-binding protein*) regula tanto la biosíntesis de ácidos grasos como la de esteroles, mediante la modulación en la síntesis de la enzima limitante de esa ruta metabólica. Le Martelot et al. (2009) demostraron que el receptor nuclear REV-ERBα controla las oscilaciones en la síntesis y activación de SREBPs. Ratones *knockout* para REV-ERBα muestran un aumento en la lipogenesis (Le Martelot, et al. 2009). Además, ratones mutantes *Clock*Δ19 desarrollan hipertrigliceridemia, sugiriendo la participación de Clock en la regulación de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (Turek, et al. 2005). Estas observaciones demuestran que existe una conexión entre el reloj biológico y el metabolismo hepático de los lípidos.

Como se mencionó en la introducción general, el reloj biológico central de *D. melanogaster* está localizado en un pequeño grupo de neuronas ubicadas en las partes laterales del cerebro de las moscas. Además, existen relojes moleculares en una variedad de tejidos periféricos en estos organismos (Giebultowicz 2000). Mediante el uso de herramientas genéticas se determinó una posible conexión entre los relojes periféricos y las funciones metabólicas en *D. melanogaster*. Trabajos de Xu y colaboradores (2008) demostraron que el reloj molecular en el *fat body* de las moscas está implicado en el almacenamiento de energía y de este modo en la respuesta al hambreado. Experimentos realizados con moscas control y moscas mutantes mostraron que los niveles de glucógeno -una de las principales reservas de energía- fueron extremadamente bajos en animales que poseían un reloj en el *fat body* no funcional (Xu, et al. 2008).

Parte del presente trabajo de tesis fue estudiar la organización temporal de variables fisiológicas en *Caenorhabditis elegans*. Se estudió la presencia de ritmos diarios y circadianos en el comportamiento de alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

oxígeno de estos animales. A continuación analizaremos tales comportamientos en nuestro modelo de estudio.

1.1.2. Comportamiento de alimentación en *Caenorhabditis elegans*

C. elegans vive libre en el suelo en ambientes templados, alimentándose de microorganismos, tales como la bacteria *Escherichia coli*. A través de su ciclo de vida, los nematodos se alimentan casi constantemente, exceptuando durante la muda -momento en el cual la vieja cutícula es reemplazada por una nueva cutícula específica de cada estadio- y durante la diapausa (Albertson y Thomson 1976).

En *C. elegans*, los nutrientes son absorbidos rápidamente durante el proceso de alimentación (Avery y Thomas 1997). Ese flujo rápido de los alimentos está controlado por dos grupos musculares ubicados en los extremos del intestino. En el extremo anterior, una potente bomba muscular -la faringe- es utilizada para impulsar las bacterias hacia el intestino. Por otro lado, músculos más pequeños ubicados en el extremo posterior del intestino controlan la apertura del ano, facilitando la expulsión del contenido intestinal hacia el exterior. Además, músculos del cuerpo que son utilizados principalmente para la locomoción de los nematodos, son utilizados de manera esporádica para mover el contenido intestinal (Avery y Thomas 1997).

La faringe de *C. elegans* (Figura 18A) es un órgano neuromuscular responsable de la ingesta de bacterias (Albertson y Thomson 1976). Así, la contracción y relajación rítmica del musculo de la faringe transporta los microorganismos desde la boca hasta el intestino. El rango de contracción de la faringe depende de las condiciones del medio ambiente en las que los nematodos se encuentran. En la presencia de abundante cantidad de bacterias, *C. elegans* muestra una continua actividad de la bomba faríngea con un rango promedio de aproximadamente 260 contracciones/minuto. Bajo condiciones desfavorables, la actividad de la bomba faríngea decrece (Horvitz, et al. 1982; Avery y Horvitz 1990). La duración del ciclo de contracción/relajación del musculo de la faringe es importante para que los nematodos se alimenten eficientemente (Avery 1993).

La mayoría de las neuronas de *C. elegans* (302 neuronas en el nematodo hermafrodita adulto) forman parte del sistema nervioso somático, y controlan la locomoción, puesta de huevos, formación de la larva *dauer*, defecación, apareamiento, y tal vez otros comportamientos de estos animales (White JG 1986). El sistema nervioso de la faringe está constituido por sólo 20 neuronas, las cuales están involucradas únicamente en el comportamiento de alimentación. Esas neuronas se agrupan en 14 tipos diferentes: 6 pares de neuronas con simetría bilateral y 8 neuronas individuales (Albertson y Thomson 1976).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

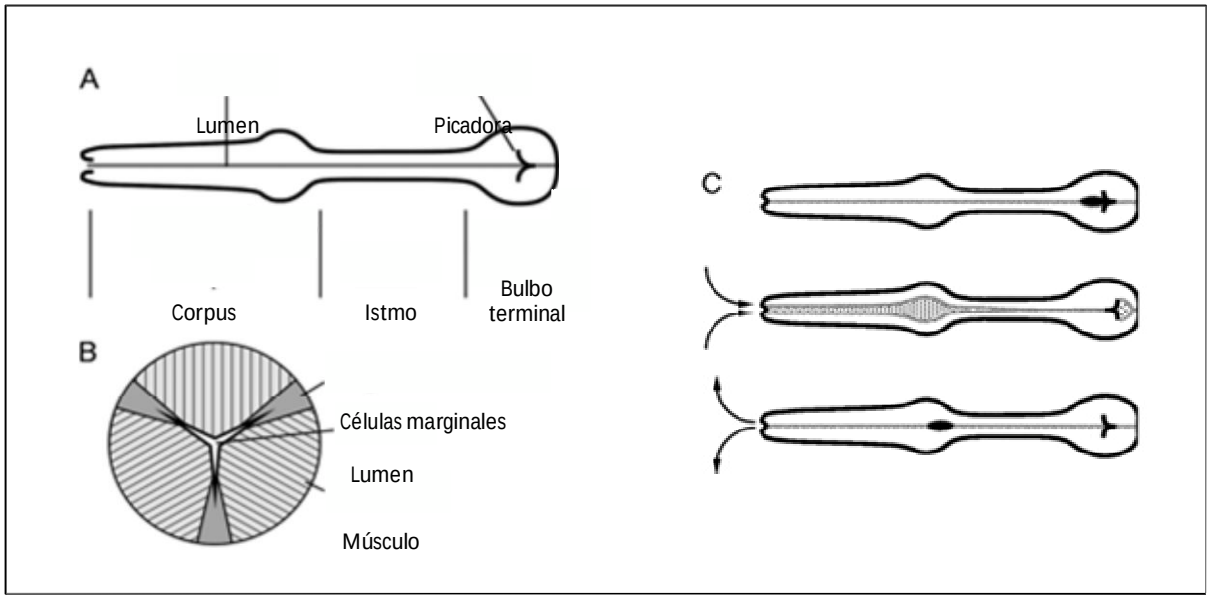


Figura 18. Anatomía de la faringe y bombeo faríngeo. A) La faringe de *C. elegans* es un órgano neuromuscular que está dividido en tres regiones: el corpus (conectado a la boca por el extremo anterior), el istmo, y el bulbo terminal (conectado al intestino por el extremo posterior). B) Esquema simplificado de la sección transversal de la faringe. C) Captura y transporte de bacterias durante el bombeo faríngeo. El bombeo faríngeo consiste de una contracción simultánea del corpus, istmo anterior y bulbo terminal, seguida de la relajación de los diferentes grupos musculares. Sobre una superficie de agar y en presencia de abundante comida, *C. elegans* muestra una continua actividad de la bomba faríngea con un rango promedio de aproximadamente 260 contracciones / minuto. Modificado de Avery et al., 2003.

La actividad de la bomba faríngea requiere de la coordinación precisa de dos movimientos (Avery y Horvitz 1989). El primer paso del ciclo comienza con la contracción de un grupo de músculos del istmo (istmo peristáltico). Así, las bacterias son transportadas desde el istmo anterior hacia el bulbo terminal. El segundo paso del ciclo (bombeo) consiste en la contracción simultánea del corpus, istmo anterior y bulbo terminal, seguido de la relajación simultánea de los tres grupos musculares (Figura 18C). Durante el bombeo faríngeo, las bacterias son procesadas en el bulbo terminal a través de la picadora, y finalmente absorbidas por el cuerpo del animal. La mayor parte del líquido en el cual las bacterias están suspendidas es expulsado por la boca de *C. elegans* hacia el exterior. Esta concentración de partículas es importante para una eficiente absorción y digestión del alimento. Sobre una superficie de agar y en presencia de abundante comida, *C. elegans* muestra una continua actividad de la bomba faríngea con un rango promedio de aproximadamente 260 contracciones/minuto.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.1.3. Comportamiento de defecación en *Caenorhabditis elegans*

Se ha demostrado que *C. elegans* posee un ritmo de defecación generado por un programa motor de defecación (DMP, del inglés *defecation motor program*) (Thomas 1990). El DMP funciona mediante la coordinación precisa de tres contracciones musculares ejecutadas cada 45 segundos. El primer paso del ciclo comienza con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo posterior (pBoc). Esa contracción muscular ocurre en la cola, y empuja el alimento hacia la parte anterior de los nematodos. El segundo paso del ciclo comienza con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo anterior (aBoc). El aBoc se produce en la cabeza, y compacta el alimento hacia la parte posterior de los nematodos. El ciclo termina con la contracción del músculo entérico (Cme).

Durante la Cme se genera la apertura de la valvula rectal para que el contenido intestinal sea expulsado hacia el exterior. Este proceso se repite aproximadamente cada 45 segundos en presencia de abundante comida (Figura 19A). Las neuronas AVL y DVB son necesarias para que ocurra la contracción del músculo entérico (McIntire, et al. 1993b) (Figura 19B). Cuando estas neuronas son eliminadas con láser, *C. elegans* deja de contraer los músculos intestinales y comienza a hincharse debido a la acumulación de comida. AVL y DVB son neuronas motoras GABAergicas excitatorias para el músculo entérico. Así, la liberación del neurotransmisor GABA por ambas neuronas es necesaria para que se genere la contracción muscular.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

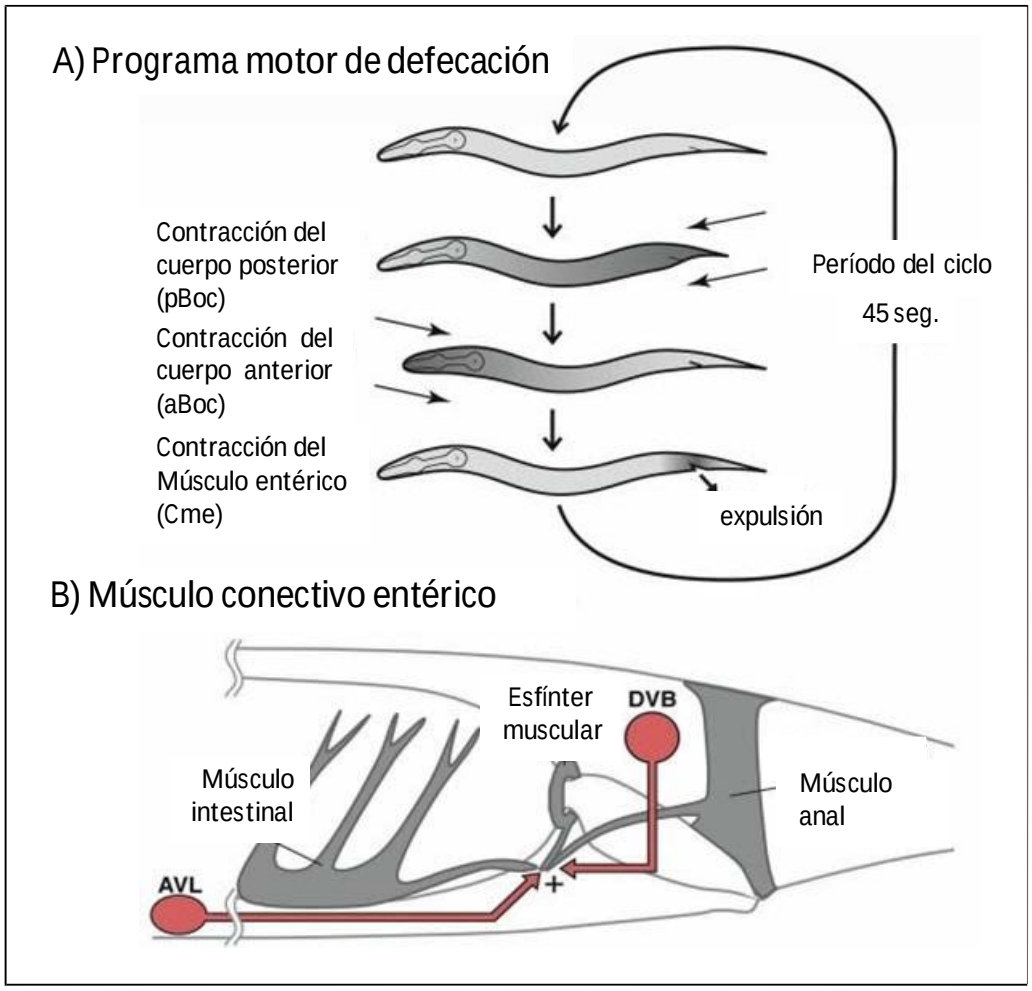


Figura 19. A) Diagrama esquemático del programa motor de defecación. El primer paso del ciclo comienza con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo posterior (pBoc), continúa con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo anterior (aBoc), y termina con la contracción del músculo entérico (Cme), el cual expulsa el contenido intestinal hacia el exterior. Este proceso se repite aproximadamente cada 45 segundos en presencia de abundante comida. La contracción muscular está indicada con flechas negras. B) Esquema del músculo entérico. El músculo entérico está constituido por 4 células: las células del musculo anal, del esfínter, y por dos células intestinales simétricas-bilaterales. Estas células se comunican entre sí mediante uniones en hendidura. Modificado de Schuske et al., 2004.

Al igual que los relojes biológicos circadianos, el reloj de defecación de *C. elegans* presenta ciertas propiedades fundamentales: (1) el período de defecación endógeno es independiente de la temperatura, es decir que compensa sus variaciones, (2) la fase de las oscilaciones se mantienen en ausencia de señales externas, y (3) las oscilaciones puedes ser reseteadas por perturbaciones externas (Liu y Thomas 1994). El periodo de defecación se mantiene casi constante en animales que fueron testeados a temperaturas entre 19 y 30 °C.

Por otra parte, el DMP no se expresa cuando los nematodos se alejan espontáneamente del césped de bacterias. Cuando los animales retornan nuevamente al césped bacteriano, la fase del ciclo de defecación se mantiene, indicando que la misma no se pierde en ausencia de expresión del

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

DPM. Finalmente, la fase de defecación puede resetearse cuando *C. elegans* es expuesto a un estímulo mecanosensorial (*touch*). Así, cuando los nematodos se tocan suavemente durante un ciclo de defecación, el próximo DPM se produce 45 segundos después del contacto (Thomas 1990; Liu y Thomas 1994).

1.1.4. Consumo de oxígeno en *Caenorhabditis elegans*

C. elegans está adaptado a vivir en ambientes con bajos niveles de oxígeno, aun así requiere de periodos de respiración aeróbica para completar su ciclo de vida. Estos nematodos carecen de un sistema respiratorio especializado y por lo tanto utilizan la difusión para intercambiar gases con el medio ambiente.

Trabajos de Van Voorhies y Ward (2000) demostraron que los nematodos mantienen una tasa metabólica constante hasta una tensión de oxígeno crítica (aproximadamente 3,6 kPa), luego reducen su metabolismo (Van Voorhies y Ward 2000). Si bien la tensión critica de oxígeno es relativamente baja, *C. elegans* puede abastecer adecuadamente sus tejidos debido a su reducido tamaño. Por otra parte, los nematodos muestran una fuerte preferencia por concentraciones de oxígeno de 5-12%, aboliendo altos y bajos niveles de oxígeno (Gray, et al. 2004). Canales Tax-2/Tax-4 CNG (del inglés, *cyclic nucleotide-gated*), y la proteína Gcy-35 (homologa a las gunilato cilcasas solubles), son requeridos para abolir las altas concentraciones de oxígeno ambiental. Además, la transducción de señales desencadenada en respuesta al oxígeno requiere de cGMP como segundo mensajero (Gray, et al. 2004). Estos investigadores también demostraron que el comportamiento de alimentación social en *C. elegans* representa una respuesta comportamental a condiciones desfavorables de hiperoxia.

Un gran número de neuronas sensoriales están implicadas en la respuesta al oxígeno, muchas de las cuales participan en otros procesos tales como la detección de alimento, temperatura, factores estresantes u otras señales. Algunas de estas neuronas (URX, AQR, PQR, SDQ, BDU, ALN, y PLN) expresan Gcy-35, y son las responsables de abolir los altos niveles de oxígeno ambiental. Mediante experimentos de imágenes de calcio, se determino que la neurona URX muestra un transiente de calcio intracelular después de un cambio ascendente en la concentración de oxígeno (15%–21% O_2), sugiriendo que la misma se activa bajo condiciones de hiperoxia. La neurona BAG muestra transientes de calcio después de un cambio descendente en la concentración de oxígeno (4%–10% O_2), sugiriendo que la despolarización ocurre a concentraciones de oxígeno intermedias (Zimmer, et al. 2009). Las neuronas sensoriales ASH, ADL, y ADF también están implicadas en abolir los altos niveles de oxígeno, pero la activación de estas células no es necesaria cuando lo nematodos son cultivados bajo condiciones de hipoxia.

Como se mencionó antes, concentraciones de oxígeno de 5-12% no afectan la respiración

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de *C. elegans*, pero aumenta el daño celular debido a la generación de radicales libres producto de la generación de especies reactivas de oxígeno. La preferencia por bajas concentraciones de oxígeno atmosférico podría representar para *C. elegans* una ventaja adaptativa contra el estrés oxidativo, así como un indicativo de la presencia de bacterias las cuales están consumiendo oxígeno activamente. En este sentido, se vuelve relevante estudiar si el consumo de oxígeno en *C. elegans* está regulado por el sistema circadiano. Así, la presencia de un reloj biológico permitiría a los nematodos disminuir el consumo de oxígeno en determinado momento del día, y de esta forma reducir los factores que podrían afectar su sobrevivencia.

Ritmos diarios y circadianos en el consumo de oxígeno fueron demostrados en diversas variedades de organismos. En *Nephrops orvegicuas*, la actividad respiratoria está bajo control circadiano (Aguzzi, et al. 2003). En condiciones de oscuridad constante se encontró un patrón rítmico en el consumo de oxígeno, con un máximo durante la fase de actividad nocturna de estos organismos. Por otra parte, el escarabajo *Tribolium confusum* muestra ritmos circadianos en su actividad respiratoria, con un período cercano a las 24 horas (Chiba, et al. 1973). En ciclos de luz/oscuridad, estos investigadores observaron una variación diaria en el consumo de oxígeno, con un máximo poco después del encendido de las luces y un mínimo durante el inicio de la noche.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.2. OBJETIVOS

Objetivos del presente capítulo

Estudiar parámetros circadianos en *Caenorhabditis elegans* en comportamientos tales como:

1- Alimentación

2- Actividad de la bomba faríngea

3- Defecación

4- Consumo de oxígeno

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.3. MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

Se utilizaron animales de la especie *Caenorhabditis elegans*, cepas N2 (*wild tipe*), TJ1060 [spe9(hc488); fer15(b26)] y JT73 (itr-1(sa73)). Todas las cepas fueron provistas por el *Caenorhabditis Genetics Center, University of Minesotta, MN, USA*. La cepa TJ1060 posee una mutación sensible a la temperatura que evita la autoreproducción de los nematodos a 25ºC, pero permite la reproducción de los mismos a 18,5ºC (Fabian y Johnson 1994). 5-fluorodeoxyuridina (FuDR) 20 µM fue adicionado a las larvas L4 (cepas N2 y JT73) para abolir la autorreproducción (Mitchell, et al. 1979).

Los nematodos se mantuvieron en placas de *petri* con medio NGM (Nematode Growth Medium) (NaCl 0,3%, Peptona 0,25%, Colesterol 5 µg/ml, CaCl2 1 mmol/l, MgSO4 1 mmol/l, Agar 1.7% en *buffer* fosfato de potasio 25 mmol/l a pH 6,0), sembradas con una monocapa de *Escherichia coli* cepa OP50; bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (llamado LD, por *light-dark* 12:12), con el encendido de las luces a las 9:00 AM (definido como *zeitgeber time* 0 o ZT0). Las condiciones de temperatura fueron constantes (16°C).

Para la realización de los experimentos, poblaciones de gusanos fueron sincronizadas al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Los huevos obtenidos de la sincronización fueron cultivados durante toda la noche en 3,5 ml de *buffer* M9 (Na2HPO4 42 mM, KH2PO4 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO4 1 mM) + antibiótico antimicótico 1x (Gibco, USA); en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y a 18,5°C, bajo un fotoperiodo de LD 12:12. Al día siguiente (en el momento en que se prenden las luces, convencionalmente llamado *Zeitgeber time* 0 o ZT0) las larvas L1 se transfirieron a placas de *petri* con medio NGM, previamente sembradas con *E. coli* cepa OP50 -o *E. coli* cepa NA22- dependiendo del experimento. Las larvas L1 fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de LD 12:12 y a temperatura constante de 25°C hasta alcanzar el estadío larval L4.

En condiciones de luz/oscuridad (LD) los registros comenzaron con animales en el primer día de estadío adulto a la hora de encendido de las luces (ZT0). Bajo condiciones de oscuridad constante (DD, por *dark-dark*) los registros comenzaron con animales en el primer día de estadío adulto a CT0.

En los casos en los que hubo que trabajar con los animales en oscuridad, se utilizó una fuente de luz roja de intensidad menor a 1 lux. Este tipo de luz no posee efectos sobre la sincronización de *C. elegans* (Simonetta, et al. 2009).

Todas las drogas utilizadas se compraron en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

1.3.2. Ensayo de alimentación

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Se utilizaron animales de la cepa TJ1060. El consumo de alimento se determinó indirectamente por medida de la disminución de la densidad óptica a 600 nm (DO600) de un cultivo conteniendo *E. coli* OP50.

Cuando los nematodos llegaron al estadío de larva L4 fueron levantados de la placa de cultivo con 3 ml de *buffer* S (ClNa 5,85 g/l, KH2PO4 6 gr/l, K2HPO4 1gr/l, colesterol 5 mg/ml) y fueron lavaron 3 veces con 14 ml del mismo *buffer*. Posteriormente, los nematodos fueron transferidos a medio S completo (por litro de *buffer* S se adicionan 10 ml de citrato de potasio 1 M, pH = 6; 10 ml de trazas de metales; 3 ml de CaCl2 1M; 3 ml de MgSO4 1M) conteniendo *E. coli* OP50 1010/ml + Antibiótico anti micotico 1x; en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y en una concentración final de 6 gusanos/20 µl. Al día siguiente (primer día de estadío adulto) los nematodos continuaron bajo el mismo fotoperiodo, o fueron colocados en condiciones de oscuridad constante (DD), dependiendo del ensayo. Las condiciones de temperatura fueron constantes (25°C). Las muestras se tomaron cada 6 horas durante 1,5 días. La densidad óptica de las mismas se determino utilizando un espectrofotómetro (UV-160A, UV-Visible Recording Spectrophotometer, Shimadzu).
Los experimentos se llevaron a cabo en 2 momentos independientes con 3 réplicas biológicas por cada punto horario.

1.3.3. Registro de la actividad de la bomba faríngea

Se utilizaron animales de la cepa TJ1060. Cuando los nematodos llegaron al estadío de larva L4 fueron transferidos a placas de 24 pocillos (1 gusano por pocillo) conteniendo 1 ml de medio NGM y sembradas con *E. coli* OP50. Al día siguiente (primer día de estadío adulto) los nematodos continuaron bajo el mismo fotoperiodo, o fueron colocados en condiciones de oscuridad constante (DD), dependiendo del ensayo. Las condiciones de temperatura fueron constantes (25°C). La actividad de la bomba faríngea de los nematodos se cuantifico por conteo del número de contracciones del músculo de la faringe. El registro se llevo a cabo cada 6 horas durante 1,5 días, por observación de los nematodos utilizando un microscopio de disección (Olympus SZ61). Los experimentos se llevaron a cabo en 2 momentos independientes con un n = 20 gusanos.

1.3.4. Registro del ritmo de defecación

Se utilizaron animales de las cepas N2 y JT73. Cuando los nematodos llegaron al estadío de larva L4 fueron transferidos a placas de 24 pocillos (1 gusano por pocillo) conteniendo 1 ml de medio NGM, 5-fluorodeoxyuridina (FuDR) 20 µM y sembradas con *E. coli* OP50. Al día siguiente (primer día de estadío adulto) los nematodos continuaron bajo el mismo fotoperiodo, o fueron colocados en condiciones de oscuridad constante (DD), dependiendo del ensayo. Las condiciones de temperatura fueron constantes (25°C). El registro se llevó a cabo cada 6 horas durante 2 días,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

por observación de los nematodos utilizando un microscopio de disección (Nikon SMZ645). El período del ciclo de defecación fue definido como la duración entre el paso de pBoc (*posterior body muscle contraction*) de dos defecaciones consecutivas. Cada animal fue observado por cinco ciclos consecutivos (o sea 6 pBoc sucesivos). Los experimentos se llevaron a cabo en 2 momentos independientes con un n = 20 gusanos.

1.3.5. Consumo de oxígeno

Se utilizaron animales de la cepa TJ1060. Aproximadamente 3.000 larvas L1 fueron colocadas en placas sembradas con *E. coli* NA22 (se utilizaron 2 placas por punto horario, por experimento), bajo un fotoperiodo de LD 12:12. Las condiciones de temperatura fueron constantes (25ºC). Cuando los nematodos llegaron al primer día de estadío adulto, ellos continuaron bajo el mismo fotoperiodo, o fueron colocados en condiciones de oscuridad constante (DD), dependiendo del ensayo. Para la medida del consumo de oxígeno, los gusanos fueron levantados de la placa de cultivo con 3 ml de medio M9 y fueron lavados 3 veces con 14 ml del mismo medio. Posteriormente, los nematodos fueron transferidos a la cámara de registro de oxígeno. Adicionalmente, el sobrenadante del último lavado fue utilizado para medir el consumo de oxígeno; bajo esas condiciones no encontramos consumo de oxígeno detectable que podría corresponder a la presencia de *E. coli* en el *buffer* M9. Las lecturas del consumo de oxígeno se llevaron a cabo a 25ºC durante 10 a 30 minutos, y el consumo de oxígeno fue reportado como picolitros de O2 por minuto por gusanos. El mínimo y el máximo de la concentración de oxígeno fueron calibrados utilizando sulfito de sodio (Biopack®, Argentina) y agua conteniendo oxígeno disuelto, respectivamente. Las medidas se llevaron a cabo cada 6 horas durante 2 días. La concentración de O2 fue medida utilizando un electrodo de oxígeno (Qubit systems: OX1LP Dissolved Oxygen Package).

1.3.6. Análisis de los datos

Se emplearon pruebas estadísticas como ANOVA a una vía, y *test* de Tukey para las comparaciones entre grupos. Ambas pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Cada patrón de variación diaria fue caracterizado por una regresión de forma de onda utilizando el programa Sigma Plot (Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Los perfiles fueron ajustados a la siguiente ecuación: y = y0 + a * sin (2 * pi * x / b+c), donde y es el punto n, x es el tiempo del punto n, y0 es el valor de la línea de base, a es la amplitud, b es el período de la onda y c es la fase. Las acrofases fueron determinadas por análisis de cosinor (es decir, el mejor ajuste a una onda coseno) de los datos. Para controlar los cambios relacionados con el desarrollo y el envejecimiento de los nematodos, se realizó un *detend* (o sea, eliminar matemáticamente la tendencia) de los datos. Todos los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1. Variación diaria en el consumo de alimento de nematodos adultos

Como se mencionó en la introducción, los ritmos circadianos gobiernan una gran variedad de funciones fisiológicas y metabólicas en la mayoría de los organismos a través de circuitos neuronales, hormonas y expresión de genes. El hecho de que la fisiología y el metabolismo exhiban un estricto control circadiano le da a las especies una ventaja adaptativa en términos de optimizar el uso de su energía.

Para determinar si el comportamiento de alimentación de nematodos adultos varía a través del día, el consumo de alimento se determinó indirectamente midiendo la disminución de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de un cultivo conteniendo *E. coli* OP50. En condiciones de luz/oscuridad, se define ZT (por *zeitgeber time*) 12 como el momento de apagado de las luces. En condiciones constantes, se define CT (del inglés *circadian time*) 12 como el comienzo de la noche subjetiva. De esta forma, las horas del día se nombran como ZT cuando se refiere a un ciclo luz/oscuridad y como CT cuando se refiere a condiciones constantes como es el caso de oscuridad constante.

Las medidas fueron realizadas a ZT (CT) 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 (con 3 réplicas biológicas por cada punto horario). Cuando una población de nematodos adultos fue alimentada con *E. coli* OP50 y la densidad de las bacterias fue chequeada por medida de la turbidez, se observó un ritmo en el consumo de alimento bajo condiciones de luz/oscuridad (LD) (*test* de ANOVA, $p = 0,013$) (Figura 20A). Se encontró un mayor consumo de alimento hacia el final del día/principio de la noche, con un mínimo valor a ZT21 (*test* de Tukey, $p < 0,05$; análisis de Cosinor, acrofase = 6,76 hs). Este ritmo no persistió en condiciones de oscuridad constante (DD), probablemente debido a la gran variabilidad entre los datos (Figura 20B). Sin embargo, en condiciones de DD se puede observar un ligero retraso de fase en comparación con LD. Estos resultados podrían sugerir que un posible ritmo endógeno en el consumo de alimento no fuese necesariamente de 24 horas, o que posiblemente pueda estar enmascarado por el sincronizador ambiental (en este caso la luz).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

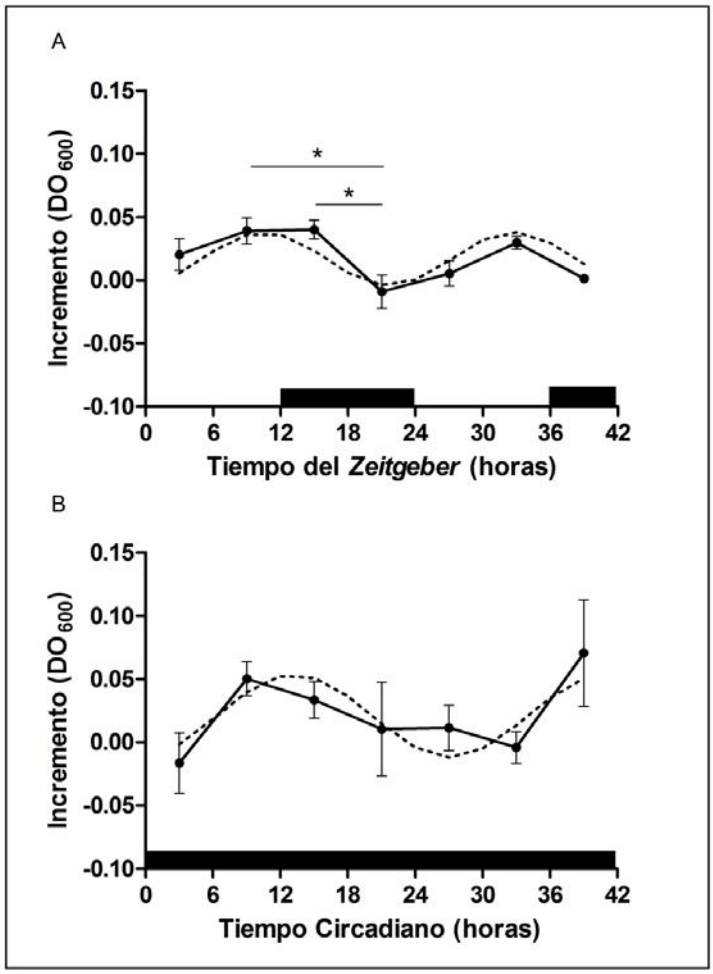


Figura 20. Variación diaria en el consumo de alimento de *C. elegans* en A) la presencia de ciclos LD y B) condiciones de oscuridad constante. El incremento (DO600) fue calculado como la derivada entre dos puntos sucesivos, y corresponde a la velocidad de cambio entre esos dos puntos. Los experimentos fueron realizados en dos momentos independientes con tres replicas biológicas punto horario. Las líneas punteadas corresponden a un ajuste de los datos a una función sinusoidal (LD: a=0.0210, b=22.2038, c=4.8722, y0=0.0168; DD: a=0.0327, b=27.7205, c=4.8542, y0=0.0208). * p < 0,05.

1.4.2. Variación diaria y circadiana en la actividad de la bomba faríngea de nematodos adultos

Sobre una superficie de agar y en presencia de abundante comida, *C. elegans* muestra una continua actividad de la bomba faríngea con un rango promedio de aproximadamente 260 contracciones/minuto (Avery y Horvitz 1989). Para estudiar si la contracción de la faringe de nematodos adultos está bajo control circadiano, se registró la actividad de la bomba faríngea tanto en condiciones de LD como de DD. Los registros fueron realizados a ZT (CT) 0, 6, 12, 18, 24, 30 y 36 (n = 20 por cada punto horario). Los resultados se muestran en la Figura 21, en la cual se observa una variación diaria en la contracción del músculo de la faringe bajo condiciones de LD (*test* de ANOVA, p < 0,0001). Como se puede observar en la Figura 21A, se halló un pico a ZT0, y un mínimo valor alrededor de ZT12-18 (*test* de Tukey, p < 0,001; análisis de Cosinor, acrofase =

1,81hs). Este ritmo persistió en condiciones de DD (*test* de ANOVA, p < 0,0001) (Figura 21B). Bajo esas condiciones el pico se presentó a CT0, y el valor mínimo alrededor de CT12-18 (*test* de Tukey, p < 0,001).

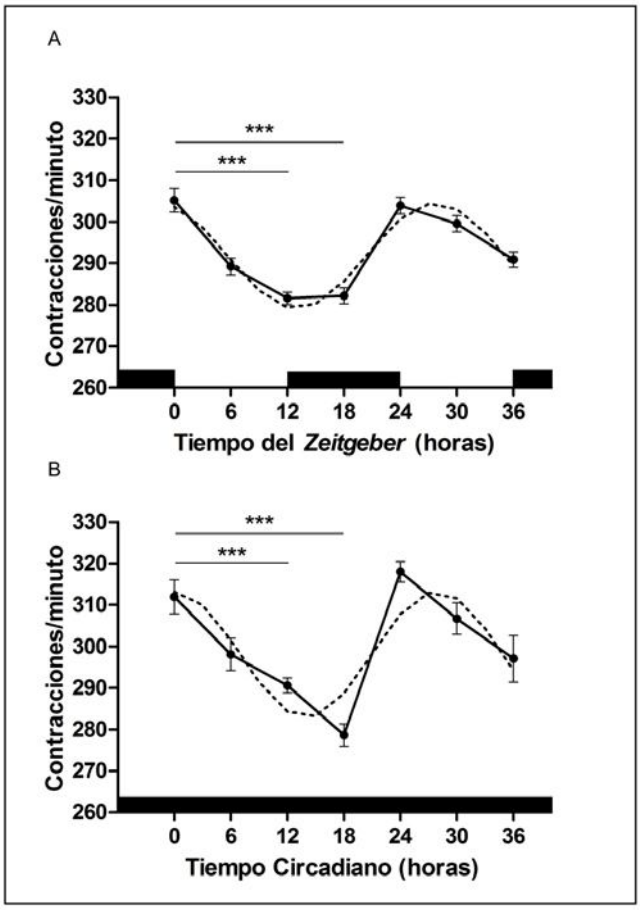


Figura 21. Variación diaria en la contracción del musculo de la faringe de *C. elegans* en A) la presencia de ciclos LD (ANOVA p < 0,0001) y B) condiciones de oscuridad constante (ANOVA p < 0,0001). Los experimentos fueron realizados en dos momentos independientes con n = 20 gusanos por punto horario. Las líneas punteadas corresponden a un ajuste de los datos a una función sinusoidal (LD: a=12.7053, b=29.4492, c=1.9355, y0=291.7551; DD: a=15.1906, b=27.8388, c=1.5576, y0=298.0078).
*** p < 0,001.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.4.3. Ritmo diario en el comportamiento de defecación de nematodos adultos

Se ha demostrado que *C. elegans* posee un ritmo de defecación generado por un programa motor de defecación (DMP, del inglés *defecation motor program*). El DMP funciona mediante la coordinación precisa de tres contracciones musculares ejecutadas cada 45 segundos (Thomas 1990). El primer paso del ciclo comienza con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo posterior (pBoc), continúa con la contracción de un grupo de músculos del cuerpo anterior (aBoc), y termina con la contracción del músculo especializado del ano, el cual expulsa el contenido intestinal hacia el exterior (Exp). Este proceso se repite aproximadamente cada 45 segundos en presencia de abundante comida.

Para determinar si el período ultradiano de defecación está bajo la influencia del sistema circadiano en *C. elegans*, se registró el comportamiento de defecación de nematodos adultos a lo largo del día, tanto en condiciones de LD como de DD. Los registros fueron realizados a ZT (CT) 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 y 54 (n = 20 por cada punto horario). En condiciones de LD se halló una variación diaria en el comportamiento de defecación, con un aumento en el tamaño del ciclo de defecación durante la noche (*test* de ANOVA, $p < 0,0002$) (Figura 22A). En estas condiciones, el pico fue encontrado a ZT18 (*test* de Tukey, $p < 0,05$; análisis de Cosinor, acrofase = 22,04 hs). Un análisis de autocorrelación de los datos también indicó un período de 24 horas para el comportamiento de defecación en *C. elegans*. Luego de eliminar la tendencia (*detendring)* de los datos para los experimentos realizados en condiciones de DD, no se evidenció una clara variación circadiana en el comportamiento de defecación de los nematodos (Figura 22B).

Con el fin de corroborar si las mutaciones que afectan el período del reloj ultradiano de defecación en *C. elegans* tienen algún efecto sobre el reloj circadiano, se estudió la cepa mutante JT73. Esta cepa posee una mutación en el gen *itr-1* (alelo sa73) que genera un aumento en el período ultradiano de defecación de los nematodos. Entre 20 – 25ºC y en presencia de abundante comida, el período ultradiano del ciclo de defecación de esta cepa es de aproximadamente 95 segundos (Dal Santo, et al. 1999). En condiciones de LD se observó una variación diaria en el comportamiento de defecación de la cepa JT73 (n=10 gusanos, *test* de ANOVA, $p = 0,012$) (datos no mostrados).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

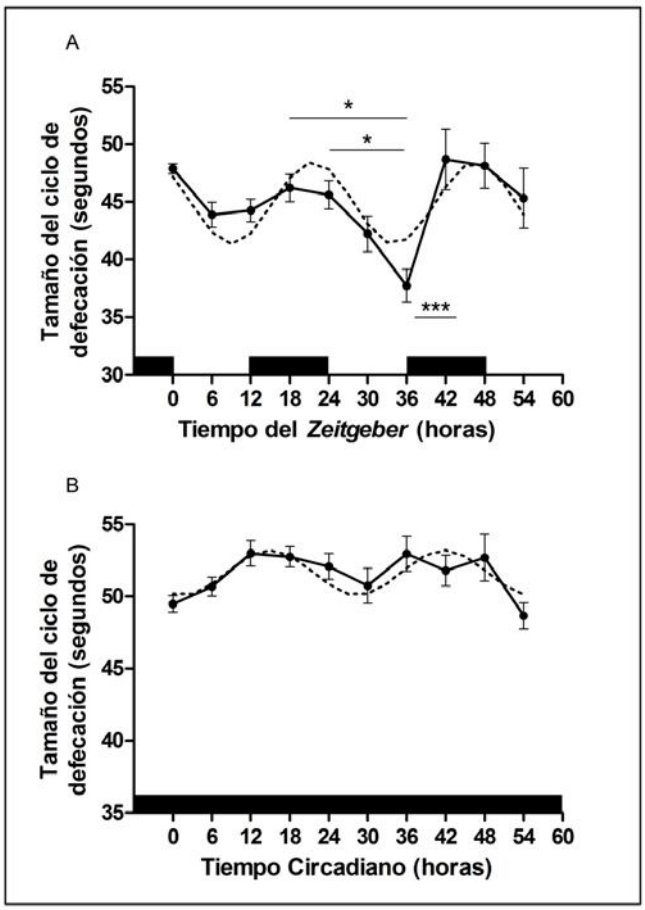


Figura 22. Comportamiento de defecación de *C. elegans* en A) la presencia de ciclos LD (ANOVA p = 0,0002) y B) condiciones de oscuridad constante. Los experimentos fueron realizados en dos momentos independientes con n = 20 gusanos por punto horario. Las líneas punteadas corresponden a un ajuste de los datos a una función (LD: a=3.5454, b=25.0146, c=2.4307, y0=44.8913; DD: a=1.5576, b=26.7916, c=4.3369, y0=51.6372).
* p < 0,05, *** P < 0.001.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

1.4.4. Variación diaria y circadiana en el consumo de oxígeno de *Caenorhabditis elegans*

C. elegans necesita del oxígeno atmosférico para poder moverse, desarrollarse y sobrevivir (Van Voorhies y Ward 2000). Con el fin de estudiar la posible existencia de una variación diaria y circadiana en la actividad respiratoria de nematodos adultos, el consumo de oxígeno de los mismos fue medido a lo largo del día, tanto en condiciones de LD como de DD. Los registros fueron realizados a ZT (CT) 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42. Los resultados se muestran en la Figura 23.

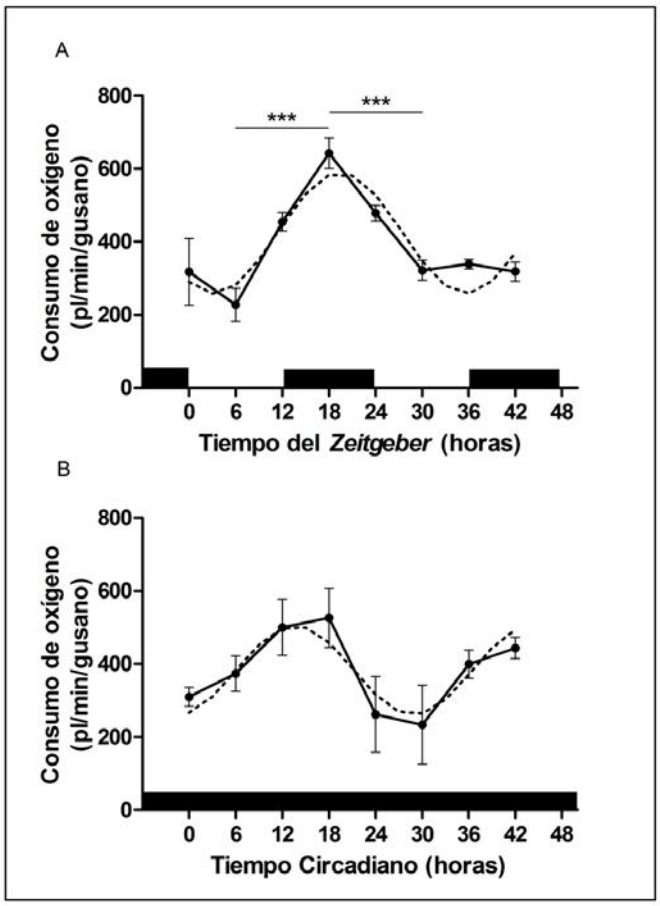


Figura 23. Consumo de oxígeno de *C. elegans* en A) la presencia de ciclos LD (ANOVA p < 0,0001) y B) condiciones de oscuridad constante (ANOVA p = 0,0434). Las líneas punteadas corresponden a un ajuste de los datos a una función (LD: a=165.3257, b=32.3673, c=4.0829, y0=423.0526; DD: a=125.5235, b=30.3836, c=5.0313, y0=382.4845). *** P < 0.001.

En condiciones de LD, el consumo de oxígeno mostró una variación diaria (*test* de ANOVA, p < 0,0001) (Figura 23A), con un pico a ZT18 y un mínimo valor a ZT6 (*test* de Tukey, p < 0,001; análisis de Cosinor, acrofase = 18,02 hs). Por otra parte, para determinar si el ritmo encontrado en la actividad respiratoria en *C. elegans* es endógeno se repitieron las medidas en condiciones de DD. Como se puede observar en la Figura 23B, el ritmo diario en el consumo de oxígeno fue mantenido en condiciones constantes (*test* de ANOVA, p = 0,0434), con un máximo alrededor del final del día subjetivo (análisis de Cosinor, acrofase = 15,12 hs).

1.4.5. Discusión

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En este trabajo se demostró la existencia de ritmos diarios y circadianos en variables fisiológicas en *C. elegans*, tales como alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de oxígeno.

Comportamiento de alimentación

Debido a que la alimentación es una actividad que está fuertemente relacionada con el metabolismo energético, se estudió en primer lugar posibles cambios circadianos en el comportamiento de alimentación en *C. elegans*. Los experimentos indicaron que este comportamiento varía a través del día. Cuando una población de gusanos adultos fue alimentada con *E. coli* OP50, la tasa de consumo de bacterias en *C. elegans* fue mayor hacia el final del día/principio de la noche bajo condiciones de luz/oscuridad (Figura 20A). En condiciones de oscuridad constante la tasa de alimentación de nematodos adultos no mostró una variación significativa, probablemente debido a la gran variabilidad entre los datos. Estos resultados indicarían que este comportamiento podría no originarse en la actividad de un reloj circadiano. Sin embargo, en condiciones de oscuridad constante se pudo observar una tendencia a la ritmicidad, así como un ligero retraso de fase en comparación con luz/oscuridad (Figura 20B). Estos resultados podrían sugerir un posible ritmo endógeno en el consumo de alimento que no fuese necesariamente de 24 horas, o que posiblemente pueda estar enmascarado por el sincronizador ambiental (en este caso la luz).

Con el objetivo de verificar si la tasa de alimentación correlaciona con la actividad de la bomba faríngea, se registró la actividad de la misma a lo largo del día. En condiciones de luz/oscuridad se encontró un claro ritmo en la contracción del músculo de la faringe, con un pico a ZT0. Este ritmo persistió en condiciones de oscuridad constante, con un pico a CT0. En ambos casos el máximo de actividad fue en la transición noche/día (Figura 21).

En resumen, tanto el consumo de alimentación como la contracción del músculo de la faringe mostraron una variación diaria con bajos valores de actividad hacia la mitad de la noche. En la naturaleza, los animales tienden a alimentarse en momentos específicos del día. *C. elegans* depende de la quimiotaxis para moverse en su hábitat natural, y para detectar bacterias de las cuales se alimenta. Estos nematodos son capaces de sensar una gran variedad de señales olfatorias y atrayentes químico, muchos de los cuales son productos generados del metabolismo de las bacterias. Estas señales del medio ambiente son utilizadas por los animales para encontrar su alimento (Riddle 1988; Bargmann, et al. 1993). Por otro lado, el censado de los productos metabólicos producidos por las bacterias podría estar regulado por el ciclo de división celular bacteriano. Un microambiente en el cual la densidad de bacterias sea alta podría ser un entorno propicio para que *C. elegans* se alimente. Varios trabajos muestran la existencia de ritmos circadianos en bacterias. Por ejemplo, en cianobacterias el ciclo de división celular y la expresión

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de muchos de sus genes está bajo control circadiano (Wijnen y Young 2006). Así, la presencia de un reloj biológico permitiría a los organismos predecir los cambios en el medio ambiente que podrían afectar su sobrevivencia (por ejemplo, cambios en la disponibilidad de alimento, en la temperatura, en la humedad, entre otros), y de esta forma otorgarles una ventaja adaptativa.

Comportamiento de defecación

En este trabajo también se demostró la existencia de una variación rítmica diaria en el comportamiento de defecación en *C. elegans*. Bajo condiciones de luz/oscuridad, los nematodos mostraron un aumento en el período del ciclo ultradiano de defecación durante la noche (Figura 22A). Estos resultados indicarían que los nematodos defecan con menos frecuencia durante la noche. Cuando *C. elegans* se alimenta, el flujo de bacterias dentro del tracto digestivo es controlado por dos complejos musculares: (1) el músculo de la faringe y (2) un pequeño grupo de músculos localizados en el extremo posterior del intestino, los cuales controlan la apertura del ano facilitando la eliminación del contenido intestinal por la alta presión interna (Riddle 1988). En este sentido, los resultados obtenidos para el comportamiento de defecación correlacionan con los resultados obtenidos para el comportamiento de alimentación y la contracción del músculo de la faringe.

Bajo condiciones de oscuridad constante, el período del ciclo de defecación de nematodos adultos no mostró una variación circadiana. Teniendo en cuenta estos datos, los resultados indicarían que este comportamiento podría no estar bajo control circadiano (si bien la variación circadiana en el tamaño del ciclo de defecación no alcanzó niveles significativos, se observó que los nematodos defecan con menos frecuencia durante la noche subjetiva).

Consumo de oxígeno

Se estudió el consumo de oxígeno en nematodos adultos bajo condiciones de luz/oscuridad y oscuridad constante. Los resultados del presente trabajo mostraron una variación diaria y circadiana en el consumo de oxígeno en *C. elegans*, con altos valores durante la noche. El máximo fue encontrado a ZT18 (ciclo de luz/oscuridad) y a CT18 (oscuridad constante). Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que la actividad locomotora en *C. elegans* es mayor durante la noche (Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009). Ese patrón de actividad correlaciona con los datos de consumo de oxígeno, los cuales son una medida indirecta del rango metabólico de un organismo.

En la mayoría de los organismos multicelulares, el oxígeno es necesario para que los mismos puedan completar de manera adecuada su ciclo de vida. Bajo condiciones aeróbicas, la mayor parte del oxígeno consumido por un animal es utilizado en la cadena de transporte de electrones mitocondrial que media la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP (trifosfato de adenosina). Todos los animales requieren energía en forma de ATP para poder realizar sus funciones metabólicas. Sin

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

embargo, la fosforilación oxidativa produce una pequeña proporción de especies reactivas de oxígeno (llamadas ROS, del inglés *reactive oxygen species*), como por ejemplo peróxido de hidrogeno y superóxido, dando lugar a la generación de radicales libres los cuales provocan daño celular, envejecimiento, etc. Así, el control circadiano del consumo de oxígeno le permitiría a *C. elegans* optimizar el balance metabólico diario, así como minimizar la producción de ROS para la sobrevivencia de las células.

Conclusiones

Varios trabajos previos, incluyendo los de nuestro laboratorio, muestran que los nematodos son más activos y resistentes a factores estresantes durante la noche (Saigusa, et al. 2002; Simonetta y Golombek 2007; Simonetta, et al. 2009). Esos resultados correlacionan con el ritmo diario y circadiano que fue encontrado en el consumo de oxígeno en *C. elegans*. Sin embargo, el consumo de comida, la contracción de la bomba faríngea y el período de defecación mostraron valores altos durante el día (Figura 24).

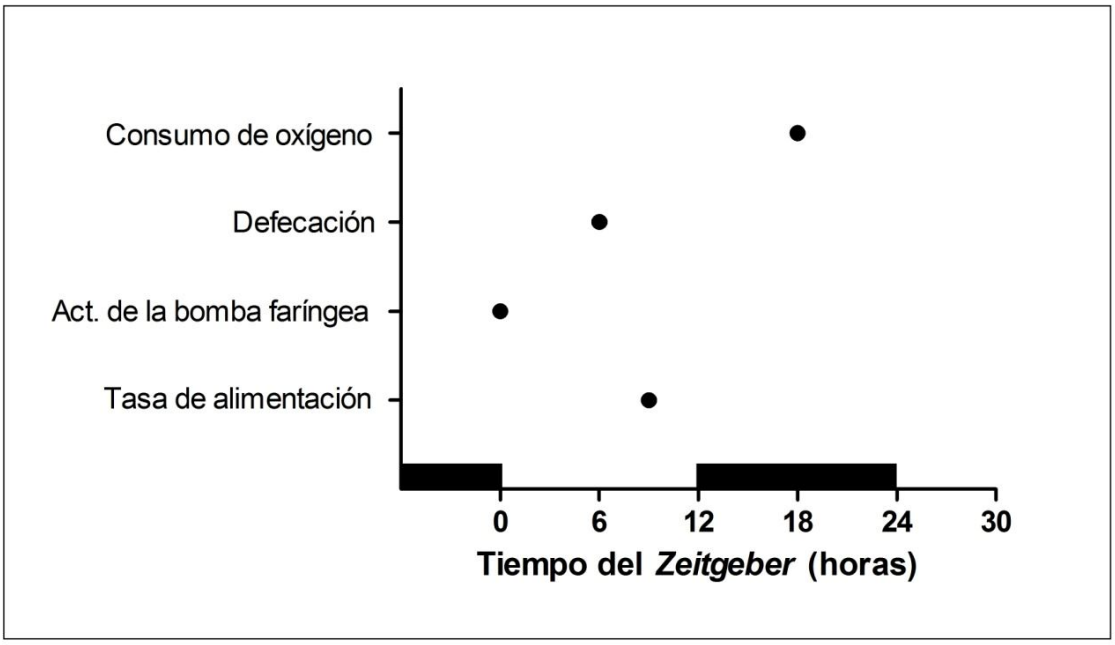


Figura 24. Relación de fases entre las diferentes variables fisiológicas medidas en *C. elegans* en condiciones de luz/oscuridad. Los puntos en la figura representan los máximos de actividad de las variables medidas.

Debido a que el oxígeno difunde rápidamente a través de *C. elegans*, éste no es un factor limitante para la respiración hasta que llega a concentraciones externas por debajo del 4% (Anderson y Dusenbery 1977; Van Voorhies y Ward 2000). Por otro lado, los nematodos tienen una fuerte preferencia comportamental por concentraciones de oxígeno entre el 5-12%, aboliendo los altos y

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

bajos niveles de oxígeno (Gray, et al. 2004). Esa preferencia comportamental por las bajas concentraciones de oxígeno no es solamente un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo, sino también un indicativo de la presencia de bacterias creciendo activamente y consumiendo el oxígeno atmosférico. Por lo tanto, en un microambiente rico en nutrientes (bacterias), los nematodos tenderían a moverse menos debido a que tienen comida en abundancia; adicionalmente, el consumo de oxígeno de *C. elegans* podría disminuir debido a que hay menos oxígenos disponible. Finalmente, la alimentación y la tasa de defecación aumentarían debido a la disponibilidad de comida en el microambiente.

En este trabajo los resultados mostraron una diferencia de fase entre el consumo de comida y la actividad de la bomba faríngea, en el cual se observó un pico de actividad de la bomba faríngea 9 horas antes que el consumo de comida (Figura 24). Esta diferencia de fase puede deberse a problemas metodológicos, ya que la tasa de alimentación se determinó indirectamente midiendo la disminución de la densidad óptica a 600 nm de un cultivo conteniendo *E. coli* OP50. En este sentido, se podría generar un retardo en el valor real de la alimentación probablemente debido a que la concentración de bacterias no haya sido exactamente la misma en los frascos de cultivo. Además, a diferencia del registro de la actividad de la bomba faríngea, el consumo de alimento se determinó poblacionalemente. Por otra parte, se observó un pico de actividad de la bomba faríngea 6 horas antes que el pico de defecación. Si bien el mecanismo de digestión de las bacterias y posterior eliminación de los productos de desecho no ha sido completamente establecido en *C. elegans*, el mismo debería ser un proceso rápido debido al pequeño tamaño de los animales. Aunque se observó una tendencia hacia mayores valores de actividad de la bomba faríngea y defecación durante el día, la diferencia de fase observada probablemente se deba a la frecuencia de muestreo, ya que las medidas fueron realizadas cada 6 horas.

El genoma de *C. elegans* codifica para genes ortólogos a la mayoría de las enzimas claves involucradas en el metabolismos intermediario eucariota, sugiriendo que las principales vías metabólicas probablemente estén presente en estos organismos (Braeckman, et al. 2009). En el presente trabajo se ha estudiado la existencia de posibles genes metabólicos regulados por el ciclo de luz/oscuridad utilizando *microarrays* (Affimetrix) conteniendo 22.500 transcriptos de *C. elegans*, los cuales representan más de los 19.000 genes predichos en estos animales. El experimento fue realizado en condiciones de LD a ZT 18, 30 y 421. Los resultados mostraron que de los genes que ciclaron bajo condiciones de LD (un 75% del total estudiado), aproximadamente el 9% (Figura 25) corresponden a genes involucrados en diferentes procesos metabólicos (Tabla 3). Sin embargo, resta por determinarse si estos genes -u otros-mantienen su expresión rítmica en condiciones de oscuridad constante.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

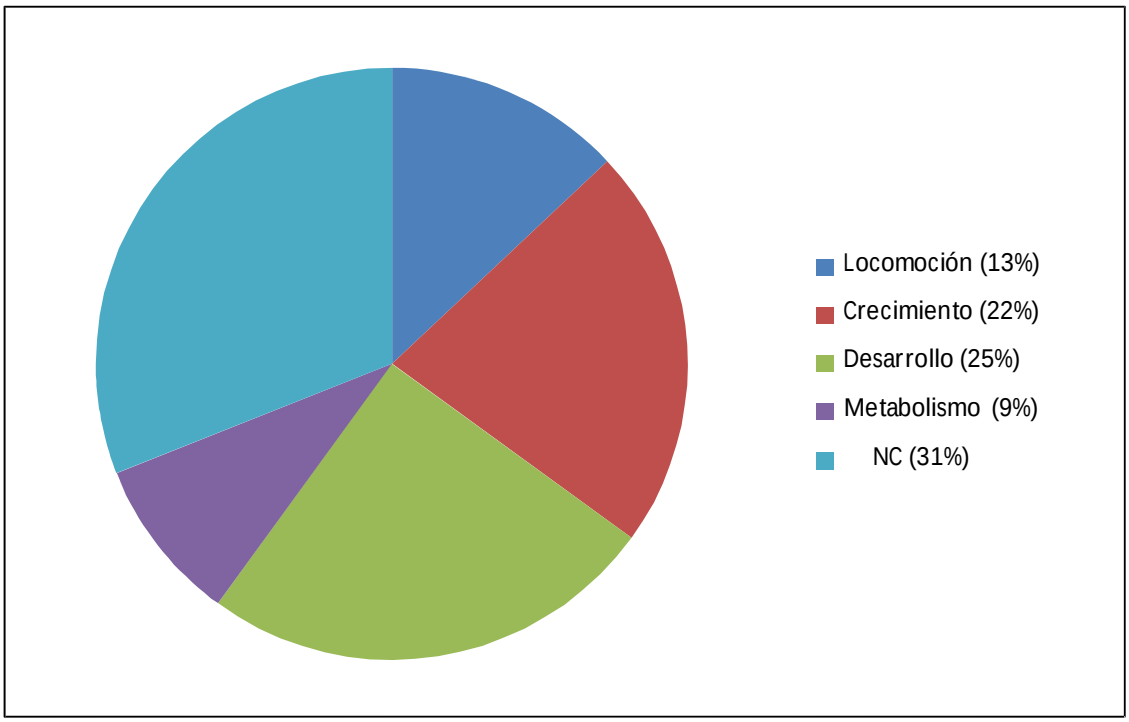


Figura 25. Gráfico circular mostrando la proporción de genes involucrados en diferentes funciones biológicas que ciclaron bajo condiciones de LD en *C. elegans*. Abreviatura: NC = no caracterizados.

NOMBRE DE LA SECUENCIA	NOMBRE DEL GEN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
F54D8.2	*tag-174*	Citocromo C oxidasa subunidad VIa	(Zuryn, et al. 2008)
Y46G5A.21	*acl-7*	Dihidroxiacetonafosfato acetiltransferasa	-
PAR2.3a	*aak-1*	Proteína quinasa activada por AMP (AMPK)	(Narbonne y Roy 2008)
ZK632.4	*ZK632.4*	Fosfomanosa isomerasa	(Kim, et al. 2001)

Tabla 3. Algunos posibles genes metabólicos de *C. elegans* regulados por el ciclo de luz/oscuridad.

En resumen, en este capítulo de tesis se demostró que algunas variables fisiológicas en *C. elegans* tales como alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de oxígeno, tienen ritmos diarios que son mantenidos bajo condiciones constantes. Adicionalmente, se mostró la presencia de posibles genes metabólicos regulados por el ciclo de luz/oscuridad. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la generación de ritmos metabólicos aún no están bien establecidos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Notas

[1] Véase Apéndice.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CAPÍTULO 2

RITMOS DE MELATONINA Y ACTIVIDAD DE ARILALQUILAMINA N- ACETILTRANSFERASA (AA-NAT) EN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Melatonina

La melatonina se encuentra en una gran variedad de organismos, tales como unicelulares, plantas, hongos y animales. En la mayoría de los vertebrados, esta indolamina se sintetiza en la glándula pineal; sin embargo, su síntesis se ha observado también en otras zonas del cuerpo, tales como la retina, el tracto gastrointestinal, la piel, la medula ósea y los linfocitos. En mamíferos, la síntesis de melatonina está regulada por el ciclo de luz/oscuridad a través de los núcleos supraquiasmáticos, y es principalmente secretada durante la noche. En cuanto a la función de la melatonina, su rol principal es la de proveer una señal nocturna que, entre otras cosas, participa en la regulación del sueño, pero también está involucrada en otras actividades cíclicas del cuerpo. Por otra parte, la melatonina es un potente agente antioxidante que protegería a las células del estrés oxidativo.

2. 1. 1. a. Síntesis y metabolismo de la melatonina

El precursor en la síntesis de melatonina es el triptófano. El L-triptofano es captado de la sangre circulante por los pinealocitos, y convertido en serotonina (5-HT) por la enzima triptófano hidroxilasa. Posteriormente, la serotonina es acetilada y convertida en N-acetilserotonina (NAS) por la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT). Esta enzima es, en general, limitante de la reacción. Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida en melatonina por la enzima N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Axelrod y Weissbach 1960) (Figura 26).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

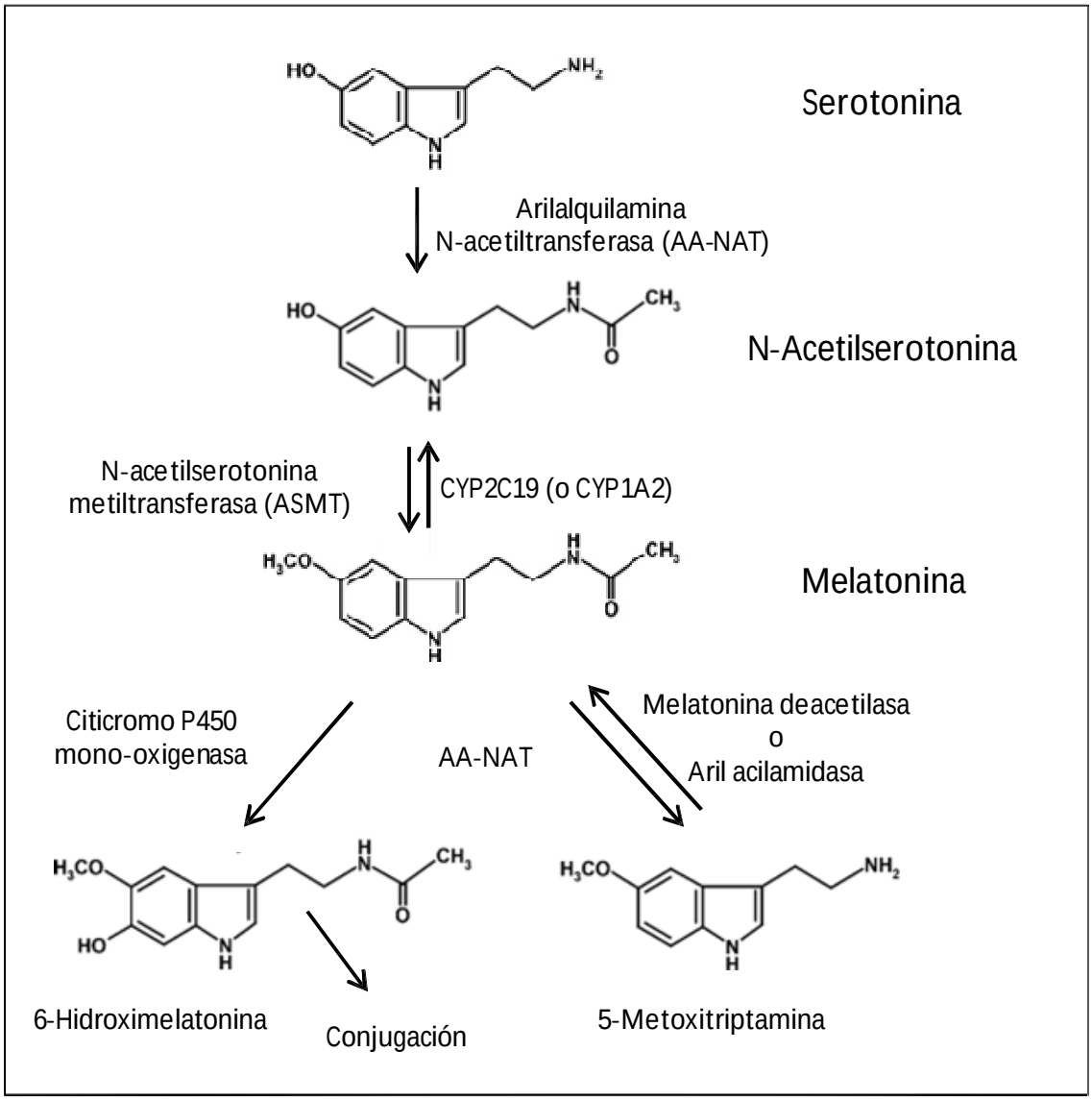


Figura 26. Síntesis de la melatonina. CYP: isoformas del Citocromo P_{450}.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La melatonina es una molécula soluble en lípidos, esa característica le permite atravesar fácilmente las membranas celulares y por lo tanto penetrar en los diferentes tejidos y compartimentos celulares. En mamíferos, la vida media de la melatonina es de unos 20-30 min, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en la periferia. La secreción de melatonina ocurre durante la noche, con un pico entre las 3:00 y las 4:00 h de la madrugada (Claustrat, et al. 2005).

El metabolismo de la melatonina ocurre principalmente en el hígado (Claustrat, et al. 2005). Primero es hidroxilada en la posición C6 por la enzima citocromo P450 mono-oxigenasa, y posteriormente conjugada con sulfato para ser excretada en la orina como 6-sulfatoximelatonina (aMT6S) (Figura 26).

El metabolismo en tejidos extra-hepáticos presenta algunas diferencias (Hardeland, et al. 1993). En la glándula pineal y en la retina, la melatonina es deacetilada por la enzima melatonina deacetilasa, o por la enzima aril acilamidasa, la cual tiene menor especificidad (Figura 26). Por otra parte, la acetilcolinesterasa sensible a la eserina posee un sitio activo aril acilamidasa; por lo tanto, la melatonina puede ser deacetilada a 5-metoxitriptamina en cualquier tejido que posea la enzima acetilcolinesterasa. Adicionalmente, la melatonina puede ser metabolizada por radicales libres u otros agentes oxidantes. De esta forma, es neutralizada por dos radicales hidroxilos convirtiéndose en 3- hidroximelatonina cíclica.

2.1.1.b. Regulación circadiana de la síntesis de melatonina

Dado que la mayoría de la información disponible acerca de la regulación de esta hormona proviene de estudios en vertebrados, nos basaremos en los mismos para explicar su funcionamiento. La detección de la luz por los ojos regula la síntesis de melatonina utilizando fotorreceptores especializados ubicados en la retina. En mamíferos el fotopigmento circadiano principal es la melanopsina. La melanopsina, presente principalmente en un subgrupo de células ganglionares retinianas, transduce la señal lumínica en una señal eléctrica que envía al reloj biológico, es decir, al núcleo supraquiasmatico (NSQ), a través del tracto retino hipotalámico (TRH). En la base del cerebro, estas fibras penetran en el NSQ donde las señales inhiben su actividad eléctrica, generando que el NSQ se inactive. Así, el reloj no puede enviar ninguna señal a la glándula pineal y por lo tanto la pineal restringe la síntesis de melatonina. Es por eso que en mamíferos la secreción de melatonina ocurre principalmente durante la noche.

Los principales componentes que participan en la regulación de la melatonina en mamíferos son: (1) el TRH; (2) conexiones monosinápticas entre los NSQ del hipotálamo y los núcleos paraventriculares (NPV); (3) conexiones monosinápticas entre los NPV y las células pre ganglionares en las columnas de células intermedio laterales (IML), las cuales a su vez inervan una subpoblación de células en el ganglio cervical superior (GCS); y (4) conexiones sinápticas entre el GCS y la pineal (Figura 27 A) (Moore 1996). Brevemente, la información de la luz/oscuridad

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

percibida por los ojos llega a los NSQ a través del TRH (Dibner, et al. 2010). El NSQ envía axones al NPV. Estas últimas células envían proyecciones a las células IML de la medula espinal, a través del fascículo medial del pro encéfalo (FMP) y la formación reticular (FR). Finalmente, las células del GCS envían proyecciones a los pinealocitos regulando la síntesis de melatonina por la liberación de norepinefrina (NE) (Moore 1996; Ganguly, et al. 2002).

Durante el período de oscuridad se produce un fuerte incremento en la actividad de las neuronas postganglionares que se traduce en un aumento en la síntesis y liberación del neurotransmisor NE (Brownstein y Axelrod 1974; Craft, et al. 1984) en la cercanía de los pinealocitos (Figura 27 B). La interacción de NE con los pinealocitos inicia una secuencia de procesos moleculares que han sido encontrados en la mayoría de los mamíferos estudiados hasta el momento. La NE interactúa con receptores α1 y β1-adrenérgicos (AR) presentes en los pinealocitos.

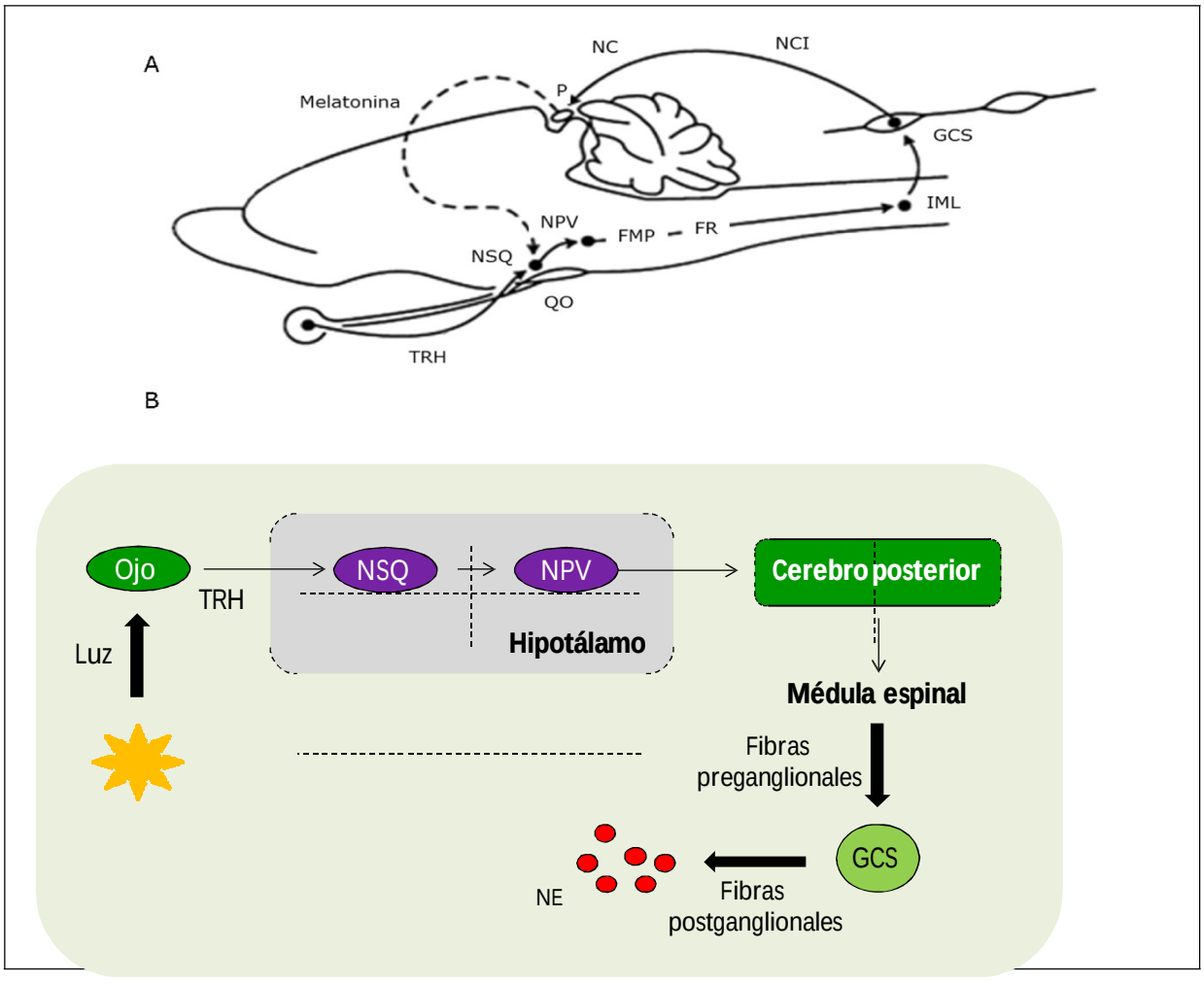


Figura 27. Vías involucradas en la generación rítmica de melatonina. A) Dibujo esquemático de las principales proyecciones que participan en la síntesis rítmica de melatonina en mamíferos. B) Principales mecanismos de control que participan de la síntesis de melatonina por la liberación del neurotransmisor norepinefrina. Abreviaturas: TRH, tracto retino hipotalámico; NSQ, núcleos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

supraquiasmaticos; QO, quiasma óptico; NPV, núcleos paraventriculares; FMP, fascículo medial del pro encéfalo; FR, formación reticular; IML, células intermedio laterales; GCS, ganglio cervical superior; NCI, nervio carotideo inferior; NC, nervi conarii ; P, pineal; NE, norepinefrina. Modificado de Ganguly et al., 2002.

La activación de β_1-AR estimula la formación de una adenilato ciclasa (AC) vía proteína G; la activación de α_1-AR induce un flujo transitorio de Ca^{+2} y diacilglicerol al interior celular. El aumento en los niveles de calcio y diacilglicerol intracelular activan la enzima proteína kinasa C (PKC), la cual potencia la activación de los receptores β1-AR (Sugden y Klein 1988; Moller y Baeres 2002). En respuesta a estas señales, aumenta la producción de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular. Todas estas cascadas de señalización conducen eventualmente a la fosforilación de la proteína CREB -vía proteína kinasa dependiente de AMPc (PKA)- y a la activación de las enzimas involucradas en el metabolismo de la melatonina, particularmente de la AA-NAT (Roseboom y Klein 1995) (Figura 28).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

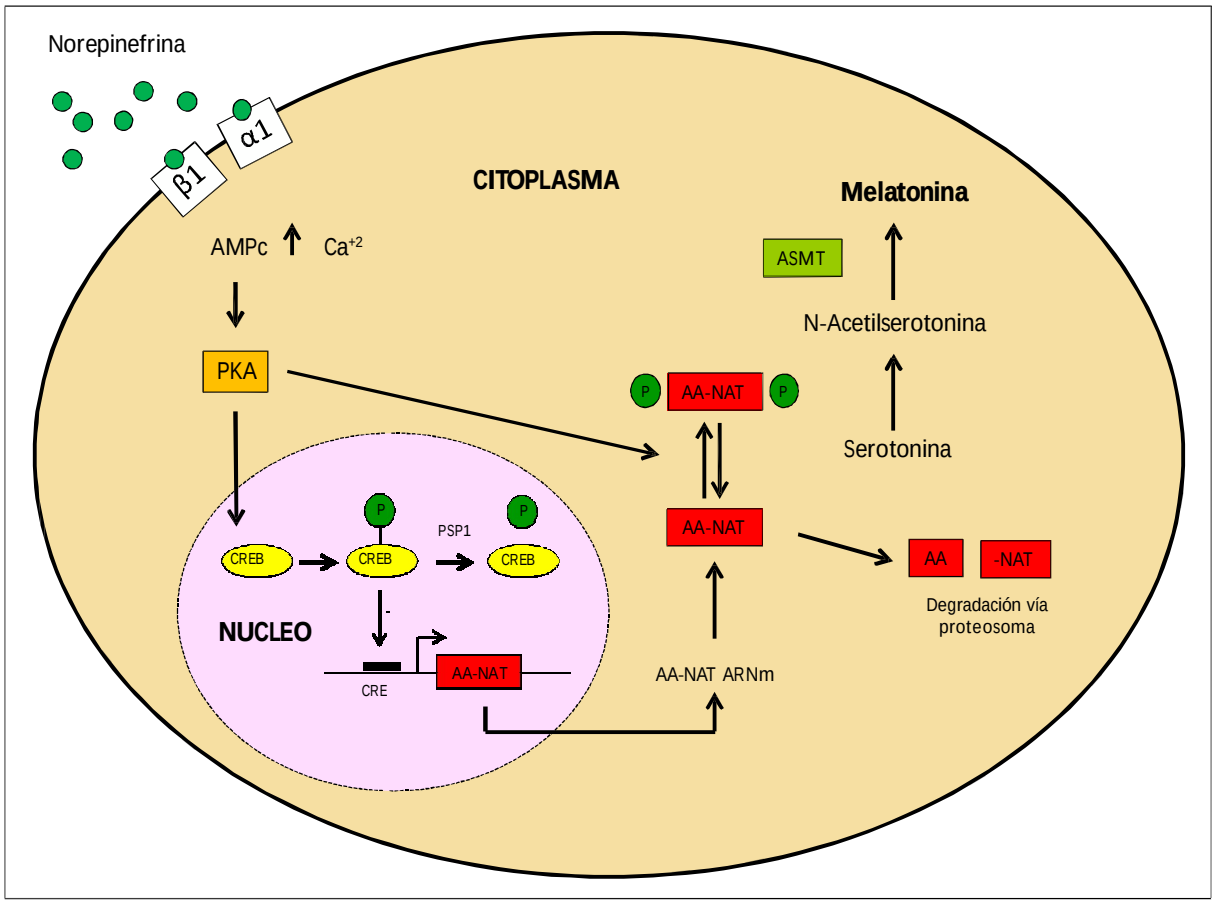


Figura 28. Elementos de activación e inhibición que participan en la regulación de la síntesis de melatonina en la glándula pineal de ratón. Elementos de activación: aumento de AMPc, fosforilación de CREB, fosforilación de AA-NAT. Elementos de inhibición: de fosforilación de pCREB por PSP1, degradación de AA-NAT vía proteosoma. La norepinefrina interactúa con receptores α1 y β1-adrenérgicos presentes en los pinealocitos, aumentando los niveles de AMPc y estimulando la síntesis de melatonina. AA-NAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa, ASMT: N-acetilserotonina metiltransferasa, PSP1: proteína serina/treonina fosfatasa, PKA: proteína kinasa dependiente de AMPc, CREB: cAMP *response element binding protein* (Proteína de unión al sitio CRE), α1 y β1: receptores α1 y β1-adrenérgicos.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Otros neuropéptidos como el péptido vasoactivo intestinal (VIP), el neuropeptido Y (NPY) y el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) también estimulan la liberación de NE (Karolczak, et al. 2005). En vertebrados, la fosforilación dependiente de AMPc de la proteína AA-NAT promueve su activación y la protege de la degradación vía el proteosoma (Ganguly, et al. 2001a; Obsil, et al. 2001). El aumento de la actividad de la AA- NAT acelera la conversión de 5-HT en N-acetilserotonina, la cual es convertida rápidamente en melatonina por la enzima ASMT (Figura 26). En humanos el pico de secreción de melatonina se produce entre las 2 y las 6 de la mañana.

2.1.1.c. Efectos de la luz sobre la síntesis de melatonina

Un efecto importante de la luz es inhibir la producción nocturna de melatonina por la glándula pineal. Cuando se aplica un breve pulso de luz durante la noche, por ejemplo de unos minutos, la síntesis de melatonina cae rápidamente. Así, cortos intervalos de luz durante la noche hacen que los niveles de melatonina alcancen valores similares a los que se observan durante el día. Experimentos realizados en ratas demostraron que la liberación de NE disminuye cuando los animales son expuestos a un pulso de luz durante la noche (Drijfhout, et al. 1996a; Drijfhout, et al. 1996b).

Existen varios neurotransmisores propuestos que participan en esta inhibición presináptica: GABA, NPY y la acetilcolina (Govitrapong, et al. 1989; Rosenstein, et al. 1990; Simonneaux, et al. 1994; Simonneaux y Ribelayga 2003). Por otra parte, experimentos de microdiálisis demostraron que los niveles extracelulares de NE disminuyen antes del final de la noche (Drijfhout, et al. 1996c). De esta forma, se produce una caída en los niveles intracelulares de AMPc con la consiguiente disminución de la actividad de AA-NAT y síntesis de melatonina. Estas oscilaciones también se encuentran fuertemente reguladas tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. A nivel post- transcripcional, la disminución en los niveles de AMPc permite la degradación mediada por el proteosoma de la proteína AA-NAT y, con ello, una disminución en la síntesis de melatonina (Ganguly, et al. 2005; Schomerus y Korf 2005). A nivel transcripcional, se han aportado datos sobre la existencia de mecanismos de regulación que involucran la existencia de factores inhibidores de la transcripción génica (Stehle, et al. 1993; Baler, et al. 1997).

Por otro lado, la inhibición de la producción nocturna de melatonina por la luz depende de la luminosidad y de la longitud de onda (con un pico hacia los 470–475 nm: luz azul), así como del momento de la fase de oscuridad en el que se produce la exposición (Madrid y Rol de Lama 2006a).

2.1.1.d. Mecanismos de acción y efectos fisiológicos de la melatonina

La melatonina liberada por la glándula pineal es distribuida por la circulación a todas las estructuras centrales y periféricas del organismo, y ejerce su acción a través de la interacción con

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

receptores de membrana (receptores MT1 y MT2) y nucleares (receptores RZR/RORα y RZRβ), por interacción con proteínas intracelulares y por interacciones químicas, como las asociadas a la actividad antioxidante de la melatonina. Los sitios de unión para melatonina fueron obtenidos utilizando los análogos radioactivos 2-[125I]-melatonina y [3H]-melatonina; se encuentran distribuidos en diferentes regiones del sistema nervioso central, en arterias cerebrales y en diferentes tejidos específicos, como las adrenales, órganos linfoides primarios y secundarios, corazón, glándulas mamarias entre otros. Actualmente se han identificado 2 tipos de receptores de membrana, MT1 y MT2, y muchos otros sitios de unión cuya función aún es poco conocida (Reppert, et al. 1994; Reppert, et al. 1995a; Nosjean, et al. 2000). Los receptores del tipo MT1 se expresan principalmente en la retina, núcleo supraquiasmático, arterias caudales, pars tuberalis entre otros. Los receptores del tipo MT2 poseen baja afinidad para melatonina y alta afinidad para N- acetilserotonina, y se expresan principalmente en la retina. Ambos receptores poseen siete dominios transmembrana y están acoplados a proteína G, y su activación modula una gran variedad de mensajeros intracelulares (por ejemplo, AMPc, GMPc o concentración de calcio). Existe además un tercer subtipo de receptor, denominado Mel 1c, que fue encontrado en la retina y cerebro de especies no mamíferas como pez cebra, *Xenopus* y pollo (Reppert, et al. 1995b; Park, et al. 2007). La presencia de ritmos circadianos se ha observado no sólo en la síntesis de melatonina sino también en la densidad de receptores para esta indolamina. Por ejemplo, en el NSQ de ratón la densidad de receptores es mayor en el inicio de la fase de oscuridad y menor en el final de esta.

La melatonina es una molécula liposoluble que puede atravesar las membranas celulares, y por lo tanto pueden existir una gran variedad de acciones intracelulares de la hormona no mediadas por receptores de membrana (Reiter 1991). Benitez-King et al. (1996) encontraron un efecto inhibitorio de la hormona sobre la actividad de proteínas quinasas dependientes de Ca+2/calmodulina (Benitez-King, et al. 1996). Por otro lado, la melatonina es un potente agente antioxidante que protege a las células del estrés oxidativo, actuando de manera estimuladora sobre la actividad de enzimas antioxidantes (por ejemplo, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa), o suprimiendo la actividad de enzimas prooxidantes (por ejemplo, oxido nítrico sintetasa y 5-lipoxigenasa) (Rodriguez, et al. 2004; Mathes, et al. 2008).

En mamíferos, la melatonina ha sido implicada directa o indirectamente en diferentes funciones biológicas. Alguna de estas acciones son: (1) modulación del ciclo sueño/vigilia; (2) regulación de los ritmos circadianos; (3) sincronización; (4) reproducción; (5) modulación de la neurotransmisión cerebral; (6) sistema inmune y cáncer; (7) acción protectora celular y envejecimiento.

2.1.2. Estructura y evolución de las AA-NAT

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

La enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) se expresa en altos niveles en los pinealocitos y en las células fotorreceptoras de la retina (Klein, et al. 1997). Como se mencionó antes, la AA-NAT controla los cambios diarios en la síntesis de melatonina por la glándula pineal. Durante la noche, la actividad de AA-NAT se incrementa de 10 a 100 veces generando un aumento en la producción y liberación de melatonina.

La enzima AA-NAT pertenece a las proteínas de la superfamilia GNAT (GCN5-N-acetyltransferasa) (Vetting, et al. 2005). Todos los miembros de la superfamilia GNAT poseen un dominio de unión a acetil coenzima A (Ac-CoA), y además cada miembro de la familia tiene especificidad por un sustrato determinado. La superfamilia GNAT también incluye otra familia arilalquilamina N-acetiltransferasa representada por dopamina N-acetiltransferasa (Dat) la cual se expresa en *Drosophila melanogaster* (Hintermann, et al. 1995; Hintermann, et al. 1996; Amherd, et al. 2000), y está implicada principalmente en la esclerotización de la cutícula (Wittkopp, et al. 2003) y en la neurotransmisión.

Miembros de la familia AA-NAT han sido encontrados en bacterias Gram positivas, hongos, algas, cefalocordados y vertebrados. Se cree que mediante un evento de transferencia horizontal de genes, un gen *aanat* ancestral de bacterias Gram positivas pudo haber sido transferido horizontalmente a una célula de la línea germinal de un vertebrado ancestral (Iyer, et al. 2004; Coon y Klein 2006). Algunos homólogos de AA-NAT carecen de las características principales que caracterizan a las AA-NATs (Figura 29), incluyendo diferencias dentro del núcleo catalítico, y la presencia de regiones regulatorias (Liu, et al. 2005; Coon y Klein 2006). Las regiones regulatorias N y C-terminal regulan la activación/inactivación (así como la protección/degradación) de la enzima por fosforilacion de residuos S/T en el motivo PKA/14-3-3 (sitio de fosforilacion dependiente de fosfoquinasa A alojado en el motivo de unión 14-3-3). El centro catalítico está formado por dos regiones, una región de unión a arilalquilaminas y otra región de unión a Ac- CoA. Además, 3 *loops* están presentes en todas las AA-NATs (*loop* 1, 2 y 3); en invertebrados, el *loop* 1 es más largo debido a la adición de un triplete conservado CPL el cual está implicado en la unión y/o catálisis del sustrato.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

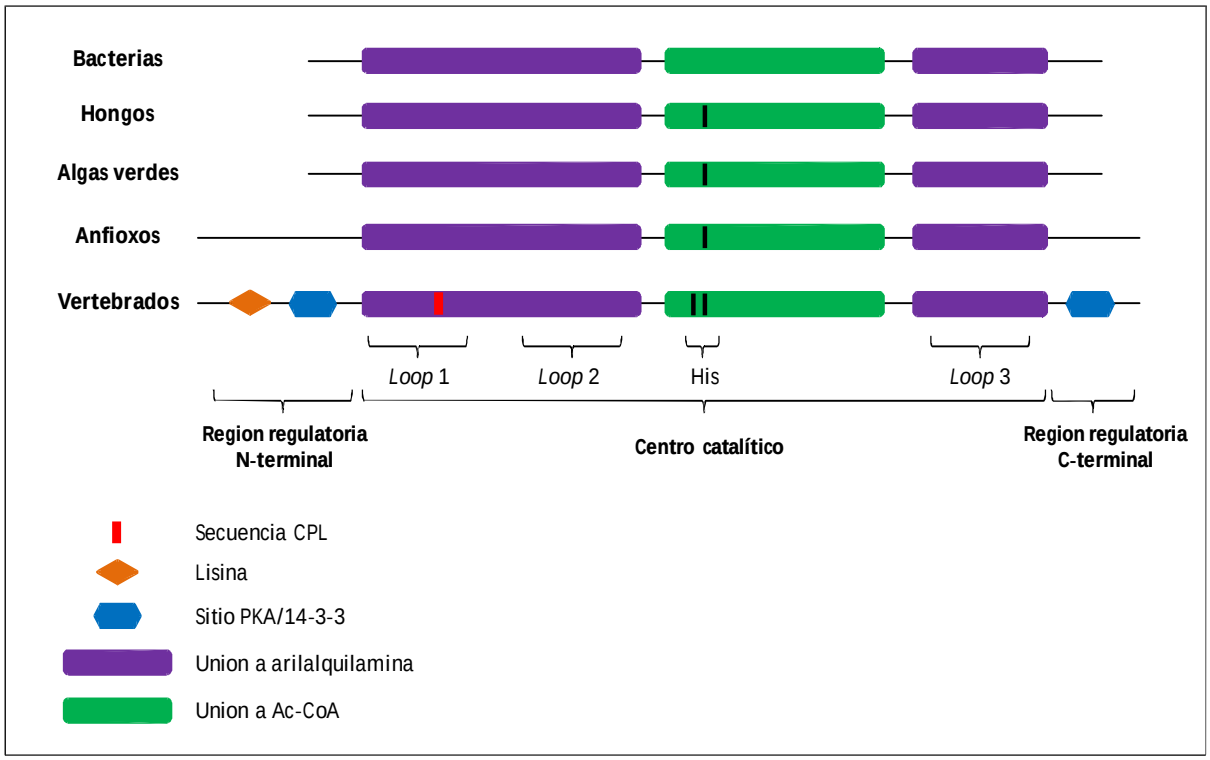


Figura 29. Organización estructural de las AA-NATs.

Las AA-NATs acetilan preferentemente arilalquilaminas, como por ejemplo serotonina, tiramina, dopamina, triptamina y feniletilamina. Sin embargo, homólogos de AA-NAT en hongos acetilan tanto arilalquilaminas como poliaminas, estas acetilaciones se llevan a cabo con eficiencias similares (Ganguly, et al. 2001b; Liu, et al. 2005).

En *C. elegans* las AA-NATs no han sido caracterizadas, pero se sabe que el genoma de los nematodos codifica para algunas proteínas que poseen un dominio de acetiltransferasa característico de la superfamilia GNAT. En el presente capitulo analizaremos mediante una búsqueda bioinformática posibles AA-NAT en los nematodos.

2.1.3. Melatonina y AA-NAT en invertebrados

La melatonina parece ser una molécula esencial para el desarrollo de la vida, de acuerdo con los estudios que indican su notable conservación a lo largo de toda la escala filogenética. En varios invertebrados, insectos y crustáceos se ha detectado o medido la AA-NAT, la ASMT, la N-Acetilserotonina y/o la melatonina; como por ejemplo en *Gryllus bimaculatus* (Itoh, et al. 1995) y en *Acyrthosiphon pisum* (Hardie y Gao 1997). En invertebrados la síntesis de melatonina no es

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

necesariamente circadiana, pero de ser así, el pico de secreción de la hormona no siempre es nocturno, aunque los máximos se encuentran con frecuencia durante la noche. En cuanto a la función de la melatonina, en mamíferos su rol principal es la regulación del sueño, pero en invertebrados y plantas la existencia de ritmos diarios de melatonina podría deberse a la función antioxidante que posee dicha hormona, en relación a los radicales libres (por ejemplo, radicales peroxilos y radicales hidroxilos) generados en las bacterias por reacciones fotoquímicas y en las plantas como resultado de la fotosíntesis. Por otra lado, las AA-NATs de insectos -además de su función en la biosíntesis de NAS/melatonina- están involucradas en la inactivación de neurotransmisores aromáticos y esclerotización de la cutícula (Smith 1990).

En la cucaracha *Periplaneta americana* se midió el contenido de melatonina y la actividad de AA-NAT (Bembenek, et al. 2005). En condiciones de luz/oscuridad, estos investigadores observaron altos niveles de melatonina y actividad de AA-NAT durante la noche. Estos ritmos persistieron en condiciones de oscuridad constante. Por otra parte, experimentos realizados en *Dugesia japónica* demostraron una variación rítmica en la actividad de AA-NAT y ASMT, así como en los niveles de melatonina, con un máximo hacia la mitad de la noche (Itoh, et al. 1999). En condiciones de DD, la actividad de AA-NAT y los niveles de melatonina fluctuaron con un ritmo circadiano. Trabajos de Masiel y colaboradores (2008) demostraron ritmos diarios y circadianos en el contenido de melatonina en el lóbulo óptico del cangrejo *Neohelice granulate*. En este trabajo los resultados mostraron que los cangrejos poseen dos picos de secreción de melatonina, uno durante el día, y otro, de mayor duración, durante la noche (Maciel, et al. 2008). Por otro lado, en *Drosophila melanogaster* dos genes de AA-NAT han sido clonados (Hintermann, et al. 1995; Hintermann, et al. 1996; Amherd, et al. 2000), aunque ninguno de ellos mostró una variación circadiana en su expresión. El gen *dm*AA-NAT1 codifica para dos isoformas de la proteína. Ambas enzimas son específicas de tejido y estadio embrionario, por ejemplo la AA-NAT1a se expresa en el cerebro adulto de las moscas (Brodbeck, et al. 1998).

Como se mencionó antes, en mamíferos la melatonina ejerce su acción a través de la interacción con receptores de membrana (receptores MT1 y MT2), y algunos otros sitios de unión con función poco conocida. Trabajos previos muestran que el agregado de melatonina en las placas de cultivo reduce la locomoción de *C. elegans* a través de receptores tipo MT1 (Tanaka, et al. 2007). Además, estos autores encontraron que los nematodos poseen melatonina la cual posiblemente pueda ser usada como un neuromodulador en estos animales.

Parte del presente trabajo de tesis fue estudiar la existencia de ritmos diarios y circadianos en la síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.2. OBJETIVOS

Objetivos del presente capítulo

1- Determinar la presencia de un patrón rítmico en la síntesis de melatonina en *C. elegans.*

2- Estudiar la variación diaria y circadiana en la actividad de AA-NAT (enzima clave involucrada en la síntesis de la melatonina).

3- Estudiar el efecto de la luz sobre la actividad de AA-NNAT.

4- Buscar posibles AA-NATs en *C. elegans* utilizando herramientas bioinformáticas.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

Se utilizaron animales de la especie *Caenorhabditis elegans*, cepa TJ1060 [spe9(hc488); fer15(b26)] y JT73 (itr-1(sa73)). La misma fue provista por el *Caenorhabditis Genetics Center, University of Minesotta, MN, USA*. La cepa TJ1060 posee una mutación sensible a la temperatura que evita la autoreproducción de los nematodos a 25ºC, pero permite la reproducción de los mismos a 18,5ºC (Fabian y Johnson 1994).

Los nematodos se mantuvieron en placas de *petri* con medio NGM (NaCl 0,3%, Peptona 0,25%, Colesterol 5 µg/ml, $CaCl_2$ 1 mmol/l, $MgSO_4$ 1 mmol/l, Agar 1.7% en *buffer* fosfato de potasio 25 mmol/l a pH 6,0), sembradas con una monocapa de *Escherichia coli* cepa OP50; bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (llamado LD, por *light-dark* 12:12), con el encendido de las luces a las 9:00 AM (definido como *zeitgeber time* 0 o ZT0). Las condiciones de temperatura fueron constantes (16°C).

Para la realización de los experimentos, poblaciones de gusanos se sincronizaron al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Los huevos obtenidos de la sincronización se cultivaron durante toda la noche en 3,5 ml de *buffer* M9 (Na_2HPO4 42 mM, KH_2PO4 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO4 1 mM) + antibiótico antimicótico 1x (Gibco, USA); en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y a 18,5°C, bajo un fotoperiodo de LD 12:12. Al día siguiente (en el momento en que se prenden las luces, convencionalmente llamado *Zeitgeber time* 0 o ZT0) aproximadamente 6.000 larvas L1 se transfirieron a placas de *petri* con medio NGM, previamente sembradas con *E. coli* cepa NA22. Las larvas L1 fueron cultivadas bajo un fotoperiodo de LD 12:12 y a temperatura constante de 25°C hasta alcanzar el primer día de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

estadío adulto.

En condiciones de luz/oscuridad (LD) los registros comenzaron con animales en el primer día de estadío adulto a ZT18). Bajo condiciones de oscuridad constante (DD, por *dark-dark*) los registros comenzaron con animales en el primer día de estadío adulto a CT24. Los nematodos se levantaron de la placa de cultivo con 3 ml de *buffer* M9 y se lavaron 3 veces con 14 ml del mismo *buffer*. Los lavados se centrifugaron por 1 minuto a 1.800 rpm y el *pellet* de gusanos se conservó a -80°C. Para la determinación de la actividad de AA-NAT, el *pellet* de gusanos se resuspendió en 200 µl de *buffer* fosfato 0,05 M (pH = 6,8) y posteriormente se conservó a -80°C. En los casos en los que hubo que trabajar con los animales en oscuridad, se utilizó una fuente de luz roja de intensidad menor a 1 lux. Este tipo de luz no posee efectos sobre la sincronización de *C. elegans* (Simonetta, et al. 2009). Los experimentos se llevaron a cabo en 2 momentos independientes con 2 réplicas biológicas por cada punto horario.

Todas las drogas utilizadas se compraron en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

2.3.2. Determinación del contenido de melatonina

Se homogeneizó el pellet congelado de gusanos mediante homogeneizadores de vidrio en HCL 0,1M (sobre hielo), y posteriormente los gusanos se lisaron por sonicacion (60 Sonic Dismembrator: modelo F60). La melatonina se determinó por radioinmmuno ensayo (RIA) (Faillace, et al. 1994). Brevemente, la melatonina se extrajo con 2 ml de diclorometano, y la fase orgánica se lavó tres veces con $NaHCO_3$ al 2% y H_2O destilada. Posteriormente, alícuotas de la fase orgánica se secaron al vacío. Se agregó a cada tubo [H^3] melatonina (20.000– 24.000 dpm; actividad específica: 38,8 Ci/mmol) y 50 µl de antisuero de conejo (provisto por el Dr. Takashi Matozaki, *Laboratory of Biosignal Sciences, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, Japan*), resuspendidos en 100 µl del *buffer* de incubación. Las muestras se incubaron a 37°C por 2 horas. Se agregó a cada tubo 250 µl de $(NH4)_2SO_4$, y se centrifugó a 5.000 *g* por 20 minutos a 4°C. Se utilizó el *pellet* resuspendido en agua para cuantificar la radioactividad presente en los complejos antígeno/anticuerpo utilizando un contador de centelleo líquido. Los valores de melatonina se obtuvieron a partir de una curva de calibración estándar (el límite de sensibilidad del ensayo fue de 20 pg por tubo).

2.3.3. Determinación de la actividad de AA-NAT

Se homogeneizó el pellet de gusanos resuspendido en 200 µl de *buffer* fosfato mediante homogeneizadores de vidrio (sobre hielo), y posteriormente los gusanos se lisaron por sonicacion (60 Sonic Dismembrator: modelo F60). 30 µl de los homogenatos (conteniendo 50 µg de proteínas totales) se incubaron a 37°C por 30 minutos en presencia de 5 µl de 5-hidroxitriptamina 5,6 mM, 10

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

µl de acetil [1-14C] coenzima A 25 moles/litro y 10 µl de *buffer* fosfato 0,05 M, pH = 6,8 (Champney, et al. 1984). La reacción se detuvo con 100 µl de *buffer* borato 0,2 M, pH = 10, y 1 ml de cloroformo. Las muestras se agitaron por 3 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm por 5 minutos. La fase orgánica se lavó con 100 µl de *buffer* borato 0,2 M, pH = 10. Para la cuantificación de la radioactividad, 0,5 ml de la fase orgánica se secaron por evaporación.

Para el experimento de pulsos de luz, nematodos en el primer día de estadío adulto se colocaron en condiciones de oscuridad constante (DD) durante 1 día y medio. El pulso de luz (400 lux, 2 horas) se administró a CT16-18 utilizando filtros de color rojo, azul y verde (Lee Filters). El espectro estándar de cada filtro se encuentra en:

htt://www.leefilters.com/lighting/products/finder/act:colourdetails/colourRef:C4630710C4401B/.

2.3.4. Análisis de secuencias

Con el objetivo de encontrar posibles AA-NAT en *C. elegans*, se realizó un estudio bioinformático. Para ello, las secuencias peptídicas de las proteínas de *C. elegans* que poseen dominios GNAT (GCN5-N-acetyltransferasa) se obtuvieron a partir de *wormbase* (disponible en http://www.wormbase .org/). Los potenciales sitios de fosforilación se predijeron utilizando la herramienta bioinformática Scan Prosite at Expasy Server (Hulo, et al. 2006). Para determinar similitud entre secuencias se utilizó el programa BlastP, usando parámetros estándares. Para la construcción de los árboles filogenéticos, las secuencias peptídicas se alinearon utilizando el programa T-Coffee (disponible en http://toolkit.tuebingen.mpg.de/t_coffee). Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el programa MEGA usando el método de Neighbor-Joining y el modelo de Poisson para la sustitución de aminoácidos (Saitou y Nei 1987; Kumar, et al. 2004). El porcentaje de ramas en las que los taxones asociados se agrupan en el test de *bootstrap* (con 1000 réplicas) se muestra junto a las ramas. Las distancias netas entre los taxones se determinaron calculando el número de sustituciones de animoácidos por sitio de acuerdo con la estimación del promedio entre grupos de secuencias. El análisis se realizó mediante el modelo de corrección de Poisson.

2.3.5. Análisis de los datos

Se emplearon pruebas estadísticas como ANOVA a una vía, y *test* de Dunnet para las comparaciones entre grupos (grupo control: ZT24 y CT24 para LD y DD respectivamente). Todos los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Melatonina y actividad de AA-NAT en *Caenorhabditis elegans*

Como se mencionó en la introducción, la síntesis de melatonina pineal en mamíferos está regulada por el ciclo de luz/oscuridad a través de los núcleos supraquiasmaticos (NSQ). En vertebrados, el evento principal que regula el ritmo en la producción de melatonina es un aumento nocturno de la síntesis de la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), responsable de la síntesis de la indolamina. El patrón rítmico en los niveles de AA-NAT - altos durante la noche y bajos durante el día - persiste en ausencia de señales fóticas, indicando que el ritmo en la actividad de AA-NAT está bajo control circadiano y, por lo tanto, impone el ritmo de síntesis de melatonina.

2.4.1. a. Síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT bajo condiciones de luz/oscuridad

Para determinar si el cotenido de melatonina de nematodos adultos varía a través del día, los niveles de la misma se determinaron por radioinmmunoensayo (RIA). Las medidas fueron realizadas a ZT18, 24, 30, 36, 42 y 48 (con 2 réplicas biológicas por cada punto horario). En condiciones de luz/oscuridad (LD) se halló una variación diaria en los niveles de melatonina (ANOVA $p = 0.0223$). Como se puede observar en la Figura 30A, se halló un pico a ZT18 (esto es, 6 horas luego del apagado de las luces), y un mínimo valor alrededor de ZT0-6 ($p<0.05$, *test* de Dunnet para las comparaciones entre grupos). Para evaluar la presencia de melatonina en la fuente de alimento, se analizó una muestra de *E. coli* NA22 por RIA a ZT0 y ZT12. Los resultados mostraron niveles no significativos de melatonina en las bacterias (datos no mostrados).

La síntesis de melatonina se inicia a partir de la serotonina, que es acetilada y convertida en N-acetilserotonina por la enzima arilalquilamina N- acetiltransferasa (AA-NAT). Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida en melatonina por la enzima N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Axelrod y Weissbach 1960). Con el fin de estudiar la posible existencia de una variación diaria en la actividad de AA-NAT de nematodos adultos, la actividad de la enzima fue medida a lo largo del día en condiciones de LD. Los registros fueron realizados a ZT18, 24, 30, 36, 42 y 48 (con 2 réplicas biológicas por cada punto horario). En estas condiciones, se halló una variación diaria en la actividad de AA-NAT (ANOVA $p = 0.002$) (Figura 30B) con un pico a ZT12 y un mínimo valor a ZT18-24 ($p<0.05$, *test* de Dunnet para las comparaciones entre grupos). Para evaluar la actividad de la enzima en la fuente de alimento, se analizó una muestra de *E. coli* NA22 a ZT12. Los resultados mostraron niveles de actividad de AA-NAT no significativos

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(datos no mostrados).

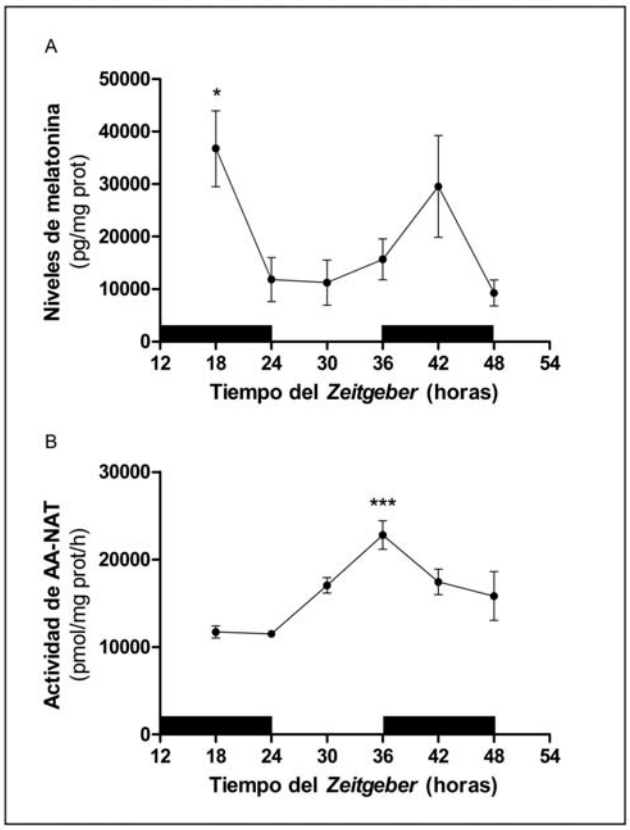


Figura 30. Variación diaria en los niveles de melatonina (A) y actividad de AA-NAT (B) en Caenorhabditis elegans bajo condiciones de LD (luz/oscuridad). Los niveles de melatonina y actividad de AA-NAT muestran una variación diaria significativa con un máximo durante la mitad de la noche y la noche temprana, respectivamente. Todos los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM.
*P < 0.05, ***P < 0.001.

2.4.1.b. Ritmo diario de actividad de AA-NAT bajo condiciones de oscuridad constante

Para estudiar si la actividad de AA-NAT está bajo control circadiano, la actividad de la enzima fue medida en condiciones de oscuridad constante (DD). Los registros fueron realizados a CT24, 30, 36, 42, 48, 54 y 60 (con 2 réplicas biológicas por cada punto horario). Como se puede observar en la Figura 31, el ritmo diario en la actividad de AA-NAT fue mantenido en condiciones constantes (ANOVA $p < 0.0001$), con un máximo durante la noche subjetiva. El pico fue encontrado a CT12, con un mínimo valor a CT6 ($p<0.05$, *test* de Dunnet para las comparaciones entre grupos). Para evaluar la actividad de la enzima en la fuente de alimento, se analizó una muestra de *E. coli* NA22 a CT12. Los resultados mostraron niveles de actividad de AA-NAT no significativos (datos no mostrados).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

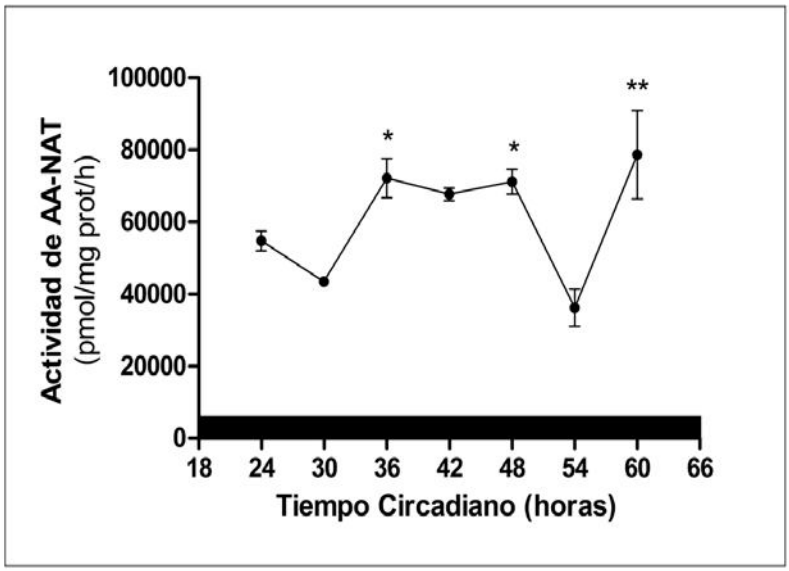


Figura 31. Variación diaria en la actividad de AA-NAT en *C. elegans* bajo condiciones constantes. La actividad de AA-NAT mostró una variación circadiana significativa con altos niveles de la enzima a CT12. Los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM. *P < 0.05, **P < 0.01.

2.4.1.c. Efecto de la luz en la actividad de AA-NAT

En 1985, Burr et al. demostraron experimentalmente que *C. elegans* responde a la luz visible (540nm). Recientemente se ha reportado que *C. elegans* puede sensar la luz ultravioleta y que un estímulo lumínico (ultravioleta, azul o violeta) produce una respuesta fototáxica negativa en el nematodo (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008). En el presente capitulo se demostró una variación diaria y circadiana en la actividad de AA-NAT, con valores máximos durante la noche temprana, tanto en condiciones de luz/oscuridad como en oscuridad constante.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

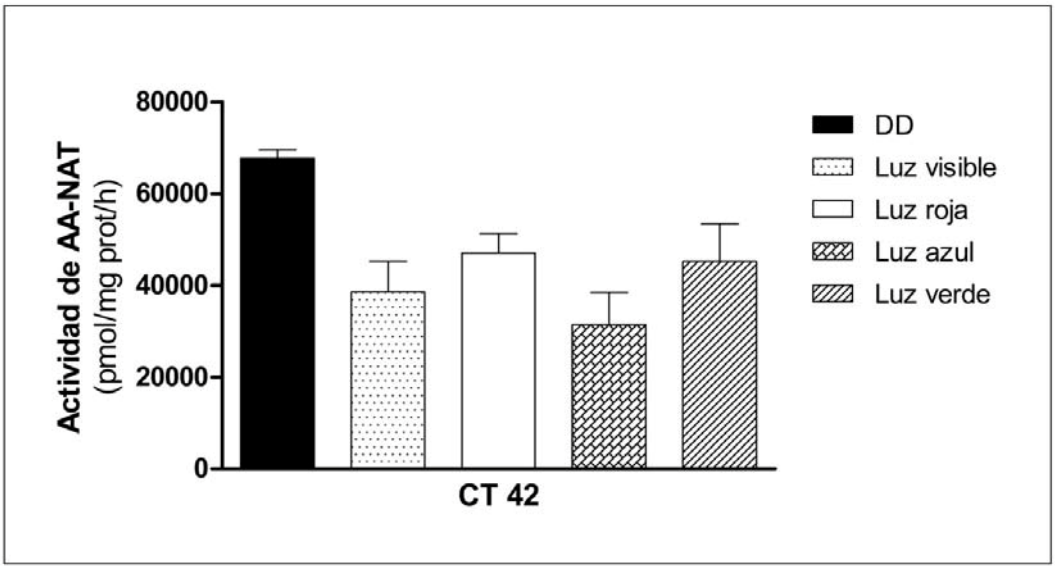


Figura 32. Actividad de AA-NAT en *C. elegans* bajo condiciones de oscuridad constante (DD) y expuesto a 2 horas (CT16-18) de luz monocromática (roja, azul y verde), así como a luz blanca proveniente de una fuente comercial. Tanto la luz blanca como la luz azul inhibieron significativamente la actividad de la AA-NAT en comparación con el grupo control (DD). Todos los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM. *P < 0.05,
**P < 0.01.

Para estudiar si la actividad nocturna de la enzima AA-NAT es inhibida por la luz, nematodos adultos fueron estimulados a ZT18 con luz monocromática azul (450–500 nm), verde (500–570 nm), y roja (610–750 nm). Los nematodos también fueron estimulados a ZT18 con luz blanca proveniente de una fuente comercial. Como se puede observar en la Figura 32, tanto la luz blanca como la luz azul inhibieron significativamente la actividad de la AA-NAT en comparación con el grupo control (DD) ($p<0.05$, *test* de Dunnet para las comparaciones entre grupos).

2.4.2. Identificación de posibles AA-NAT en *Caenorhabditis elegans*

La enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) pertenece a las proteínas de la superfamilia GNAT (GCN5-N-acetyltransferasa) (Vetting, et al. 2005). En vertebrados, la región N-terminal de las AA-NAT posee un sitio conservado de fosforilación (RRHT) para la proteína kinasa A. De esta manera, las AA-NAT fosforiladas son activadas y protegidas de degradación por el proteosoma (Coon y Klein 2006). En *C. elegans* las AA-NAT no han sido caracterizadas, pero se sabe que el genoma de los nematodos codifica para algunas proteínas que poseen un dominio de acetiltransferasa característico de la superfamilia GNAT. Con el fin de encontrar posibles AA-NAT en *C. elegans*, se realizó un estudio bioinformático. En primer lugar, una búsqueda de proteínas

con dominio de acetiltransferasa fue realizada utilizando la base de datos *wormbase*. Los resultados mostraron 20 proteínas con dominio GNAT (base de datos utilizada: PFAM; número de acceso: PF00583). Para identificar potenciales sitios de fosforilación en esas proteínas, las secuencias peptídicas de las mismas fueron escaneadas utilizando la herramienta bioinformática PROSITE. Como se puede observar en la Tabla 4, 9 proteínas con potenciales sitios de fosforilación fueron identificadas. Se estudió además la similitud entre las secuencias de proteínas de *C. elegans* y diferentes AA-NAT de insectos utilizando el programa BlastP. Los resultados mostraron 5 proteínas con homología de secuencia a las AA-NAT de insectos (Tabla 4).

Para estudiar las relaciones evolutivas entre las AA-NAT de diferentes organismos y las posibles AA-NAT de *C. elegans*, se construyeron árboles filogenéticos utilizando el programa MEGA. Los mismos mostraron que las AA- NAT de invertebrados se separan completamente de las otras AA-NAT. Uno de los arboles filogenéticos mostró una de las proteínas de *C. elegans* (CE37201), que posee tanto el dominio GNAT como el sitio de fosforilación a PKA, incluida

CE07700	CE03488
CE05235	CE14442
CE37201	CE18104
CE28316	CE37201
CE28254	CE45862
CE16458	
CE24372	
CE39061	
CE39061	

Tabla 4. Posibles AA-NATs de *C. elegans*. AA-NAT: arilalquilamina N-acetiltransferasa.

Las distancias filogenéticas calculadas entre los diferentes grupos indicaron que la proteína CE37201 está más cerca del clado de los invertebrados (distancia de invertebrados = 1,198; distancia de mamíferos = 2,792; distancia de otros cordados 2,330; y distancia de levaduras = 2,593). Sin embargo, la proteína CE45862, que posee el dominio GNAT pero carece del sitio de fosforilación a PKA, está más cerca del clado de los invertebrados en comparación a la proteína CE37201 (distancia de invertebrados = 1,000; distancia de mamíferos = 1,628; distancia de otros cordados 1,620; y distancia de la levaduras = 1,688). Se estimó además la distancia filogenética intra-grupo, y se encontró que las AA-NAT de invertebrados son muy divergentes entre sí

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(distancia media intra-grupo = 1,219).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

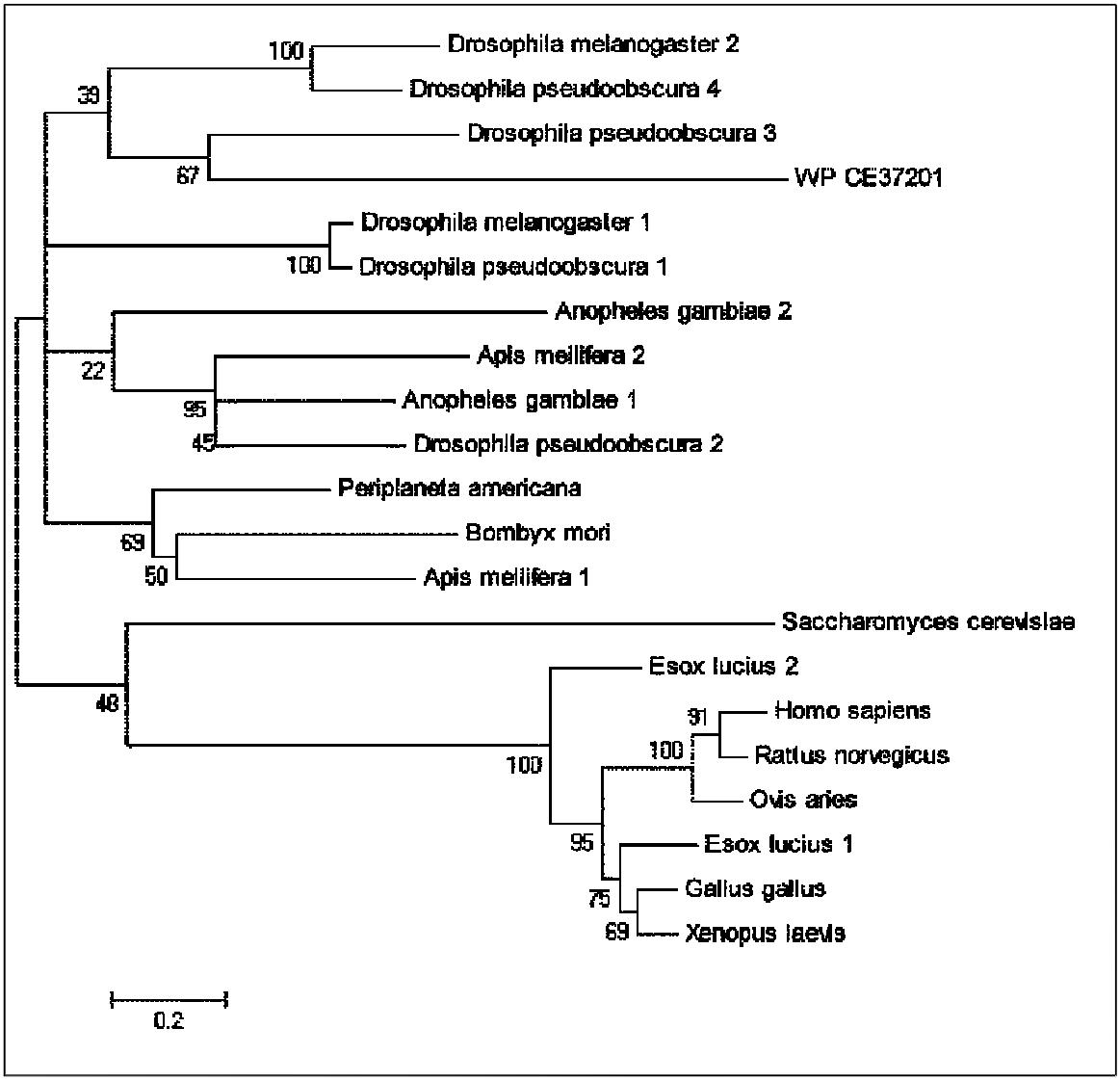


Figura 33. Árbol filogenético de las arilalquilamina N-acetiltransferasas construido utilizando el método de Neighbor-Joining y el modelo de Poisson para la sustitución de aminoácidos. Los números en los puntos de ramificación indican el valor de *bootstrap* (porcentaje) en base a 1.000 repeticiones. La barra de escala indica el número estimado de sustituciones de aminoácidos por sitio. Secuencias y abreviaturas: *Bombyx mori* (número de acceso al *GenBank* = DQ256382); *Periplaneta americana* (número de acceso al *GenBank* = AB106562); *Drosophila melanogaster* iAANAT1 (número de acceso al *GenBank* = Y07964); *Drosophila melanogaster* iAANAT2 (número de acceso al *GenBank* = NM_135161); *Anopheles gambiae* 1 (número de acceso al *GenBank* = EAA05105); *Anopheles gambiae* 2 (número de acceso al *GenBank* = EAA09295); *Apis mellifera* 1 (número de acceso al *GenBank* = XP_392876); *Apis mellifera* 2 (número de acceso al *GenBank* = XP_394768); *Drosophila pseudoobscura* 1 (número de acceso al *GenBank* = EAL25482); *Drosophila pseudoobscura* 2 (número de acceso al *GenBank* = EAL31520); *Drosophila pseudoobscura* 3 (número de acceso al *GenBank* = EAL32377); *Drosophila pseudoobscura* 4 (número de acceso al *GenBank* = EAL32932); *Homo sapiens* (número de acceso al *GenBank* = NM 001088); *Rattus norvegicus* (número de acceso al *GenBank* = U38306); *Ovis aries* (número de acceso al *GenBank* = U29663); *Esox lucius* AANAT1 (número de acceso al *GenBank* = AF034081); *Esox lucius* AANAT2 (número de acceso al *GenBank* = AF034082); *Gallus gallus* (número de acceso al *GenBank* = U46502); *Xenopus laevis* (número de acceso al *GenBank* = AY316296); *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso al *GenBank* = Q12447.1) y WP CE37201, *Caenorhabditis elegans* (número de acceso al *GenBank* =

NM_001083193.2, disponible en http://www.wormbase.org/).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

2.4.3. Discusión

En este capítulo se mostró la existencia de ritmos diarios en la síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Se demostró además el efecto de la luz sobre la actividad de la enzima AA-NAT. Utilizando herramientas bioinformáticas, se identificaron 2 posibles AA-NAT en estos nematodos.

Síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT en *C. elegans*

Debido a que la melatonina se encuentra en una gran variedad de organismos, tales como unicelulares, plantas, hongos y animales, se estudiaron en primer lugar posibles cambios diarios en la síntesis de esta indolamina en *C elegans*. En condiciones de luz/oscuridad los experimentos indicaron una variación diaria en la síntesis de melatonina con un pico a ZT18, y un mínimo valor alrededor de ZT0-6 (Figura 30A). En 2000, Balzer et al. demostraron una variación diaria y circadiana en la síntesis de melatonina en *C. elegans* (Balzer, et al. 2000). Bajo condiciones de LD encontraron un ritmo diario en la síntesis de la indolamina con altos niveles principalmente durante la noche (un pico fue encontrado a ZT18). Sin embargo, los valores absolutos mostrados en ese trabajo son mucho mayores a los mostrados en el presente capitulo. Esto probablemente se debe a que en Balzer et al. encontraron cantidades relativamente altas de melatonina en las bacterias. En este trabajo se utilizó como fuente de alimento la cepa de bacterias *E. coli* NA22, en la cual no se obtuvieron niveles de melatonina significativos. Adicionalmente, Balzer et al mostraron que los ritmos de melatonina se mantienen en condiciones de DD o LL, sin embargo, bajo estas condiciones los ritmos que obtuvieron no fueron consistentes (Balzer, et al. 2000).

La síntesis de melatonina se inicia a partir de la serotonina, que es acetilada y convertida en N-acetilserotonina por la enzima arilalquilamina N- acetiltransferasa (AA-NAT). Finalmente, la N-acetilserotonina es convertida en melatonina por la enzima N-acetilserotonina metiltransferasa (ASMT) (Axelrod y Weissbach 1960). La detección de melatonina en *C. elegans* sugiere que los nematodos podrían poseer las enzimas de síntesis de melatonina AA-NAT y ASMT. Trabajos previos muestran que el gen *Y74C9A.3* codifica para la enzima ASMT de *C. elegans* (Tanaka, et al. 2007). Además, los patrones de expresión del gen *Y74C9A.3* fueron analizados utilizando la proteína reportera GFP. Los resultados mostraron expresión de GFP en la neurona PVT (situada en la región de la cola) y en las células del útero, indicando que la melatonina podría sintetizarse en esas células. En este capítulo se demostró la existencia de una variación rítmica en la actividad de la enzima AA-NAT. El ritmo de AA-NAT se mantuvo bajo condiciones tanto de luz/oscuridad como circadianas (oscuridad constante), sugiriendo que existe una regulación tanto fótica como circadiana de la actividad de esta enzima. Bajo condiciones de LD se halló una variación diaria en la actividad de la enzima (Figura 30B) con un pico a ZT12 (precediendo al pico

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

de melatonina por varias horas, al menos para nuestra frecuencia de muestreo) y un mínimo valor a ZT18-24. Bajo condiciones de oscuridad constante el ritmo diario en la actividad de AA-NAT fue mantenido, con un máximo durante la noche subjetiva (Figura 31).

En mamíferos, los niveles de serotonina en la glándula pineal son altos, tanto durante el día como durante la noche. Sin embargo, los niveles de melatonina y de N-acetilserotonina (NAS) son altos durante la noche y bajos durante el día (Illnerova, et al. 1978). Los cambios observados en los perfiles de síntesis de ambas indolaminas están directamente relacionados con los cambios en la actividad de la AA-NAT, la cual se incrementa de 10 a 100 veces durante la noche (Klein y Weller 1970; Klein, et al. 1997). En vertebrados, el aumento nocturno en los niveles de AMPc (adenosina monofosfato cíclica), vía activación de proteína kinasa A (PKA), es el principal mecanismo que regula la síntesis de la AA-NAT y producción de melatonina. Durante la noche, la señal adrenérgica activa una quinasa dependiente de AMPc (PKA) que fosforila a CREB (por su nombre en inglés *cAMP response element binging protein*). La inducción de CREB fosforilada (pCREB) activa la transcripción de las enzimas involucradas en el metabolismo de la melatonina, particularmente de la AA-NAT (Roseboom y Klein 1995). En *C. elegans*, la serotonina y la NAS, ambas moléculas precursoras de la melatonina, han sido identificadas (Komuniecki, et al. 2004). Además, dos genes (*kin-1* y *F47F2.1b*) que codifican para la enzima PKA fueron descubiertos en esta especie (Bowen, et al. 2006). Por otra parte, varios trabajos muestran que *C. elegans* posee un solo gen (*crh-1*) que codifica para la proteína CREB (Alkema y Horvitz 2001; Kimura, et al. 2002). El gen *crh-1* está manejado por cuatro promotores alternativos que dan lugar a cuatro isoformas diferentes de la proteína CRH-1. Todas las isoformas presentan un dominio de unión a ADN (bZIP) en la región C-terminal, y solo dos isoformas presentan un sitio de fosforilación a PKA. Por lo tanto, es posible pensar que la AA-NAT podría ser un gen controlado por el reloj que participa en la regulación de los ritmos celulares en *C. elegans*. Además de su función en la biosíntesis de NAS/melatonina, las AA-NATs de insectos están involucradas en la inactivación de neurotransmisores aromáticos y esclerotización de la cutícula (Smith 1990). En *Drosophila melanogaster*, los homólogos de la AA-NAT han sido implicados principalmente en la esclerotización de la cutícula (Wittkopp, et al. 2003). Más recientemente, Mehere et al. (2011) encontraron que en el mosquito *Aedes aegypti* tanto la AA-NAT1 como la AA-NAT2 están involucradas en la esclerotización e inactivación de neurotransmisores respectivamente (21645618). Por otra parte, es importante considerar la existencia de otras enzimas N-acetilasas (tal vez con menor homología a las AA-NATs), como por ejemplo homólogos de poliaminas N- acetiltransferasa. En este sentido, resta establecer aún cuál es la función exacta de la AA-NAT en *C. elegans*.

En este trabajo los resultados mostraron una diferencia de fase entre la N- acetilación y la concentración de melatonina, en el cual se observó un pico de actividad de AA-NAT 6 horas antes que la melatonina. Esta diferencia de fase puede deberse a dos motivos. El primero es un problema en la frecuencia de muestreo, ya que las medidas fueron realizadas cada 6 horas. El segundo

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

motivo podría ser que la vida media de la melatonina sea mayor en *C. elegans*, o que la enzima ASMT sea, en estos nematodos, la enzima limitante de la reacción. Por otra parte, aunque los niveles de melatonina disminuyen significativamente a las 48 horas, dicha disminución no se correlacionó con la disminución en la actividad de AA-NAT. Esto también podría deberse a la frecuencia de muestreo, o a que el mecanismo de producción de melatonina sea diferente en *C. elegans*.

Efecto de la luz en la actividad de AA-NAT

En vertebrados, la actividad de AA-NAT es inhibida por la luz, y correlaciona con el ritmo diario observado en la producción de melatonina (Klein y Weller 1970; Axelrod 1974). Es por eso que en este trabajo se estudió el efecto de la luz sobre la actividad de AA-NAT en *C. elegans*. Para ello, los nematodos fueron estimulados con luz monocromática a CT18 (400 lux, 2 horas). Como se puede observar en la Figura 32, tanto la luz blanca como la luz azul inhibieron significativamente la actividad de la AA-NAT en comparación con el grupo control (DD). Trabajos previos muestran que *C. elegans* puede sensar la luz ultravioleta (Edwards, et al. 2008), y que además poseen una respuesta fototáxica negativa cuando son estimulados con una serie de luz monocromática (Ward, et al. 2008). Más aún, un grupo de células fotorreceptoras fueron identificadas en estos nematodos, algunas de las cuales responden a la luz por apertura de canales CNG (del inglés, *cyclic nucleotide gated*) sensibles a GMPc (Guanosina monofosfato cíclica) (Ward, et al. 2008). En particular, datos recientes muestran una cascada de fototransducción involucrando la participación de *taste receptor* (Liu, et al. 2010). Sin embargo, resta establecer aún cuáles son los mecanismos moleculares que están involucrados en la generación de los ritmos de síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT.

Análisis bioinformático

La enzima AA-NAT pertenece a las proteínas de la superfamilia GNAT (GCN5-N-acetyltransferasa) (Vetting, et al. 2005). En vertebrados, las AA-NAT poseen tanto el dominio GNAT como un sitio conservado de fosforilación para la proteína kinasa A (PKA) (Coon y Klein 2006). En este trabajo se buscaron proteínas de *C. elegans* que posean tanto el dominio GNAT como el sitio de fosforilación a PKA. Los resultados se muestran en la Tabla 4, en la cual se observan 9 posibles AA- NAT de *C. elegans*. Además, utilizando el programa BlastP se identificaron 5 proteínas con homología de secuencia a las AA-NAT de insectos (Tabla 4). Por otra parte, un análisis filogenético mostro una de las proteínas de *C. elegans* (CE37201) incluida dentro del grupo de las AA-NATs de insectos (Figura 32). Las distancias filogenéticas calculadas entre los diferentes grupos indicaron

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

que la proteína CE37201 está más cerca del clado de los invertebrados. Sin embargo, la proteína CE45862, que posee el dominio GNAT pero carece del sitio de fosforilación a PKA, está más cerca del clado de los invertebrados en comparación a la proteína CE37201. Por lo tanto, la función exacta de estas proteínas aún debe ser determinada.

Conclusiones

Se ha demostrado que la enzima AA-NAT posee alta selectividad por arilalquilaminas (como por ejemplo serotonina y triptamina), y feniletilaminas (como por ejemplo dopamina). En levaduras, los homólogos de AA-NAT acetilan esos sustratos con una baja eficiencia (Ganguly, et al. 2001b). Sin embargo, otros estudios mostraron que los homólogos de AA-NAT en levaduras también acetilan poliaminas (como por ejemplo putrescina, espermidina y espermina), pudiendo ser esta la función principal en estos organismos (Liu, et al. 2005). En este sentido, quizás otras enzimas N-acetelitransferasas, homologas de poliaminas N-acetiltransferasas de otros invertebrados, estén involucradas en la síntesis de melatonina en *C. elegans*.

La melatonina se encuentra en la mayoría de los organismos estudiados hasta el momento, y su mecanismo de acción se encuentra muy conservado filogenéticamente. En vertebrados y otros organismos, tales como unicelulares, plantas superiores e invertebrados de diferentes taxas, esta indolamina actúa como un secuestrador de radicales libres y un potente agente antioxidante (Hardeland, et al. 1993; Burkhardt, et al. 2001; Reiter, et al. 2001; Hardeland y Poeggeler 2003; Kolar y Machackova 2005; Kang, et al. 2010; Murch, et al. 2010; Boccalandro, et al. 2011). Resultados de nuestro laboratorio muestran que los nematodos son más resistentes al estrés oxidativo durante la noche (Simonetta, et al. 2008). Ese patrón temporal de resistencia correlaciona con los ritmos de síntesis de melatonina encontrados en este trabajo, sugiriendo un rol de esta indolamina en los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo en *C. elegans*. En el medio ambiente, muchos factores que causan estrés varían a lo largo del día y por lo tanto es lógico pensar que los organismos sean capaces de predecir esos cambios periódicos en la naturaleza para poder sobrevivir.

Por otra parte, en el sistema circadiano de los mamíferos, la melatonina actúa como una hormona neuroendocrina que transduce las señales del medio ambiente. De esta manera, la melatonina es considerada un factor importante en el circuito neuroendocrino entre la retina, los núcleos supraquiasmáticos y la glándula pineal (Moore 1996). En mamíferos se encuentran actualmente identificados dos tipos de receptores de membrana: MT1 y MT2; y algunos otros sitios de unión con función poco conocida (Reppert, et al. 1994; Reppert, et al. 1995a; Nosjean, et al. 2000). Trabajos previos muestran que el agregado de melatonina exógena en las placas de cultivo reduce la locomoción de *C. elegans* a través de receptores tipo MT1 (Tanaka, et al. 2007). Además, estos autores encontraron que los nematodos poseen melatonina la cual posiblemente pueda ser

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

usada como un neuromodulador en estos animales. Así, *C. elegans* podría optimizar su adaptación a los cambios del medio ambiente a través de la melatonina, regulando su actividad locomotora así como también otras actividades cíclicas del cuerpo.

En resumen, se demostró en *C. elegans* una variación diaria en la síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT. Se determinó además que tanto la luz blanca como la luz azul inhiben significativamente la actividad de la AA-NAT en comparación con el grupo control (DD). Utilizando herramientas bioinformáticas, se identificaron 2 posibles AA-NAT en estos nematodos. Resta determinar aun cuáles son los mecanismos moleculares que están involucrados en la generación de los ritmos de síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

CAPÍTULO 3

CARACTERIZACIÓN DE LOS RITMOS DE ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN *CAENORHABDITIS ELEGANS*

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos

Como se mencionó en la introducción general, las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos son:

(1) los ritmos circadianos son endógenos, es decir la capacidad de un organismo determinado de generar ritmos en ausencia de cambios externos,

(2) los ritmos circadianos se sincronizan por ciclos medioambientales de período T, siendo el más importante el ciclo de luz/oscuridad, y

(3) el período endógeno (τ) es diferente en distintas especies y es independiente de la temperatura, es decir que compensa sus variaciones ($Q_{10} \approx 1$) (Pittendrigh 1960).

La función principal del reloj circadiano es lograr que cada proceso del organismo se lleve a cabo en una fase determinada del ciclo ambiental diario, favoreciendo así la adaptación con el medio ambiente.

La tercera propiedad de los ritmos circadianos implica que el reloj biológico mantiene un periodo muy similar cuando se mide a diferentes temperaturas ambientales. Generalmente las reacciones bioquímicas varían su velocidad de reacción de 2 a 3 veces si se aumenta la temperatura unos 100C. De esta forma, la variable $Q10 \approx 1$ si un proceso es independiente de la temperatura. Los ritmos circadianos presentan un Q10 de 0,8 a 1,4; es decir que están fuertemente compensados con respecto a estos cambios.

3.1.1.a. Carácter endógeno de los ritmos circadianos

Los ritmos biológicos son endógenos, es decir, se manifiestan aun en ausencia de señales ambientales (Dunlap, et al. 2003). Se han realizado numerosos experimentos para demostrar el carácter endógeno de los ritmos. En estos experimentos, el animal es apartado de su ambiente natural y es colocado bajo condiciones constantes de laboratorio. Bajo estas condiciones se

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

observa que los animales siguen presentando ritmos circadianos en su conducta y fisiología. En ausencia de cambios ambientales definidos, es decir en condiciones constantes, se dice que el organismo está en libre curso o *free running*.

El ritmo en libre curso es fácilmente observable en condiciones de laboratorio. En condiciones de luz/oscuridad, el animal está sincronizado y su actividad comienza siempre a la misma hora y, por lo tanto, su período es de 24 horas (Figura 34). En condiciones constantes, sin embargo, el período endógeno de los animales puede variar.

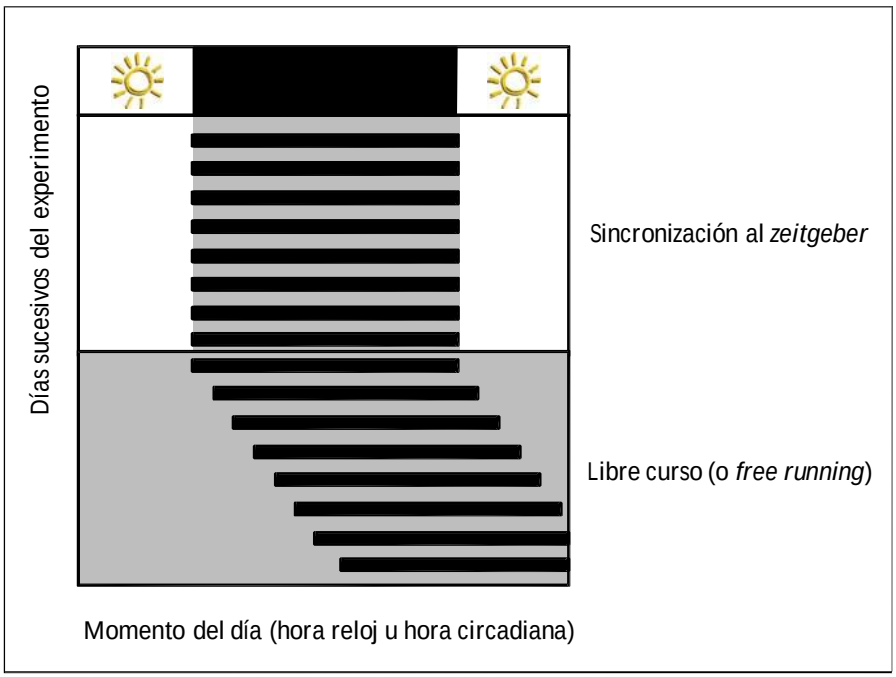


Figura 34. Dibujo esquemático del registro de la actividad locomotora de un animal nocturno en condiciones de laboratorio. Bajo condiciones de sincronización los ritmos circadianos ajustan su periodo endógeno (τ) al del *Zeitgeber* (T). En la figura, el actograma representa un ritmo de actividad locomotora inicialmente sincronizado a un ciclo de luz/oscuridad de 24 horas. Bajo condiciones de oscuridad constante, el ritmo entra en libre curso con su periodo endógeno. Las barras negras representan la actividad locomotora diaria.

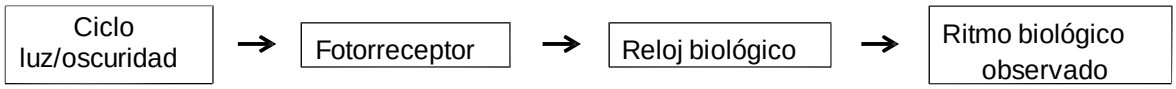
En ausencia de un ciclo de luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comienzan a estar activos cada día un poco más tarde (Figura 34), o un poco más temprano, dependiendo de la especie en estudio. En condiciones constantes, el animal mantiene sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico. En el ejemplo de la Figura 34, el periodo endógeno del ritmo del animal no es de 24 horas sino de un valor algo mayor. El periodo del ritmo en libre curso se denomina *tau* (τ).

3.1.1.b. Sincronización

La presencia de un reloj biológico hace que la expresión de un ritmo se lleve a cabo aun en

ausencia de señales ambientales, en una situación de libre curso. En la naturaleza existen diferentes ciclos ambientales, como por ejemplo el ciclo luz/oscuridad, calor/frío, seco/húmedo, ciclos de actividad social, etc. El ciclo ambiental más poderoso, tanto para los animales como para las plantas, es el ciclo de luz/oscuridad (Aschoff, et al. 1975), y parece haber sido el factor ambiental más importante para la selección de los ritmos circadianos (24 horas). Además, existen ciclos diferentes de 24 horas, como por ejemplo los ciclos de mareas (12,4 horas), de día lunar (24,8 horas) y de mes lunar (29,53 días). Estos ciclos representan la presión de selección de ritmos observados en animales que viven en ambientes entre mares. En todos los casos, el período endógeno (τ) se aproxima al periodo de un ciclo ambiental determinado (T).

En presencia de señales externas (*Zeitgeber)*, el reloj biológico tiene su período y fase ajustados al ciclo ambiental, en un proceso denominado sincronización (Pittendrigh 1960), en el cual el *Zeitgeber* actúa como sincronizador (Figura 34). La sincronización asegura la conexión entre el reloj biológico y los ciclos ambientales. Como se mencionó antes, la luz es el principal agente sincronizador en mamíferos. La misma es percibida y ejerce su acción sobre el reloj biológico de la siguiente manera:



En mamíferos el fotorreceptor circadiano principal es la melanopsina. Este fotorreceptor pertenece a la familia de las opsinas y está localizado en un grupo de células ganglionares en la retina del ojo. Tanto las células ganglionares que expresan melanopsina como los fotorreceptores tradicionales (conos y bastones) participan en la sincronización fótica (Berson, et al. 2002; Hattar, et al. 2003; Panda, et al. 2003; Doyle, et al. 2006; Nayak, et al. 2007).

En la naturaleza existen diferentes factores que pueden variar en forma rítmica, y como consecuencia actuar como *Zeitgebers* (como por ejemplo, la temperatura, acceso a la comida, humedad, factores sociales, etc.). Sin embargo, cada uno de estos factores pueden tener diferente capacidad de sincronizar el reloj biológico, y además, cada organismo puede presentar diferente sensibilidad a cada uno de ellos. Experimentos realizados con *Drosophila melanogaster* demostraron que ciclos de temperatura inducen sincronización de los ritmos comportamentales y oscilación de las proteínas reloj Period y Timeless, en moscas crecidas en luz constante (Glaser y Stanewsky 2005, 2007). Las señales sociales también actúan como *Zeitgebers* en determinadas especies. Recientemente se reportó que señales sociales sincronizan los ritmos de actividad locomotora en *D. melanogaster* (Lone y Sharma 2011).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.1.2. Enmascaramiento

Existe la posibilidad de que bajo determinadas condiciones el *Zeitgeber* no sincronice al reloj sino que afecte directamente a la salida del mismo, fenómeno conocido como enmascaramiento (o *masking*). Una manera de poder diferenciar ambos procesos es observar el ritmo una vez eliminado el agente externo cíclico. La sincronización implica un control de fase del ritmo externo sobre el endógeno, mientras que el enmascaramiento implica reactividad al agente externo. Así, en el caso de la sincronización, si se retira el *Zeitgeber*, la fase del ritmo en libre curso prácticamente no varía de la fase que poseía bajo el ciclo externo; mientras que en el caso de enmascaramiento (Figura 35), si se elimina el *Zeitgeber*, el ritmo en libre curso empieza en una fase que no es predecible por la exposición del estimulo periódico (Madrid y Rol de Lama 2006b).

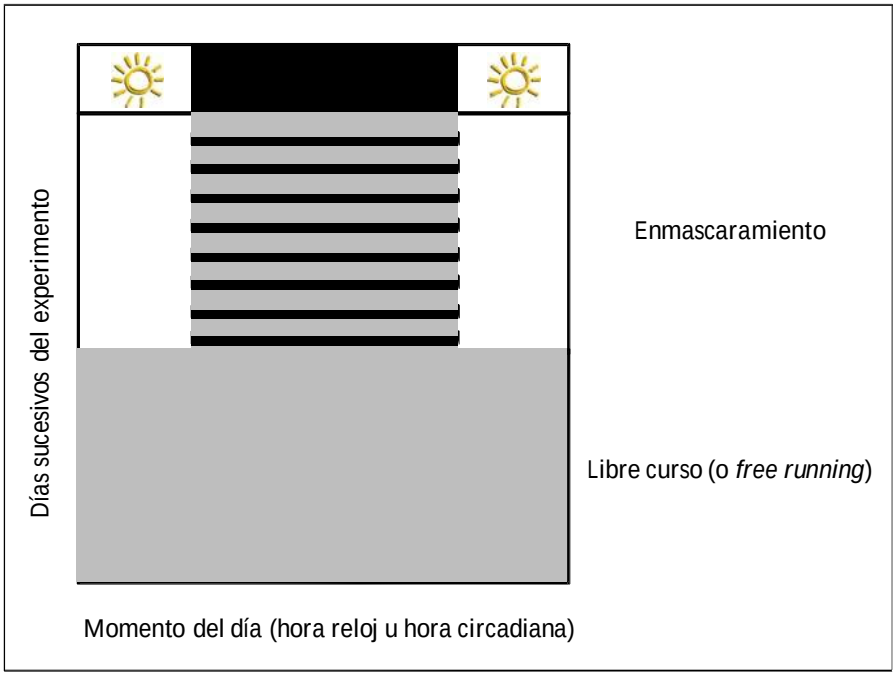


Figura 35. Enmascaramiento. Dibujo esquemático del registro de la actividad locomotora de un animal nocturno en condiciones de laboratorio. En la figura, el actograma representa un ritmo de actividad locomotora enmascarado por la luz. Se observa el efecto del enmascaramiento de la luz, ya que el ritmo en libre curso empieza en una fase que no es predecible por la exposición al estimulo periódico.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

A través del enmascaramiento, los animales poseen la capacidad de responder directamente a las señales del ambiente. El enmascaramiento complementa al control del reloj biológico como una forma de ayudar a los animales a especializarse ya sea en un ambiente nocturno o diurno (Aschoff 1988).

Es importante señalar que en la mayoría de las especies tanto el proceso de sincronización como el de enmascaramiento implican un proceso de fotorrecepción, dado que el estímulo principal (o, al menos, el que mayor atención ha recibido) es lumínico. De esta manera, se vuelve relevante estudiar las vías de fotorrecepción en relación a los sistemas circadianos. A continuación analizaremos la presencia de tales vías en nuestro modelo de estudio.

3.1.3. Fotorrecepción en *Caenorhabditis elegans*

Hoy en día se sabe que la mayoría de los animales poseen la capacidad de transducir la luz en una señal celular, siendo esa habilidad importante para la sobrevivencia de los mismos. En la mayoría de los organismos, la luz es percibida por un grupo de células fotorreceptoras ubicadas en la retina, las cuales participan en la formación de las imágenes (Fu y Yau 2007; Wang y Montell 2007). Las células fotorreceptoras mejor caracterizadas son los conos y bastones de vertebrados, un grupo de neuronas sensoriales ciliadas situadas en la retina. En este tipo de células la luz es detectada a través de receptores de rodopsina pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (Fu y Yau 2007). Estas células transducen la señal de la luz en una respuesta eléctrica por apertura y cierre de canales CNG (del inglés, *cyclic nucleotide- gated*), usando cGMP como segundo mensajero. En *Drosophila melanogaster*, las células fotorreceptoras emplean canales TRP (del inglés, *transient receptor potential*), y aun no ha sido identificado el segundo mensajero involucrado en la fototransducción (Wang y Montell 2007). También existen otro grupo de células fotorreceptoras que median funciones tales como la fototaxis y los ritmos circadianos (Berson 2007; Sand, et al. 2012).

Caenorhabditis elegans es un gusano nematodo que vive en el suelo y carece de los órganos especializados sensibles a la luz. A pesar de ello, existen datos muy recientes que indican que los gusanos son capaces de responder a la luz. Trabajos de Ward y colaboradores (2008) demostraron que un estímulo lumínico genera una respuesta fototáxica negativa en los nematodos. Un grupo de neuronas sensoriales ciliadas fueron identificadas como posibles células receptoras capaces de mediar la fototaxis en estos animales (ASJ, AWB y ASK). Estas células transducen la luz en una respuesta eléctrica mediada por canales CNG, usando cGMP como segundo mensajero. Por otro lado, *C. elegans* acelera fuertemente su locomoción en respuesta a la luz de longitud de onda corta, obteniéndose una máxima respuesta a la luz ultravioleta (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008). Esa respuesta a la luz es mediada por la proteína Lite-1, un receptor de luz ultravioleta que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

actúa en neuronas y pertenece a la familia de receptores gustativos (Gr) de invertebrados. Más recientemente, Liu et al. (2010) demostraron una posible cascada de fototransducción en *C. elegans*, utilizando una combinación de técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y genéticas; los investigadores demostraron que la fototransducción en la célula fotorreceptora ASJ requiere de proteína G dependiente de cGMP y la proteína Lite-1 (Figura 36).

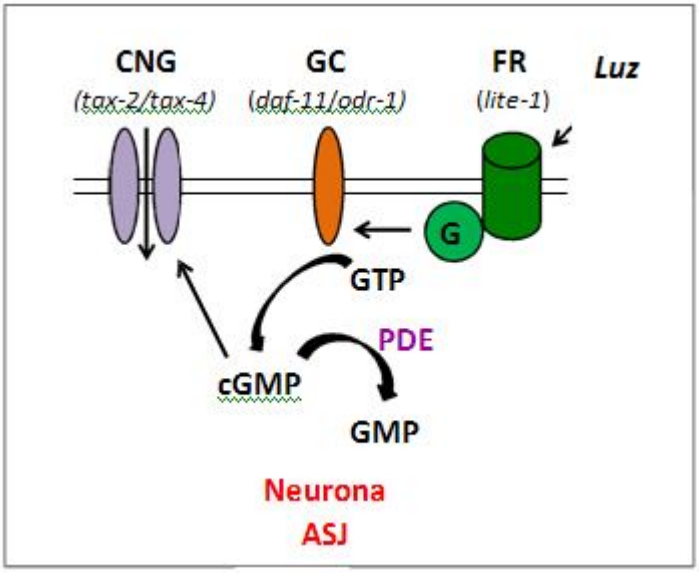


Figura 36. Modelo de la cascada de fototransducción en *C. elegans*. En este modelo se propone que en la neurona ASJ de *C. elegans*, receptores acoplados a proteína G (GOA-1 y GPA-3) podrían activar la enzima GC (DAF-11 Y ODR-1) conduciendo a un aumento en los niveles de cGMP, y posteriormente a la apertura de canales CNG (TAX-2 Y TAX-4). Otras posibles células fotorreceptoras de *C. elegans*, aun no identificadas, podrían emplear diferente conjunto de genes de señalización e incluso adoptar mecanismos de fototransducción diferentes. Abreviaturas: CNG = del inglés *cyclic nucleotide-gated*, GC = guanilato ciclasa, FR = fotorreceptor, G = proteína G, GTP = guanosina trifosfato, cGMP = guanosina monofosfato cíclica, PDE = fosfodiesterasa. Modificado de Liu et al., 2010.

3.1.4. Termotaxis en *Caenorhabditis elegans*

Como se mencionó antes, la temperatura es un factor medioambiental que puede actuar como *Zeitgeber* en un gran número de especies. De esta manera, es importante conocer en nuestro modelo de estudio que neuronas, y mecanismos de transducción de señales, están involucrados en la respuesta a la temperatura.

Trabajos de Hedgecock y Russell (1975) demostraron por primera vez el fenómeno de termotaxis en *C. elegans*. Cuando los nematodos son cultivados en presencia de abundante comida y a una dada temperatura, y posteriormente son colocados en una placa sin comida y con un gradiente de temperatura, ellos migran y se mueven isotérmicamente a la temperatura a la

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cual fueroncultivados. Además, los investigadores hallaron un grupo de fenotipos mutantes los cuales carecen de la capacidad de moverse isotérmicamente a la temperatura de cultivo, clasificándolos en:

(1) termofílicos (movimiento de los nematodos hacia regiones cálidas de la placa de cultivo),

(2) criofílicos (movimiento de los nematodos hacia regiones frías de la placa de cultivo), y

(3) atácticos (movimiento de los nematodos hacia cualquier región de la placa de cultivo).

Es interesante destacar que una sola neurona sensorial, la AFD, está involucrada en la detección de temperatura y el normal comportamiento termotaxico en *C. elegans*. La AFD es una de las 12 neuronas que forman parte de uno de los pares bilateralmente simétricos de los órganos sensoriales de los nematodos, denominado *amphid sensilla*, localizado cerca de la punta de la nariz. La necesidad termosensorial de la neurona AFD fue determinada mediante experimentos de ablación neuronal por láser (Mori y Ohshima 1995). Así, al quemar la neurona AFD se observó que los nematodos fueron incapaces de moverseisotérmicamente a la temperatura de cultivo, mostrando una preferencia por las temperaturas frías (respuesta criofilica). Mediante microscopia electrónica se determino que la interneurona AIY es la primer neurona post sináptica de la AFD. La AIY también hace sinapsis con la interneurona AIZ y con la principal neurona integrativa RIA, la cual también recibe la entrada sináptica de la AIZ (White JG 1986). Además, se observaron fenotipos termofílicos por lesión de la neurona AIZ, fenotipos criofílicos por lesión de las neuronas AFD y/o AIY, y fenotipos atácticos por lesión de la neurona RIA o múltiples neuronas (Mori y Ohshima 1995). Un modelo neural para el circuito que controla la termotaxis en *C. elegans* se puede observar en la Figura 37. La activación de la interneurona AIY por la neurona sensorial AFD impulsa a los animales a moverse hacia temperaturas más cálidas, en relación a la temperatura a la cual fueron cultivados, mientras la activación de la interneurona AIZ impulsa a los animales a buscar temperaturas más frías.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

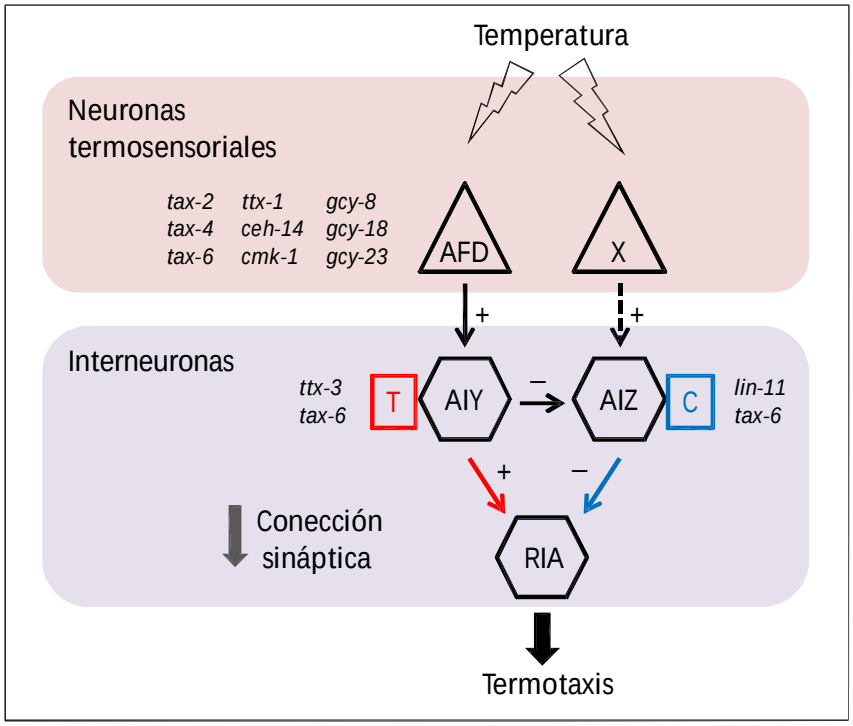


Figura 37. Modelo del circuito termosensorial en *C. elegans*. La activación de la neurona AFD por la temperatura estimula la interneurona AIY, la cual activa a la interneurona RIA. Una neurona termosensorial (X) aun no identificada activa la neurona AIZ, que a su vez inhibe la neurona RIA. La actividad de AIZ es reducida por la actividad de AIY. En la figura se muestran los genes que actualmente se sabe que participan en la termotaxis.

Algunos mutantes de termotaxis han sido aislados y caracterizados. Mutantes para los genes *tax-2* y *tax-4* mostraron un fenotipo atérmico. *tax-2 y tax-4* codifican para la subunidad α y β, respectivamente, de canales CNG (del inglés, *cyclic nucleotide-gated*), los cuales se expresan en varias neuronas sensoriales incluyendo la neurona termosensorial AFD (Coburn y Bargmann 1996; Komatsu, et al. 1996). Tax-2/Tax-4 CNG muestra mayor afinidad por cGMP que por cAMP, sugiriendo que cGMP podría actuar como segundo mensajero en la transducción de señales termosensorial (Komatsu, et al. 1999). Kimura et al. (2004) demostraron que el calentamiento de los gusanos por encima de la temperatura de cultivo aumenta los niveles de calcio intracelular en la neurona AFD, esa respuesta está ausente en los mutantes nulos para *tax-4* (Kimura, et al. 2004). Así, parte del mecanismo de señalización en la neurona termosensorial AFD estaría mediado por el aumento de cGMP intracelular, el cual promueve las fluctuaciones en las concentraciones de Ca+2 citosólico.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Mediante experimentos de genética reversa se identificaron tres genes (*gcy-8*, *gcy-18* y *gcy-23*) relevantes para la termotaxis (Inada, et al. 2006). Las proteínas codificadas por estos genes pertenecen a la superfamilia de las guanilato ciclasas, y se expresan únicamente en la neurona AFD. Aún no está claro cómo la proteína guanilato ciclasa se activa en respuesta a la temperatura. Actualmente existen dos posibles explicaciones: (1) que la activación de la guanilato ciclasa requiera de un receptor sensible a la temperatura acoplado a proteína G, rio arriba de la enzima, o (2) que la guanilato ciclasa actúe por si sola como un sensor de temperatura (Figura 38).

Además, el estudio en cepas mutantes demostró la participación de diversos genes que están implicados en la regulación de la termotaxis (Hedgecock y Russell 1975; Mori y Ohshima 1995; Hobert, et al. 1997; Cassata, et al. 2000; Satterlee, et al. 2001). Gran parte de estos genes están involucrados en procesos tales como la determinación del destino celular, la expresión de genes y la regulación de la vía de transducción de señales mencionada anteriormente.

Dado que la termotaxis es un importante mecanismo sensorial que *C. elegans* utiliza para interactuar con el ambiente, en el presente capítulo estudiaremos si la temperatura es capaz de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en los nematodos.

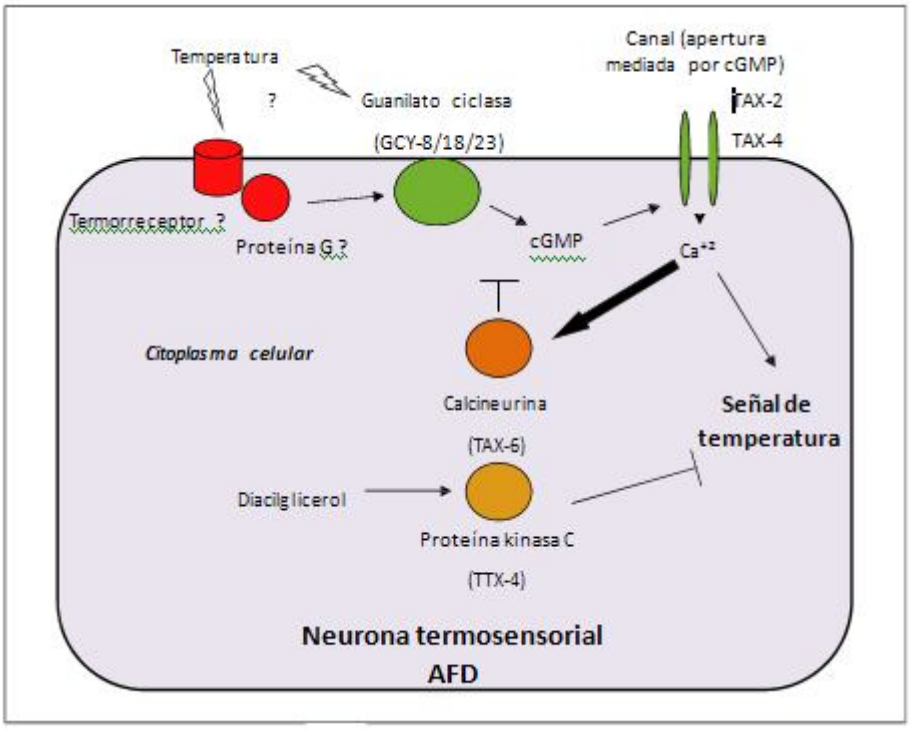


Figura 38. Modelo del mecanismo de señalización en la neurona termosensorial en *C. elegans*.

3.1.5. Proteínas de *Caenorhabditis elegans* homólogas a proteínas reloj

Como se mencionó en la introducción general, la base molecular de todos los relojes circadianos consiste en una serie de mecanismos de retroalimentación negativa entre componentes genéticos específicos. Estos componentes genéticos (denominados "genes reloj") y sus productos proteicos, generan un patrón de oscilación mediante su expresión cíclica.

El genoma de *C. elegans* codifica para ciertos genes cuyas secuencias tienen diverso grado de homología con genes reloj de insectos (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011). Gran parte de estos genes están involucrados en procesos relacionados con el desarrollo de los nematodos (Tabla 3). El homólogo de la proteína circadiana Per, denominado Lin-42, se expresa durante los cambios de cutícula de los nematodos con una ritmicidad de 6 horas (Jeon, et al. 1999), mayoritariamente en las células hipodermales. El gen *lin-42* codifica para tres proteínas que contienen dominios PAS, y una isoforma extra que carece del mismo (Tennessen, et al. 2006).

En *D. melanogaster* el heterodímero formado por las proteínas TIM y PER actúa como elementos negativos del reloj. En *C. elegans* existe un homólogo del gen *timeless* -que posee un patrón de expresión similar a la proteína Lin-42- pero el mismo está involucrado en la regulación de la cohesión cromosomal (Chan, et al. 2003; Banerjee, et al. 2005). Una observación interesante que vale la pena mencionar es que, mientras el ARNm de *lin-42* cicla durante el desarrollo, los niveles del ARNm de *tim-1* aumentan gradualmente, llegando a ser máximos durante el estadio adulto de los nematodos (Jeon, et al. 1999). Esta característica es similar a lo que ocurre en mamíferos, en los cuales los niveles del ARNm de *tim* no muestran oscilaciones con el tiempo (Zylka, et al. 1998). Algunos otros ejemplos de genes de *C. elegans* homólogos a genes reloj de *D. melanogaster* son *kin-20* (*doubletime*), *sma-9* (*clock*), *aha-1* (*cycle*) y *atf-2* (*vrille*) (Tabla 5).

GENES DE *D. melanogaster*	GENES DE *C. elegans*	FUNCIÓN EN EL DESARROLLO DE *C. elegans*	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
Period	*lin-42*	+	(Jeon, et al. 1999)
Timeless/takeout	*tim-1*	+	(Chan, et al. 2003)
Cycle-clock-clockword orange	*aha-1*	+	(Huang, et al. 2004)

Par domain protein 1 ε	*ces-2*	+	(Liu y Hengartner 1999; Hatzold y Conradt 2008)
Vrille	*atf-2*	+	(Hasegawa, et al. 2005)
Doubletime	*kin-20/kin-19*	+	(Banerjee, et al. 2005; Timpano 2009)
Shaggy	*gsk-3*	+	
Casein kinasa 2	*kin-3 + kin-10*	+	
PK1	*gsp-1/gsp-2*	+	

GENES DE *D. melanogaster*	**GENES DE *C. elegans***	**FUNCIÓN EN EL DESARROLLO DE *C. elegans***	**REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**
PK 2a	*sur-6*	+	
Pdf	*pdf-1/pdf-2*	+	(Janssen, et al. 2008; Janssen, et al. 2009)

Tabla 5. Proteínas reloj de *Drosophila melanogaster* y sus contrapartes en *Caenorhabditis elegans*.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.2. OBJETIVOS

Objetivos del presente capítulo

1- Estudiar la sincronización del reloj circadiano de *C. elegans* por la luz.

2- Estudiar la sincronización del reloj circadiano de *C. elegans* por ciclos de temperatura.

3- Determinar si los ritmos en *C. elegans* se mantienen en condiciones de oscuridad constante.

4- Determinar si los ritmos en *C. elegans* compensan los cambios en la temperatura ambiental.

5- Estudiar la capacidad de sincronización a ciclos LD y de temperatura en mutantes circadianos y de fotorrecepción.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Métodos generales y cepas a utilizar

Se utilizaron animales de la especie *Caenorhabditis elegans*, cepas N2 (*wild tipe*), MT2257 (*lin-42(n1089)*), KG1180 (*lite-1(ce314)*) y PR691 (*tax-2(p691)*). Las mismas fueron provistas por el *Caenorhabditis Genetics Center, University of Minesotta, MN, USA*. Las cepas MG152 (*lin-42(mg152)*) y VELS26 (lin-42: gfp) fueron provistas por Ann Rougvie (University of Minnesota).

Los nematodos se mantuvieron en placas de *petri* con medio NGM (NaCl 0,3%, Peptona 0,25%, Colesterol 5 µg/ml, $CaCl_2$ 1 mmol/l, $MgSO_4$ 1 mmol/l, Agar 1.7% en *buffer* fosfato de potasio 25 mmol/l a pH 6,0), sembradas con una monocapa de *Escherichia coli* cepa OP50; bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (llamado LD, por *light-dark* 12:12), con el encendido de las luces a las 9:00 AM (definido como *zeitgeber time* 0 o ZT0). Las condiciones de temperatura fueron constantes (16°C).

Para la realización de los experimentos, poblaciones de gusanos se sincronizaron al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Los huevos obtenidos de la sincronización se cultivaron durante toda la noche en 3,5 ml de *buffer* M9 (Na_2HPO4 42 mM, KH_2PO4 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO4 1 mM) + antibiótico antimicótico 1x (Gibco, USA) en rlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y a 18,5°C, bajo un fotoperiodo de LD 12:12. Al día siguiente las larvas L1 se transfirieron a placas de *petri* con medio NGM, previamente sembradas con *E. coli* cepa OP50. Cuando los nematodos llegaron al estadío de larva L4, se transfirieron a placas de 96 pocillos (aproximadamente 5 gusanos por pocillo) conteniendo 40 µl de medio L15 (Gibco, USA) suplementado con Antibiótico anti micótico 1,5x (Gibco, USA) + 5- fluorodeoxyuridina (FUDR) 40 µM + colesterol 5 mg/ml + leche 2%. Las placas fueron cubiertas con cinta adhesiva para evitar la evaporación del medio.

En los casos en los que hubo que trabajar con los animales en oscuridad, se utilizó una fuente de luz roja de intensidad menor a 1 lux. Este tipo de luz no posee efectos sobre la sincronización de *C. elegans* (Simonetta, et al. 2009).

Todas las drogas utilizadas se compraron en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

3.3.2. Registro de la actividad locomotora

El registro de la actividad locomotora de los nematodos se llevó a cabo mediante un sistema original desarrollado en nuestro laboratorio (Simonetta y Golombek 2007). El mismo consiste en el registro de la interrupción de microhaces de luz infrarroja, captados por un sensor cuya señal es convenientemente acondicionada y grabada en una computadora. Cuando los nematodos se mueven a través del haz de luz infrarroja, se genera una fluctuación transitoria de la señal que

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

es detectada por el fototransistor. La señal, tanto sea de organismos individuales o de una población, es filtrada y analizada mediante periodogramas y análisis circular de Rayleigh para determinar la fase.

3.3.3. Adquisición y análisis de los datos

Los datos del sistema de registro fueron adquiridos a intervalos de 1 minuto y agrupados de a 30 minutos para su procesamiento. La tendencia (*trend*) de los datos crudos fue removida y normalizada mediante la división de cada punto de datos por el punto correspondiente de una línea de tendencia, calculada mediante un filtro Butterworth pasa-bajos con ventana de 72 horas (Levine, et al. 2002b). El filtro de Butterworth, similar a un filtro pasa-bajos/altos con media móvil, es ampliamente utilizado en el análisis de datos ruidosos (por ejemplo, el canto de cortejo de las moscas, o el análisis de la actividad locomotora de las moscas con el objetivo de eliminar los componentes de alta frecuencia y evitar posibles artefactos en la detección de picos) (Wright 1997; Levine, et al. 2002b). Las frecuencias altas fueron removidas mediante un filtro de ventana móvil de 4 horas (*Moving Average Window*). Los animales con nivel de actividad muy bajo (<20% del promedio de actividad poblacional) fueron descartados.

Para los experimentos de sincronización, los datos filtrados fueron analizados mediante análisis de Cosinor (utilizando el programa *Els Temps*). Dicho análisis se basa en el mejor ajuste de una función cosenoidal -de periodo 24 horas- a cada día de la serie temporal, y otorga como información los valores promedios de amplitud, acrofase (fase del valor máximo de actividad) y significancia estadística del ajuste. Para el análisis de los datos y la construcción de los actogramas se utilizaron animales que mostraron un ritmo estadísticamente significativo. La acrofase de cada grupo de 7-8 gusanos fue utilizada para la construcción de los histogramas.

El análisis estadístico de los datos fue realizado mediante estadística circular (test de Rayleigh) (Levine, et al. 2002a). Para llevar a cabo la prueba estadística, los datos correspondientes a cada grupo de 7-8 gusanos fueron analizados mediante Cosinor, y la acrofase promedio fue utilizada para dicho análisis. El umbral de significancia establecido fue para $p = 0,05$.

Los gráficos de actividad promedio (*average activity plots*) fueron construidos con 3 días de actividad locomotora, utilizando la actividad sin tendencia y relativizada al promedio diario (basado en el algoritmo de análisis de ritmos en *Drosophila melanogaster* "IandA Excel macro suite").

Para comparar la fase de los ritmos sujetos a entrenamiento (luz o temperatura) *versus* condiciones constantes, se realizaron diagramas de transición de fase (*phase transition* (PTC) *plots*) (Pittendrigh 1981). Los mismos se construyeron utilizando el valor de acrofase (del análisis por cosinor) para los 3 últimos días de la fase de sincronización *vs*. los 3 primeros días en condiciones constantes post-sincronización.

Para los experimentos de condiciones constantes (DD), los datos filtrados fueron graficados

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

(XY plot: actividad *vs*. tiempo) y clasificados manualmente teniendo en cuenta la amplitud de su ritmicidad (el análisis se limitó a los nematodos que presentaron una actividad mayor a 1.5 veces el valor medio entre el valle y pico de los ritmos) y la estabilidad de su ritmo. Los registros preseleccionados fueron analizados mediante periodogramas Lomb Scargle (utilizando el programa *Els Temps*) y análisis visual. Cuando se encontraron diferencias importantes entre los análisis, se descartó al individuo del análisis global. Los histogramas fueron ajustados a una curva Gaussiana utilizando el programa Sigmaplot. La mediana y la varianza de la distribución del período fueron analizadas utilizando un *T-test* para muestras con varianzas desiguales y prueba F, respectivamente.

Todos los datos fueron expresados como el valor medio ± SEM.

3.3.4. Experimentos de sincronización

Para los experimentos de sincronización por luz, los nematodos (contenidos en las placas de 96 pocillos) fueron expuestos a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LD 12:12 horas) por al menos 14 días. La iluminación consistió en una lámpara fluorescente compacta integrada (Philips Essential PLE15W230). Las condiciones de temperatura fueron constantes (17,5°C). La estabilidad de la temperatura de la incubadora fue chequeada utilizando un sensor de temperatura modelo DS1921H-F5 (Maxim Integrated Products, Inc. Sunnyvale, CA); este sensor posee una resolución de 0,125°C. Durante los experimentos no se observó variación de temperatura dentro de la incubadora de registro.

Para los experimentos de sincronización por temperatura, los nematodos (contenidos en las placas de 96 pocillos) fueron expuestos a un ciclo de temperatura de 12 horas a 17°C y 12 horas a 16°C (Tt 17:16 12:12 horas), o 12 horas a 20°C y 12 horas a 16°C (Tt 20:16 12:12 horas); bajo condiciones de oscuridad constante.

Para los experimentos en condiciones constantes, los nematodos fueron expuestos a: (1) temperatura constante de 15°C, 18°C o 25°C, bajo condiciones de oscuridad constante; u (2) oscuridad constante a 17,5°C.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Sincronización en ciclos luz/oscuridad

En primer lugar, se estudió la actividad locomotora de *Caenorhabditis elegans* en condiciones de luz/oscuridad (LD). Se observó que los nematodos poseen un patrón de actividad de 24 horas cuando son expuestos a un ciclo de luz/oscuridad (luz blanca) de 400 lux. Sin embargo, se observo que gusanos individuales entrenaron con diferentes fases con respecto al *zetigeber* (dador de tiempo) (Figura 39).

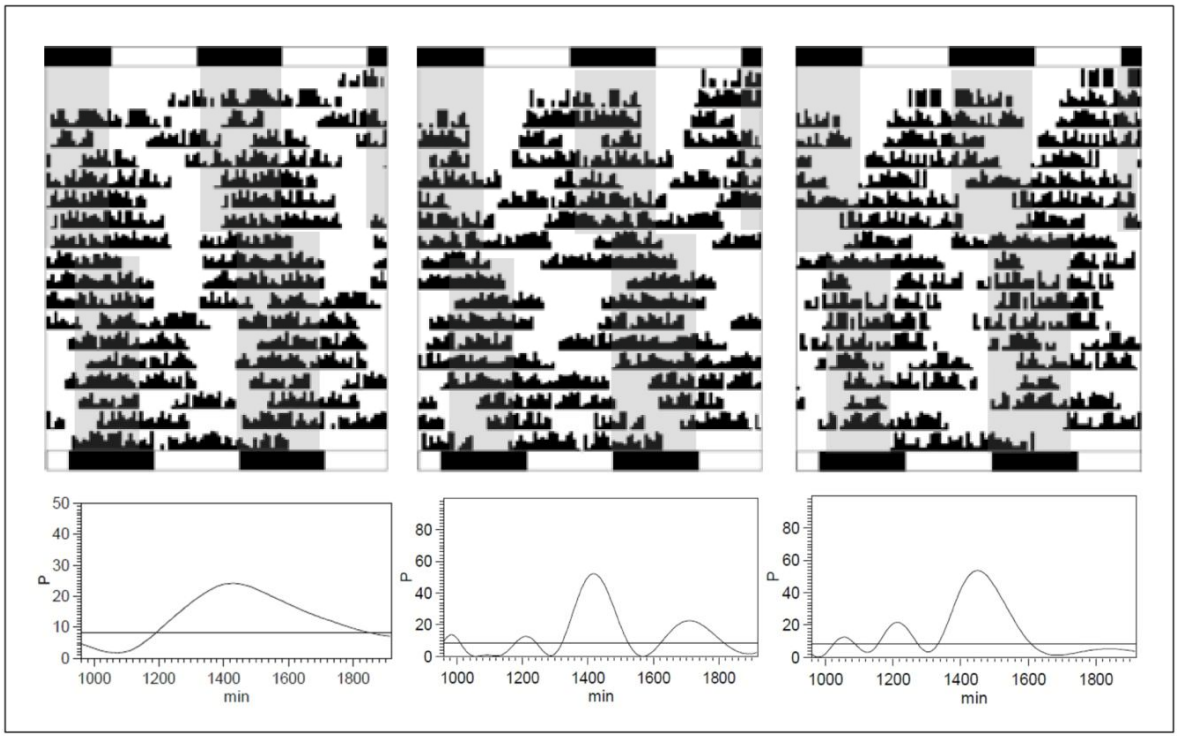


Figura 39. Actividad locomotora de *Caenorhabditis elegans* en condiciones de luz/oscuridad (LD). Actogramas representativos en los cuales se grafican los días sucesivos en el eje de las ordenadas y las horas del día (en horas, de 0 a 48) en el eje de las abscisas. Se registró a los nematodos en un ciclo de luz/oscuridad 12:12 hs, abajo se muestra un análisis por periodograma Lomb Scargle. Luego de 8 días, se realizó un retraso de 6 horas del ciclo luz/oscuridad. La zona sombreada indica las horas de oscuridad.

Para evitar ese problema, se realizaron estudios poblacionales y se graficaron histogramas de fase (a partir de los resultados obtenidos por el método cosinor), y se empleó el test de Rayleigh para calcular la significancia estadística. Como se puede observar en el actograma promedio, la población de gusanos fue capaz de sincronizarse al ciclo de luz/oscuridad (Figura 40A). En estas condiciones, los nematodos mostraronser más activos durante la transición noche/día, con un

mínimo de actividad durante el día y al atardecer. Para estudiar resincronización, los animales fueron sujetos a un cambio de 6 horas del ciclo luz/oscuridad. Bajo estas condiciones, los nematodos fueron capaces de re-sincronizarse al nuevo ciclo LD (Figura 40A). El patrón de actividad promedio no mostró una clara anticipación a la fase de luz u oscuridad del ciclo (Figura 40B), y además la población de gusanos pareció mostrar una inhibición de la actividad locomotora por la luz, ya que la misma decreció durante el transcurso del día. Así, la sincronización al ciclo LD observada podría deberse parcialmente a un efecto de enmascaramiento de la actividad locomotora, y no a una sincronización del reloj circadiano en sí mismo.

Para estudiar si la actividad locomotora de *C. elegans* está bajo control circadiano, los nematodos fueron expuestos a un ciclo LD durante 5 días, y luego fueron colocados en condiciones de oscuridad constante (DD). Para el análisis de los resultados, se evaluó poblacionalmente si la fase inicial en condiciones constantes se correspondía con la fase determinada por el ciclo LD. Para comparar las fases de los ritmos, se realizaron diagramas de transición de fase (*phase transition* (PTC) *plots*). Como se puede observar en la Figura 41, los nematodos se sincronizaron parcialmente al ciclo luz/oscuridad ya que las fases de ambas condiciones se agruparon cerca de la línea de 450 alrededor de ZT/CT4 en aproximadamente el 50% de los animales analizados, en los que la fase inicial en DD coincide con la fase final en LD. Estos resultados sugieren que la luz podría estar sincronizando los ritmos de actividad locomotora en un grupo de *C. elegans*. Sin embargo, en el resto de los animales analizados se observó un posible fenómeno de enmascaramiento, ya que al eliminar el *zeitgeber* el ritmo en libre curso empezó en una fase diferente a la determinada por el ciclo LD con las acrofases promedios agrupadas alrededor de CT15-21. Este comportamiento puede deberse a que bajo determinadas condiciones el *zetigeber* no sincroniza al reloj sino que afecta directamente a la salida del mismo. El enmascaramiento podría complementar al control del reloj biológico de *C. elegans* como una forma de otorgarle a los nematodos la capacidad de poder responder directamente a los cambios en el medio ambiente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

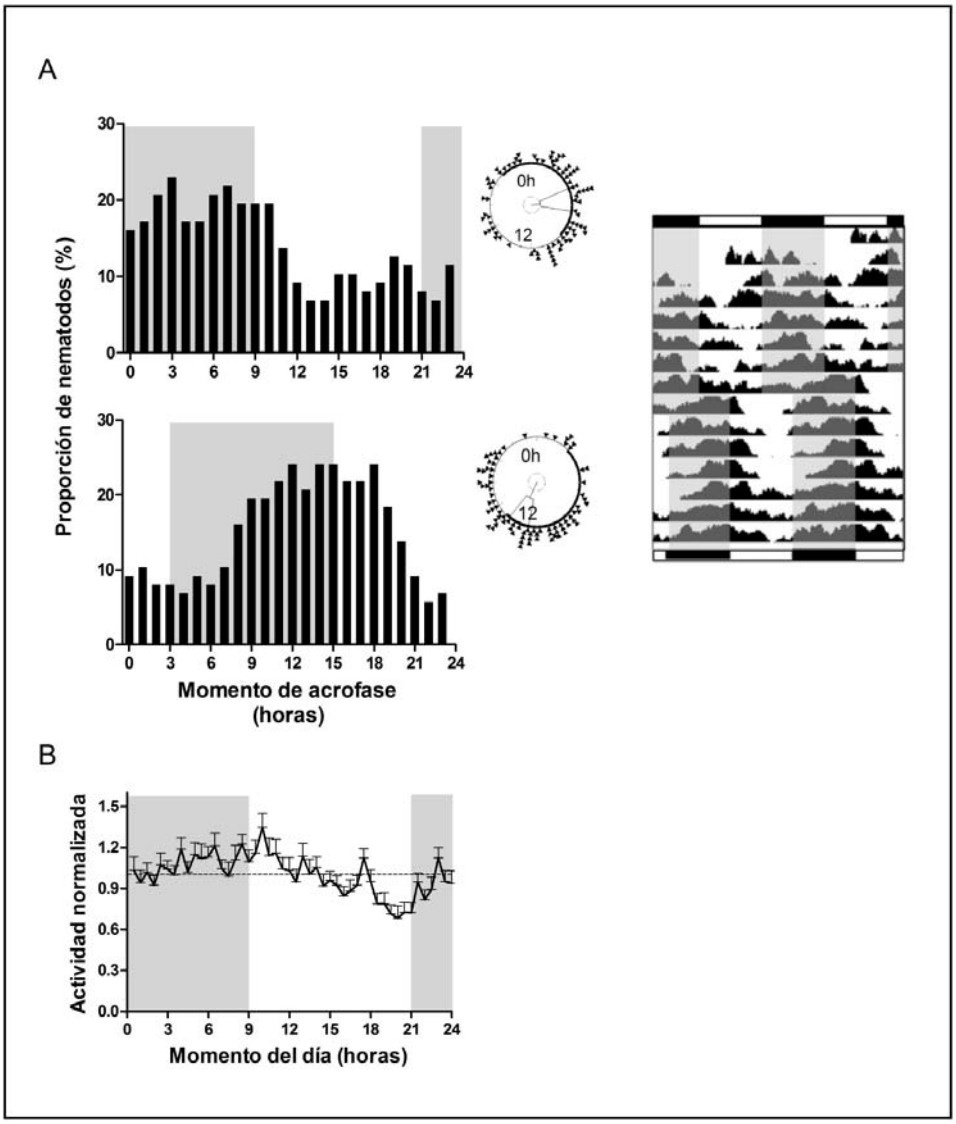


Figura 40. Análisis poblacional de la sincronización en ciclos luz/oscuridad. (A) Histograma de fases de nematodos sincronizados a un ciclo de luz/oscuridad (12:12 hs 400 lux, 17,5^{0}C) antes y después de un retraso de 6 horas del ciclo luz/oscuridad. Panel del medio: test de estadística circular (*test* de Rayleigh) para ambas situaciones (LD1: encendido de las luces 9:00 hs, apagado de las luces 21:00 hs; *test* de Rayleigh, p<0,05, n=80; LD2: encendido de las luces 15:00 hs, apagado de las luces 3:00 hs; *test* de Rayleigh, p<0,05, n=81) (el circulo de puntos alrededor del grafico representa el umbral de significancia (p=0,05) comparada con la amplitud del vector resultante). El actograma de la derecha representa la actividad promedio de la población. La zona sombreada indica las horas de oscuridad. (B) Actividad diaria promedio correspondiente a 3 días de datos (n=20 nematodos sincronizados a un ciclo de luz/oscuridad 12:12 hs). El análisis estadístico de los 3 días de actividad promedio mostro una diferencia significativa entre los valores diurnos y nocturnos (máximo valor = 1,35 ± 0,10 (10 hs); mínimo valor = 0,68 ± 0,09 (20 hs); *test* de ANOVA, p<0,0001). La zona sombreada indica las horas de oscuridad.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

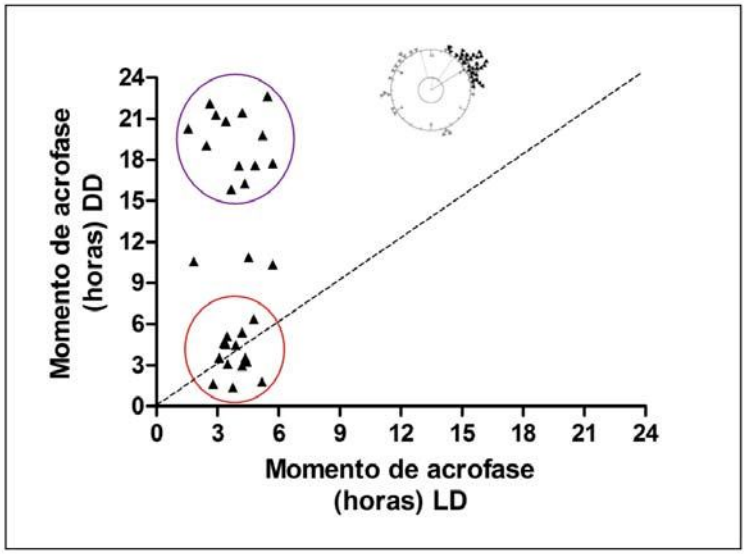


Figura 41. Análisis poblacional de la sincronización de *C. elegans* en la transición LD/DD. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase promedio (análisis de Cosinor) de la actividad locomotora entre los 3 últimos días en LD (eje x) *versus* el primer día en DD (eje y). Arriba. *test* de Rayleigh mostrando el ángulo de fase de las poblaciones entrenadas (triangulos negros) (*test* de Rayleigh: r = 0,9; phi = 1,02 (3,9 hs); n = 30) y el comienzo de la condición constante post sincronización (triángulos grises) (*test* de Rayleigh: r = 0,29; phi = 0,18 (0,7 hs); n = 30). El círculo rojo indica la población de nematodos que se sincronizaron al ciclo LD. El círculo violeta indica la población de nematodos en la que se observó un posible fenómeno de enmascaramiento.

Trabajos previos muestran que *C. elegans* puede sensar la luz en un rango de longitudes de onda entre 520 y 600 nm (luz verde/amarilla) (Burr 1985), así como la luz azul y ultravioleta (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008). Con el objetivo de estudiar el efecto de la luz roja sobre la actividad circadiana, se registró la actividad locomotora de los nematodos bajos condiciones de luz roja/oscuridad. Los resultados se encuentran graficados en la Figura 42. Según lo analizado en la estadístics circular, se observa que el ciclo luz roja/oscuridad no fue capaz de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en C. elegans, a diferencia de lo observado cuando los nematodos son expuestos bajo un ciclo LD (luz blanca de 400 lux de intensidad).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

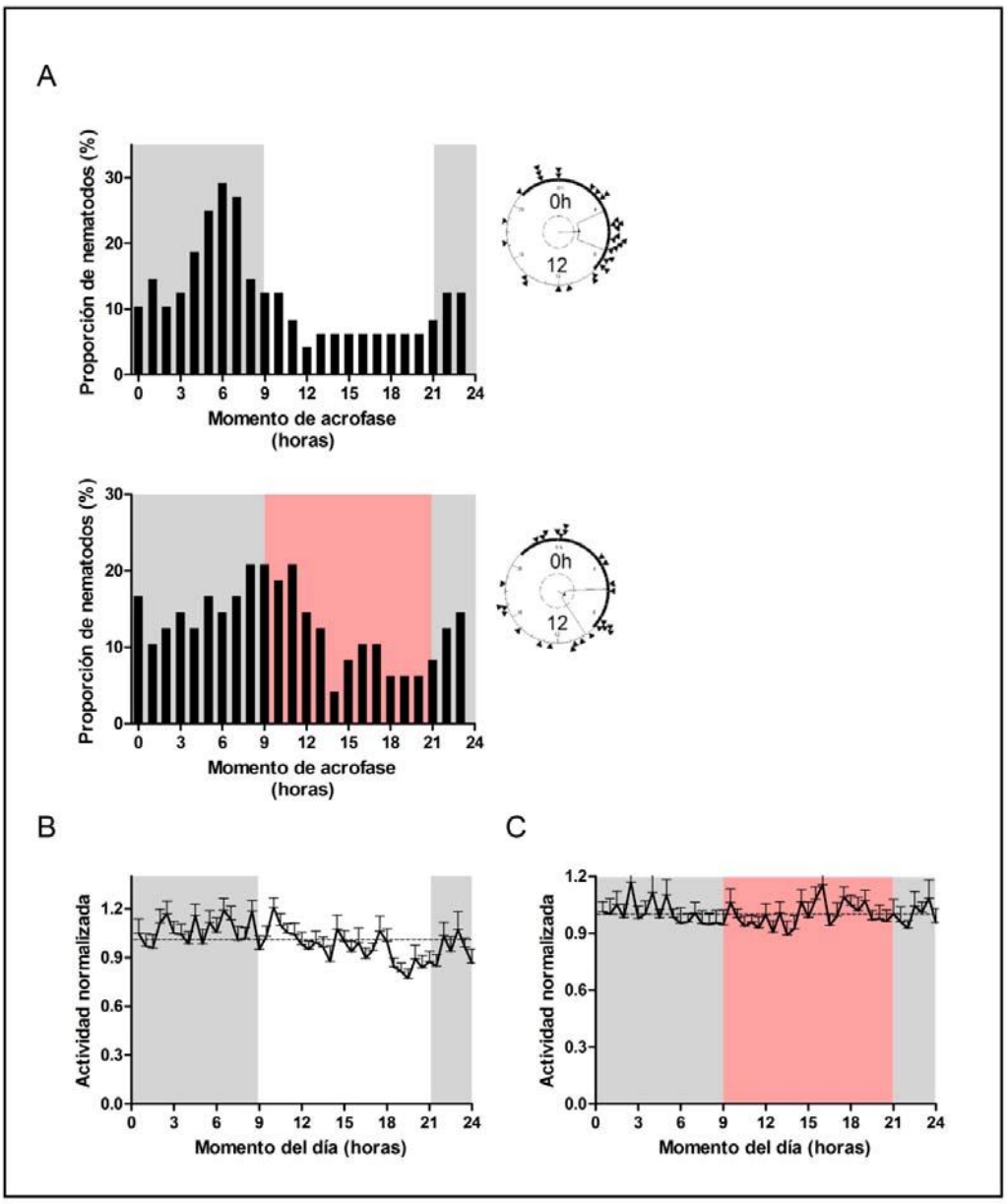


Figura 42. Análisis poblacional de la sincronización en ciclos luz roja/oscuridad. (A) Histograma de fases de nematodos entrenados a un ciclo de luz roja (o luz blanca)/oscuridad (12:12 hs 400 lux, 17,5^{0}C). Derecha: test de estadística circular (*test* de Rayleigh) para ambas situaciones (luz blanca: encendido de las luces 9:00 hs, apagado de las luces 21:00 hs; *test* de Rayleigh, $p<0,05$, $n=32$; luz roja: encendido de las luces 9:00 hs, apagado de las luces 21:00 hs; *test* de Rayleigh, $p>0,05$, $n=27$) (el círculo de puntos alrededor del grafico representa el umbral de significancia ($p=0,05$) comparada con la amplitud del vector resultante). (B) y (C) Actividad diaria promedio correspondiente a 3 días de datos de 20 poblaciones de nematodos sincronizados a un ciclo de luz blanca/oscuridad (*test* de ANOVA, $p<0,004$) y luz roja/oscuridad (*test* de ANOVA, $p>0,05$) respectivamente. Las zonas sombreadas de gris y rojo indican las horas de oscuridad y de luz roja respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Estos resultados sugieren que la sincronización se debe únicamente a la luz blanca y no a otro estimulo externo, como por ejemplo variación de temperatura en la incubadora de registro (cabe aclarar que el registro de la actividad locomotora de C. elegans en condiciones de LD se llevo a cabo a la misma temperatura que el experimento de luz roja/oscuridad, siendo esta de 17,50C).

3.4.2. Sincronización por ciclos de temperatura

Para estudiar la sincronización de los ritmos circadianos por la temperatura en *C. elegans*, los nematodos fueron expuestos a un ciclo de temperatura de 12 horas a 17°C y 12 horas a 16°C (Tt 17:16 12:12 horas), o 12 horas a 20°C y 12 horas a 16°C (Tt 20:16 12:12 horas); bajo condiciones de oscuridad constante. Como se puede observar en el actograma promedio, la población de gusanos fue capaz de sincronizarse al ciclo de temperatura 170C:160C (Tt 12:12 hs). En estas condiciones, los nematodos mostraron ser más activos durante el principio y la mitad del día subjetivo (Figura 43A), el cual fue re-sincronizado después de un cambio de 6 horas en el ciclo Tt (Figura 42A). Se observa que los nematodos muestran mayor actividad locomotora durante la fase de mayor temperatura (Figura 43B). Por otra parte, cuando los nematodos fueron colocados bajo una mayor variación de temperatura: 200C:160C (Tt 12:12 hs), la amplitud de los ritmos fue mayor; una disminución de la actividad se observó cuando la temperatura paso de valores altos a bajos (Figura 43C). En estas condiciones puede inferirse un fenómeno de enmascaramiento de los ritmos debido a los importantes cambios en la amplitud del *zeitgeber*.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

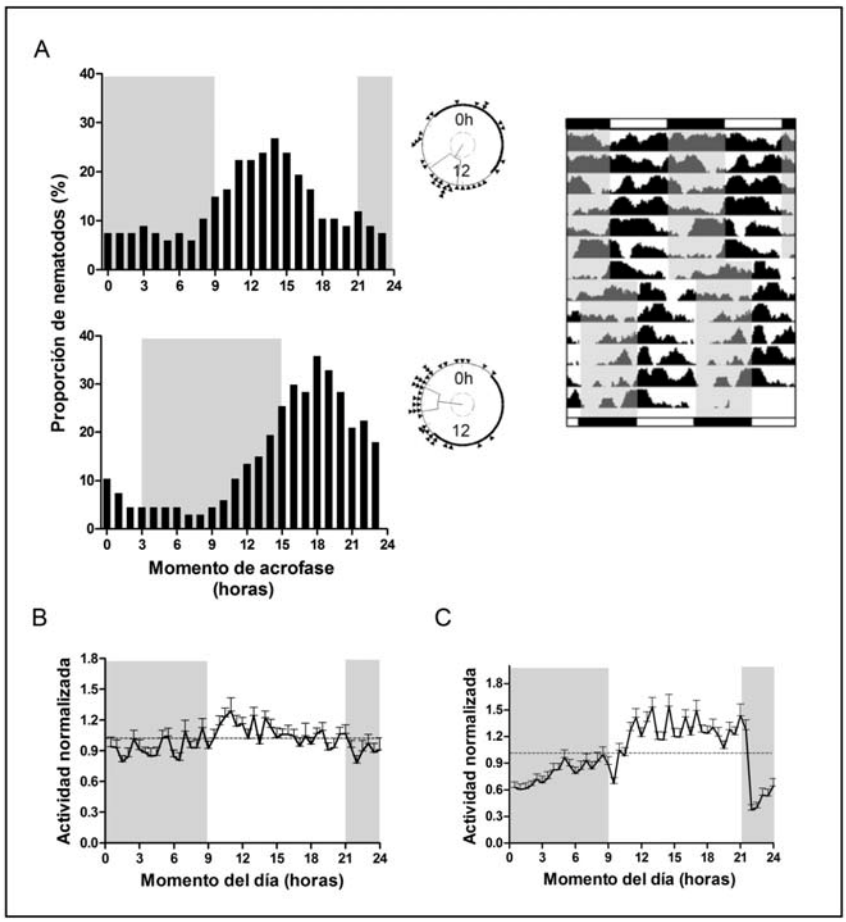


Figura 43. Análisis poblacional de la sincronización en ciclos de temperatura. (A) Histograma de fases de nematodos entrenados a un ciclo Tt (17^0C:16^0C, Tt 12:12 hs) antes y después de un retraso de 6 horas del ciclo de temperatura. Panel del medio: test de estadística circular (*test* de Rayleigh) para ambas situaciones: Tt1 (17^0C desde las 9:00 hs hasta las 21:00 hs; 16^0C desde las 21:00 hs hasta las 9:00 hs; n=32, p<0,05) y Tt2 (17^0C desde las 15:00 hs hasta las 3:00 hs; 16^0C desde las 3:00 hs hasta las 15:00 hs; n=38, p<0,05) (el circulo de puntos alrededor del grafico representa el umbral de significancia (p=0,05) comparada con la amplitud del vector resultante). El actograma de la izquierda representa la actividad promedio de la población. (B) Actividad diaria promedio correspondiente a 3 días de datos (n=20 nematodos sincronizados a un ciclo Tt 17^0C:16^0C, 12:12 hs). El análisis estadístico de los 3 días de actividad promedio mostro una diferencia significativa entre los valores de alta y baja temperatura (máximo valor = 1,28 ± 0,13 (11 hs); mínimo valor = 0,78 ± 0,07 (22 hs); *test* de ANOVA, p<0,03). (C) Actividad diaria promedio correspondiente a 3 días de datos (n=20 nematodos sincronizados a un ciclo Tt 20^0C:16^0C, 12:12 hs). El análisis estadístico de los 3 días de actividad promedio mostro una diferencia significativa entre los valores de alta y baja temperatura (máximo valor = 1,55 ± 0,12 (14 hs); mínimo valor = 0,37 ± 0,06 (22 hs); *test* de ANOVA, p<0,0001). Las zonas sombreadas indican las horas de alta temperatura del ciclo.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Por otro lado, los nematodos fueron expuestos a un ciclo Tt (20^0C:16^0C , Tt 12:12 hs) durante 5 días, y luego fueron colocados en condiciones de temperatura constante (16^0C, DD). Para el análisis de los resultados, se evaluó poblacionalmente si la fase inicial en condiciones constantes se correspondía con la fase determinada por el ciclo Tt. Como se puede observar en la Figura 44, las fases de ambas condiciones se agruparon cerca de la línea de 45^0, por lo que la fase inicial en DD se coincide con la fase final en LD. Al igual que ocurre con la luz, la temperatura podría estar sincronizando los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*, en lugar de ejercer un efecto de enmascaramiento sobre la actividad locomotora de los nematodos.

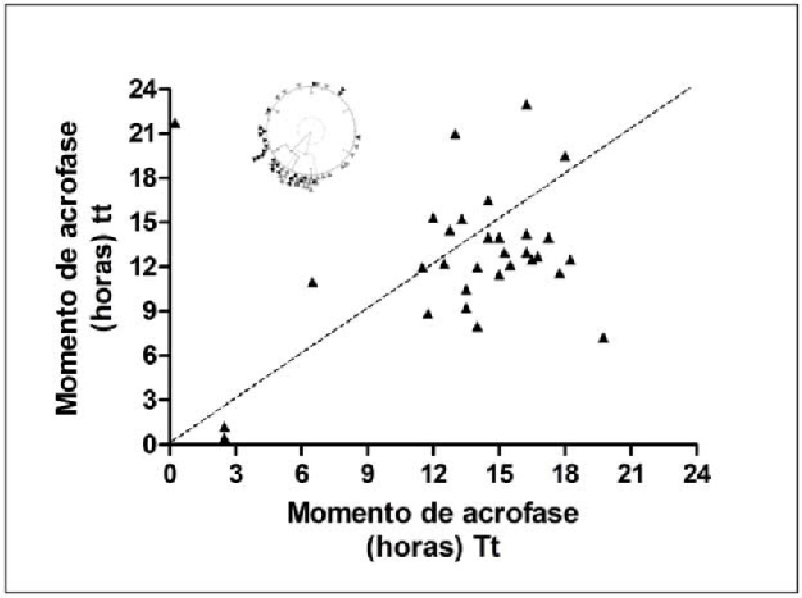


Figura 44. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase promedio (análisis de Cosinor) de la actividad locomotora entre los 3 últimos días en Tt (20^0C:16^0C) (eje x) *versus* el primer día en DD y temperatura constante (16^0C) (eje y). Arriba. *test* de Rayleigh mostrando el ángulo de fase de las poblaciones entrenadas (Tt (triángulos negros): r = 0,7; phi = -2,4 (14,8 hs); n = 35, y tt (triángulos grises): r = 0,5; phi = -2,9 (12,9 hs); n = 31).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4.3. Comportamiento en condiciones de oscuridad constante

Con el objetivo de estudiar los ritmos de actividad locomotora en condiciones constantes, los nematodos fueron colocados en oscuridad constante a 17,5^{0}C y se monitoreó en forma continua su actividad locomotora en medio líquido. Se observó una importante variabilidad en la ritmicidad, ya que gusanos individuales -o bien grupos de 7/8 gusanos por pocillo- mostraron diferentes periodos (Figura 45).

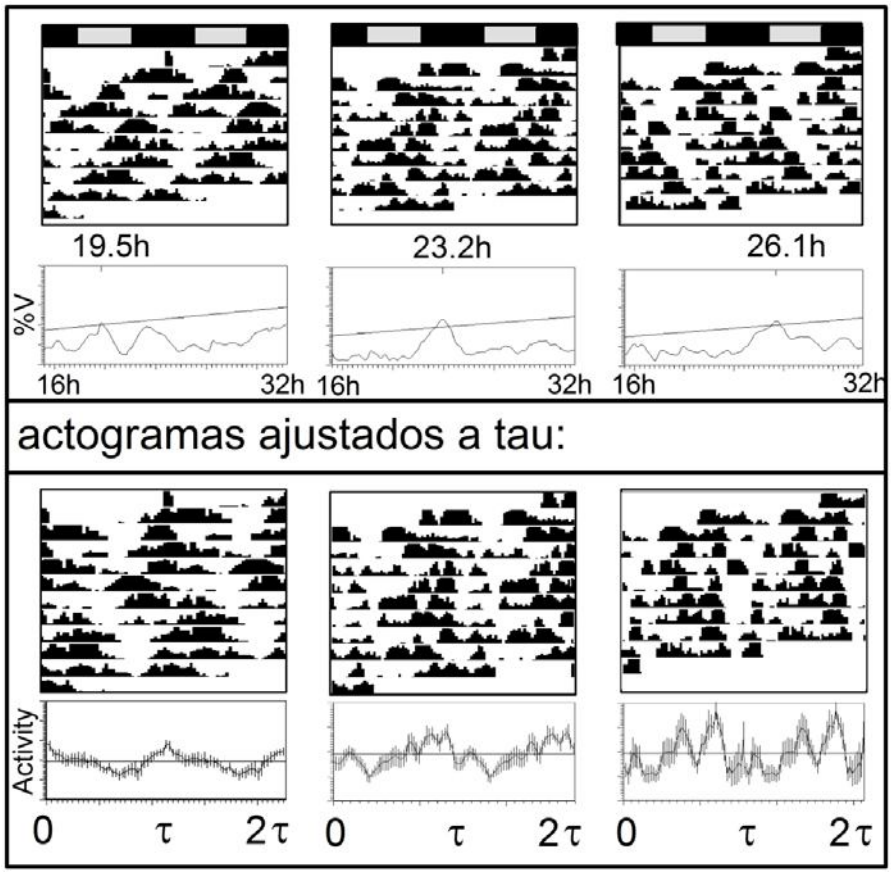


Figura 45. Ritmos de actividad locomotora en *C. elegans* bajo condiciones de oscuridad constante. Cuadro superior: actogramas representativos (en horas, de 0 a 48) de 3 poblaciones de nematodos mostrando diferentes periodos circadianos (19,5; 23,2 y 26,1 hs), con su análisis por periodograma Lomb Scargle. Cuadro inferior: mismos actogramas ajustados al periodo (*tau*) encontrado y perfil de actividad promedio correspondiente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Del total de pocillos registrados (n>300), sólo el 70% fue clasificado como analizables (o sea, con los animales en buen estado, y que hayan tenido altos niveles de actividad hacia el final del experimento). Del total de pocillos analizables, sólo el 57% fue clasificado como significativamente rítmico (analizados por periodograma Lomb Scargle, así como la observación visual de los registros). El periodo circadiano promedio obtenido fue de 23,9+/-0,4 a 17,5^{0}C.

3.4.4. Compensación por temperatura

Como se mencionó en la introducción general, los ritmos circadianos son independientes de la temperatura, es decir que compensan sus variaciones (Q_{10}≈1). Con el objetivo de caracterizar los ritmos circadianos en *C. elegans*, los nematodos fueron colocados en condiciones de oscuridad constante a diferentes temperaturas, y se monitoreó en forma continua su actividad locomotora en medio líquido. Los resultados se muestran en la Figura 46, en la cual se observa una distribución normal en el periodo circadiano. Los ritmos poblacionales fueron compensados por temperatura con un Q_{10} =1,09.

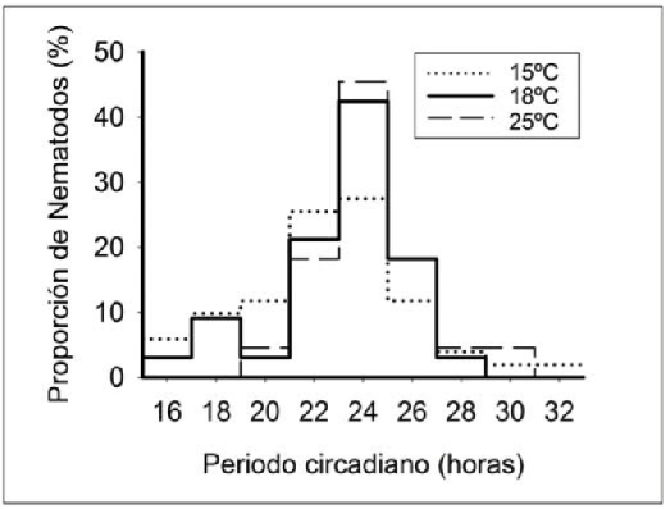


Figura 46. Histograma de periodos circadianos de nematodos *wild type* a diferentes temperaturas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4.5. Mutantes circadianos

El genoma de *C. elegans* codifica para ciertos genes cuyas secuencias tienen diverso grado de homología con genes reloj de insectos (Hasegawa, et al. 2005; Temmerman, et al. 2011). El homólogo de la proteína circadiana Per, denominado Lin-42, se expresa durante los cambios de cutícula de los nematodos con una ritmicidad de 6 horas (Jeon, et al. 1999; Monsalve, et al. 2011), mayoritariamente en las células hipodermales. A pesar de que el rol principal de Lin-42 está asociado al desarrollo de *C. elegans*, nuestros resultados mostraron que *lin-42* podría jugar un rol en el reloj circadiano de los nematodos. Se observó que los mutantes para ese gen poseen un mayor período circadiano. En este trabajo se registraron dos alelos diferentes para esta mutación: (1) *lin-42(n1089)*, que posee una deleción de 5.233 pb la cual incluye el dominio PAS de ese gen, importante para la interacción con las proteínas del reloj; y (2) *lin-42(mg152)*, que posee una deleción de 8 pb, una inserción de 2 pb y un codón de terminación; en este mutante también se encuentra ausente el dominio PAS. El mutante *lin-42*(mg152) mostró un período circadiano de 25,2 ± 0,4 h (su distribución de períodos fue significativamente diferente a la cepa control N2; $p<0,05$). El rescate del alelo mutado para ese gen (cepa VELS26) mostró un período circadiano de 24,1 ± 0,3 h (su distribución de períodos no fue significativamente diferente a la cepa control N2; $p>0,05$) (Figura 47). El mutante *lin-42*(n1089) también mostró un período circadiano mayor (25,6 ± 0,5 h, $p<0.02$ *versus* la cepa control) (Figura 48).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

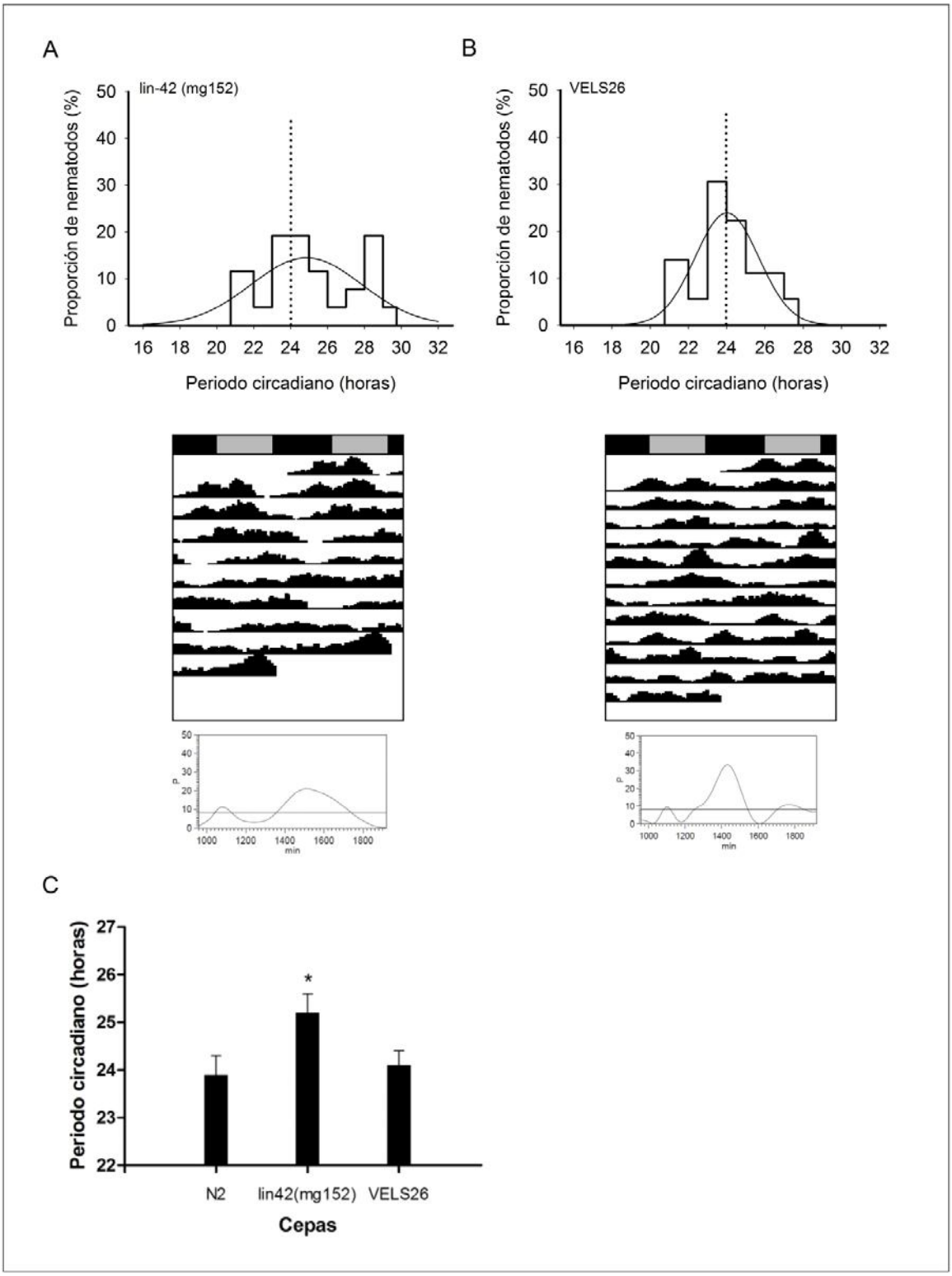


Figura 47. Actogramas representativos e histogramas de periodos circadianos en *C. elegans*. (A) mutante *lin-42(mg152)* (n = 26), abajo se muestra un análisis por periodograma Lomb Scargle. (B) Cepa VELS26 (rescate del alelo mutado para la mutación *lin-42(mg152)*) (n = 36), abajo se muestra un análisis por periodograma Lomb Scargle. (C) Periodo circadiano promedio de las cepas control y mutante (*p<0,05 *versus* la cepa control N2).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

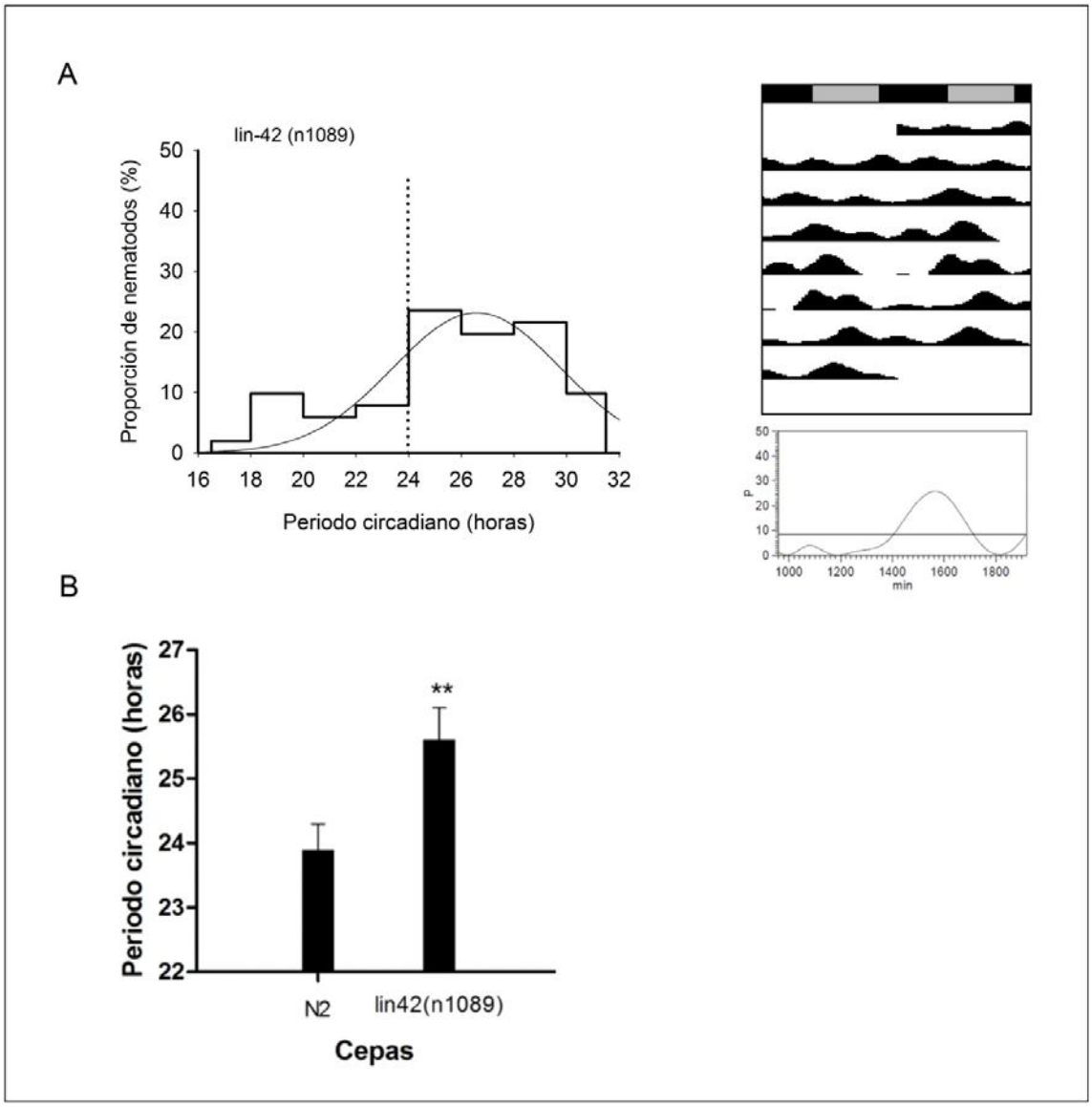


Figura 48. (A) Actograma representativo e histograma de periodos circadianos en la cepa mutante *lin-42(n1089)* (n = 51), a la derecha se muestra un análisis por periodograma Lomb Scargle. (B) Periodo circadiano promedio de las cepas control y mutante (**p<0,02 *versus* la cepa control N2).

3.4.6. Mutantes de fotorrecepción

Algunos mutantes de fototaxis han sido aislados y caracterizados. Mutantes para el gen *lite-1* (cepa KG1180) muestran una respuesta fuertemente reducida a la luz de longitud de onda corta (Edwards, et al. 2008). *lite-1* codifica para un receptor de luz ultravioleta que actúa en neuronas y pertenece a la familia de receptores gustativos (Gr) de invertebrados. Por otro lado, mutantes para el gen *tax-2* (*p671* y *p691*) muestran una respuesta fototáxica negativa (*reversal response*)

deficiente cuando son iluminados en la cabeza con luz ultravioleta (Ward, et al. 2008). *tax-2* codifica para la subunidad α de canales CNG, los cuales se expresan en varias neuronas sensoriales. Edwards et al. (2008) demostraron que mutaciones en *tax-2(p671)* y *tax-2(p691)* (cepas PR671 y PR691 respectivamente) no afectan la respuesta fototáxica positiva (*forward response*) cuando los nematodos son iluminados en todo el cuerpo -o únicamente en la cola- con luz de longitud de onda corta. Estos investigadores encontraron que la cepa PR691 (proveniente del *C. elegans Genetics Center*) tiene una segunda mutación en el gen *lite-3*, por lo tanto para sus estudios separaron las dos mutaciones generando las cepas KG1352 (*tax-2(p691))* y KG1214 (*lite-3(ce360))*. *Lite-3* está ubicado en el cromosoma X de los nematodos cerca de *lite-1*, y su respuesta a la luz es semejante a la de los mutantes nulos para *lite-1*.

En el presente capítulo se estudió la sincronización del ritmo de actividad locomotora por la luz en los mutantes *lite-1(ce314)* y *tax-2(p691)* (mutante tanto en *lite-3* como en *tax-2*). Para ello, los nematodos fueron colocados bajo un ciclo luz/oscuridad (LD 12:12 horas) a 17,50C y se monitoreó en forma continua su actividad locomotora en medio líquido. Se observó una gran variabilidad en la ritmicidad, ya que las diferentes poblaciones analizadas (grupos de 7/8 gusanos por pocillo) mostraron diferentes periodos en LD. Para el análisis posterior de los resultados, se estableció como población rítmica a aquéllas que mostraron un periodo de 24 ± 2 h bajo condiciones de LD (analizados por periodograma Lomb Scargle, así como la observación visual de los registros). Los resultados se encuentran graficados en la Figura 49. Para la cepa control (*wild type*), del total de pocillos registrados (n=144), solo el 72% fue clasificado como analizable (o sea, que los datos de actividad locomotora hayan pasado la prueba de normalidad, y además que los animales estén en buen estado, y que hayan tenido altos niveles de actividad hacia el final del experimento). Del total de pocillos analizables, sólo el 51% fue clasificado como rítmico. Para la cepa *lite-1(ce314)*, del total de pocillos registrados (n=96), solo el 89% fue clasificado como analizable. Del total de pocillos analizables, sólo el 27% fue clasificado como rítmico (Fisher's exact test, $p<0,01$ *vs*. la cepa control). Para la cepa *tax-2(p691)*, del total de pocillos registrados (n=96), solo el 59% fue clasificado como analizable. Del total de pocillos analizables, sólo el 49% fue clasificado como rítmico (Fisher's exact test, $p>0,05$ *vs*. la cepa control). Estos resultados indican que en el mutante *lite-1(ce314)*, el 73% de la población no fue capaz de responder rítmicamente al ciclo de luz/oscuridad.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

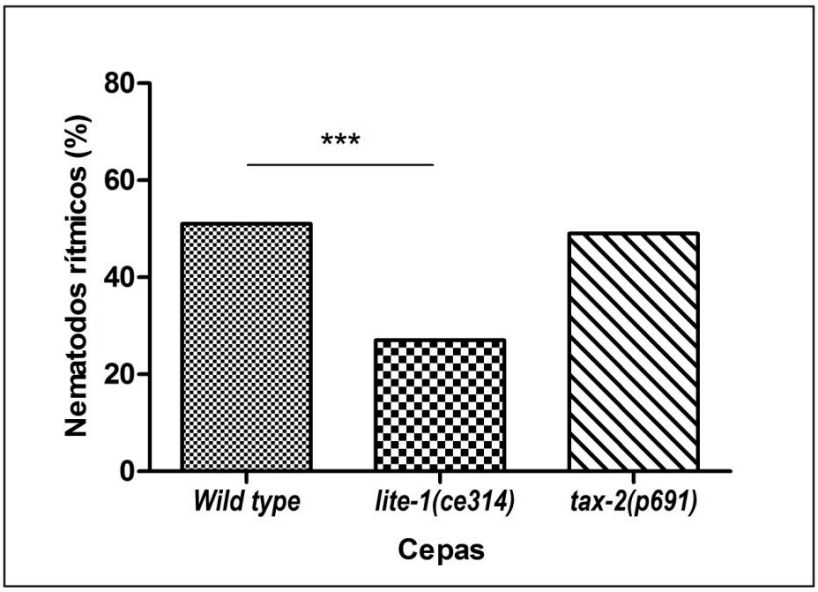


Figura 49. Porcentaje de nematodos rítmicos bajo condiciones de luz-oscuridad. ***p<0,01 *versus* la cepa control N2).

A partir de las acrofases de nematodos que mostraron ser rítmicos en condiciones de LD se construyeron histogramas de fase, y se empleó el test de Rayleigh para calcular la significancia estadística. En estas condiciones el mutante *lite-1(ce314)* mostró ser mas activo durante la fase de oscuridad (Figura 50B). Sin embargo, en el caso de los experimentos realizados con el mutante *tax-2(p691)* se observó que la fase de actividad locomotora no tuvo relación con el *zeitgeber*, ya que los nematodos mostraron actividad tanto de día como de noche (Figura 50C). Como se mostró antes, la cepa control (*wild type*) presentó altos niveles de actividad durante la noche (Figura 50A). Estos resultados indican un posible rol de *tax-2* y *lite-3* en la sincronización fótica. Además, el mecanismo de sincronización depende en gran parte de que las células del reloj de *C. elegans* sean o no intrinsicamente receptivas. Los resultados del presente capítulo apuntan a una participación de la neurona ASJ como una posible célula fotorreceptora circadiana en estos animales; en este sentido, la proteína Lite-1 podría participar como un receptor circadiano de luz.

Por otro lado, para determinar si los ritmos de actividad locomotora en las cepas mutantes (rítmicas en LD) están sincronizados al ciclo luz/oscuridad se evaluó poblacionalmente si la fase inicial en condiciones constantes se correspondía con la fase determinada por el ciclo LD. Para comparar las fases de los ritmos, se realizaron diagramas de transición de fase (*phase transition* (PTC) *plots*). Como se mostró antes, la cepa control se sincronizó parcialmente al ciclo luz/oscuridad ya que las fases de ambas condiciones (LD/DD) se agruparon cerca de la línea de 450 alrededor de ZT/CT4 en aproximadamente el 50% de los animales analizados. Sin embargo, en el resto de los animales se observó un posible fenómeno de enmascaramiento. Por otro lado, en los mutantes *lite-1(ce314)* y *tax-2(p691)* se observó enmascaramiento de la luz sobre los ritmos de

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

actividad locomotora, ya que al eliminar el *zeitgeber* el ritmo en libre curso empezó en una fase diferente a la determinada por el ciclo LD (Figura 51).

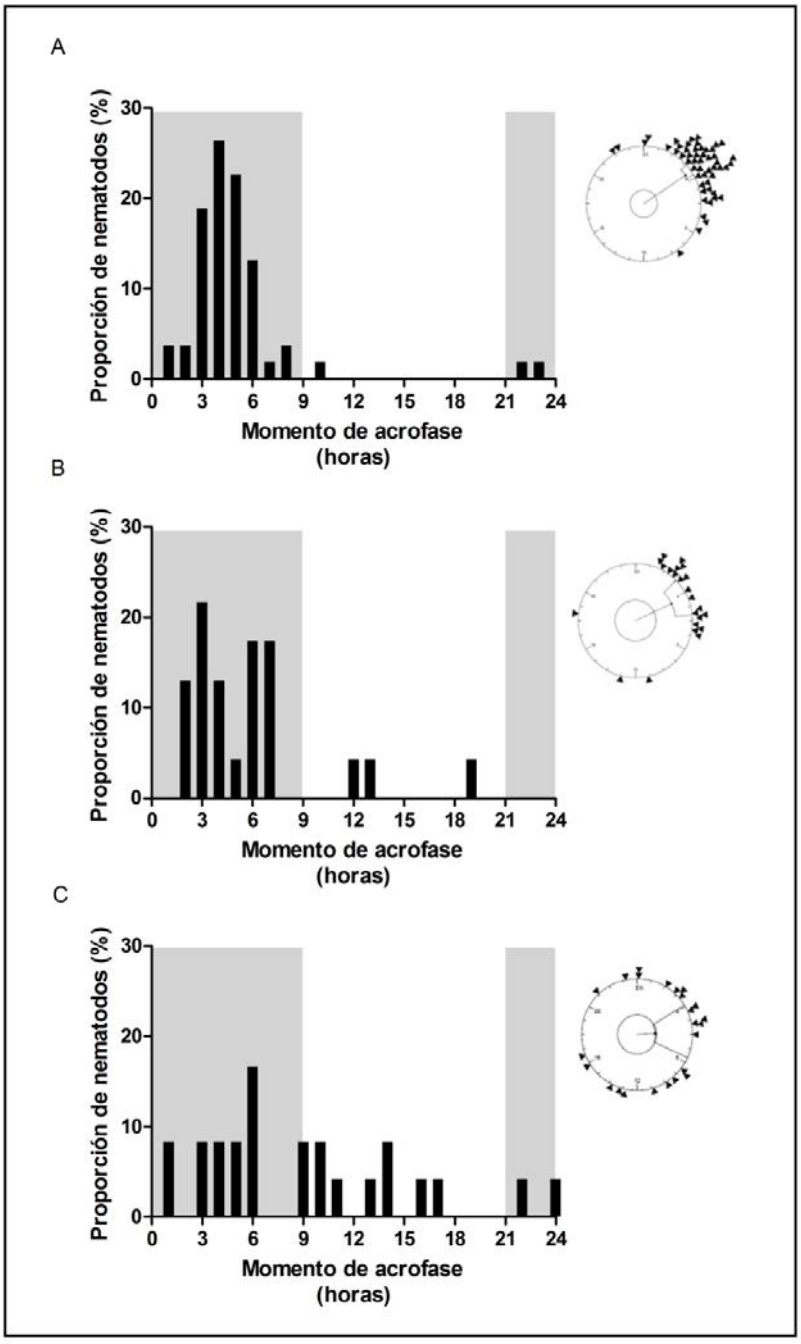


Figura 50. Histograma de fases de nematodos expuestos a un ciclo de luz/oscuridad (LD 12:12 h). (A) Cepa control (*wild type*), panel de la derecha: *test* de Rayleigh, p<0,05, n=53. (B) Mutante *lite-1(ce314)*, panel de la derecha: *test* de Rayleigh, p<0,05, n=23. (C) Mutante *tax-2(p691)*, panel de la derecha: *test* de Rayleigh, p>0,05, n=28. Las zonas sombreadas indican las horas de oscuridad.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

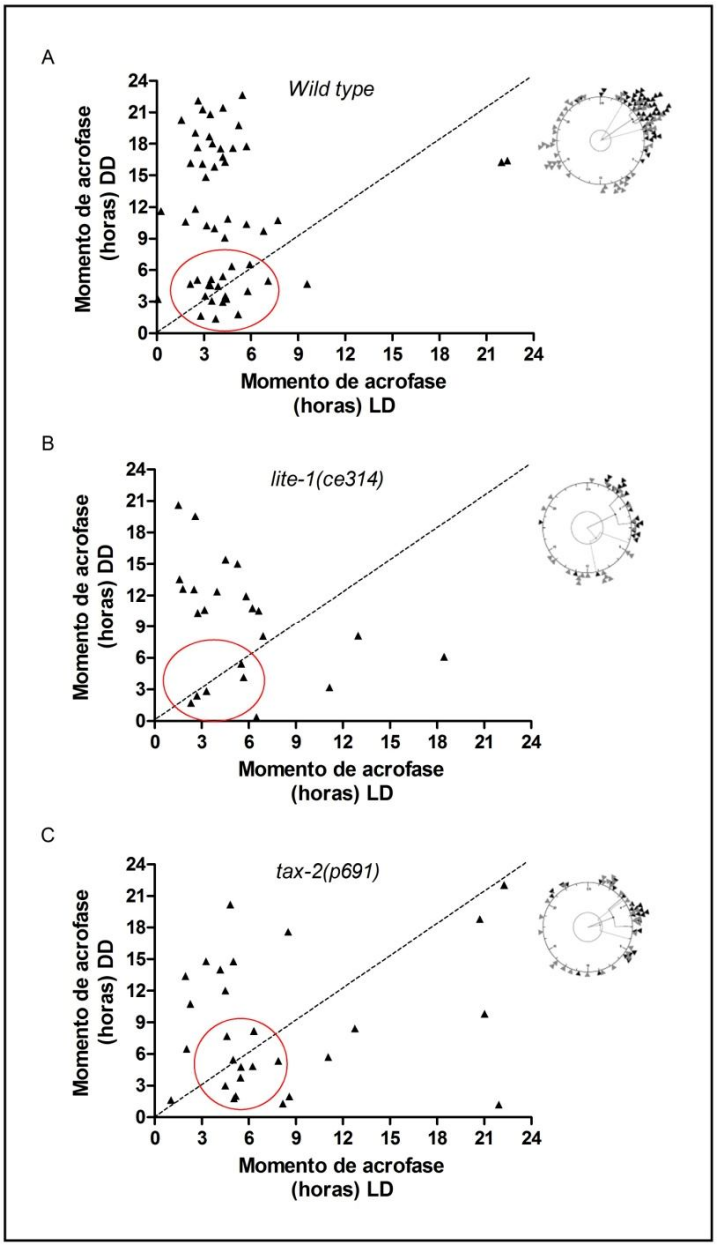


Figura 51. Diagrama de transición de fase mostrando la acrofase promedio (análisis de Cosinor) de la actividad locomotora entre los 3 últimos días en LD (eje x) *versus* el primer día en DD (eje y). Panel de la derecha: *test* de Rayleigh mostrando el ángulo de fase de las poblaciones entrenadas (triángulos negros) *vs*. el comienzo de la condición constante post sincronización (triángulos grises). (A) Cepa control. *Test* de Rayleigh (poblaciones entrenadas: r = 0,87; phi = 0,97 (3,7 hs); n = 53, primer día en DD: r = 0,059; phi = 0,92 (3,51 hs); n = 53). (B) Mutante *lite-1(ce314)*. *Test* de Rayleigh (poblaciones entrenadas: r = 0,69; phi = 1,13 (4,32 hs); n = 23, primer día en DD: r = 0,3; phi = 2,42 (9,25 hs); n = 23). (C) Mutante *tax-2(p691)*. *Test* de Rayleigh (poblaciones entrenadas: r = 0,61; phi = 1,21 (4,62 hs); n = 28, primer día en DD: r = 0,28; phi = 1,38 (5,27 hs); n = 28). Los círculos rojos indican la población de nematodos que se sincronizaron al ciclo LD.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

3.4.7. Discusión

En este capítulo se realizó una descripción completa de los ritmos de actividad locomotora de nematodos adultos. Se mostró que los mismos cumplen con las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos que fueron definidas por Colin Pittendrigh en 1960: (1) son endógenos, (2) el período endógeno es independiente de la temperatura (Q10 ≈ 1), y (3) los ritmos circadianos se sincronizan por ciclos medioambientales, tales como la luz y la temperatura. Además, nuestros resultados mostraron que Lin-42 (el homólogo de la proteína circadiana Per) podría jugar un rol en el reloj circadiano de *C. elegans*; y que Lite-1, Lite-3 y Tax-2 (integrantes de la cadena de fototransducción) podrían participar de la sincronización del ritmo de actividad locomotora por la luz en *C. elegans*.

Sincronización del reloj circadiano de *C. elegans* por la luz y la temperatura

Los ritmos circadianos en la actividad locomotora de *C. elegans* han sido estudiados utilizando dos diferentes metodologías: (1) *video tracking* y (2) *parallel worm tracker*. El *video tracking* (Saigusa, et al. 2002) permite el registro de gusanos individuales (filmación del movimiento de un gusano y posterior procesamiento digital de las imágenes obtenidas) utilizando un *bug tracker*. Esta metodología no es útil para el *screening* de mutantes y la caracterización circadiana de poblaciones de gusanos. El *parallel worm tracker* (Ramot, et al. 2008) permite el registro de poblaciones de nematodos, pero aun no ha sido utilizado en experimentos circadianos de tiempos prolongados. Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que el sistema de registro utilizado en este trabajo es útil para detectar la actividad locomotora de *C. elegans* durante tiempos largos (Simonetta y Golombek 2007), tanto de gusanos individuales como de poblacionales de los mismos.

En el presente capítulo se estudiaron los ritmos de actividad locomotora de nematodos adultos en condiciones de luz/oscuridad. Se observó que el patrón de actividad de gusanos individuales, así como el periodo y la acrofase, presentan una gran variabilidad. Además, nuestros registros mostraron un gran número de gusanos arrítmicos. Otro grupo de investigadores, utilizando diferentes métodos de registro de la actividad locomotora (como por ejemplo *video tracking*), también observaron una gran variabilidad en los parámetros circadianos de *C. elegans*, así como una gran proporción de nematodos arrítmicos (Hut y Merrow, *University of Groningen*, comunicación personal). En contraste, datos publicados previamente sugieren una distribución homogénea de los ritmos circadianos en estos nematodos (Saigusa, et al. 2002). Sin embargo, pequeñas variaciones en los parámetros circadianos de nematodos individuales podrían ser atribuidas a la estructura del reloj biológico en estos animales, o que la actividad locomotora sea una salida del reloj poco robusta. Además, nuestros datos sugieren un modelo estocástico del

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

reloj el cual utiliza un pequeño número de componentes para su funcionamiento (Gonze, et al. 2002; Gonze y Goldbeter 2006). Para evitar el problema de la variabilidad inter-individuo encontrada en los parámetros circadianos se realizaron estudios poblacionales. Este tipo de estudios ha sido ampliamente utilizado en la determinación de características claves de los sistemas circadianos, como por ejemplo en el estudio de los ritmos de eclosión y caracterización de mutantes circadianos en *D. melanogaster* (Zimmerman, et al. 1968; Konopka y Benzer 1971).

Estudios poblacionales de la actividad locomotora de *C. elegans* (aproximadamente 5 gusanos por pocillo) mostraron un patrón de actividad de 24 horas cuando fueron expuestos a un ciclo luz/oscuridad (LD 12:12 hs, 400 lux). Por otra parte, la población fue capaz de re-sincronizarse a un ciclo LD después de un cambio de 6 horas en el fotoperiodo. En ambas condiciones, los nematodos mostraron ser más activos durante la transición noche/día, con un mínimo de actividad al atardecer (Figura 39). En condiciones constantes, dada la ausencia de señales ambientales, los animales mantienen sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico. Para confirmar si la actividad locomotora de *C. elegans* está bajo control circadiano, la población de nematodos fue colocada en oscuridad constante (un ciclo LD durante 5 días, y luego condiciones de DD). Como se puede observar en la Figura 39C, la fase inicial en DD coincide con la fase final en LD. Estos resultados sugieren que la luz podría estar sincronizando los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*.

Recientemente se descubrió un mecanismo de fototransducción en *C. elegans* (Liu, et al. 2010). A pesar de que estos nematodos carecen de células fotorreceptoras típicas y pigmentos clásicos, pueden responder comportamentalmente a la luz azul y/o ultravioleta a través de receptores de la familia de los fotorreceptores gustativos (Gr) de invertebrados. Por otra parte, la fototaxis negativa en estos animales depende de la actividad de los canales CNG (del inglés *cyclic nucleotide-gated*) o de receptores gustativos de invertebrados dependientes de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) (Edwards, et al. 2008; Ward, et al. 2008). Es factible entonces especular que ese sistema fotorreceptor pueda estar involucrado en la sincronización circadiana en *C. elegans*. Por lo tanto, se requerirán futuros experimentos (por ejemplo, estudiar la sincronización del ritmo de actividad locomotora por la luz, teniendo en cuenta la intensidad y composición espectral de los estímulos) para dilucidar las posibles vías de transducción de señales encargadas de sincronizar los ritmos circadianos en estos nematodos. Además, numerosos receptores acoplados a proteína G han sido implicados en una gran variedad de procesos sensoriales en *C. elegans* (por ejemplo, (Fukuto, et al. 2004)), los cuales podrían jugar un rol importante en la vía de señalización implicada en la sincronización fótica en esta especie.

Como se mencionó en la introducción general, el reloj biológico puede ser sincronizado por un gran número de estímulos diferentes, incluyendo luz, temperatura,

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

hábitos sociales, conducta reproductiva, actividad, olores, etc. Para corroborar si la temperatura es capaz de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*, los nematodos fueron expuestos a dos ciclos de temperatura distintos (Tt 17:16°C 12:12 horas, o Tt 20:16°C 12:12 horas; bajo condiciones de oscuridad constante). Como se puede observar en la Figura 41, nuestros datos sugieren que la temperatura es también una fuerte señal para el sistema circadiano de los nematodos, dado que los ciclos de baja amplitud (∆1°C) fueron capaces de sincronizar los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*. También es posible que la luz blanca pueda tener algún componente térmico, sin embargo experimentos realizados con luz de diferentes longitudes de onda (por ejemplo, luz roja) no fueron capaces de sincronizar los ritmos de actividad en estos animales, sugiriendo que la luz sería capaz de afectar las oscilaciones por sí sola, o que el componente térmico de la luz no alcance para sincronizar el reloj. Así, ambos *zeitgebers* podrían contribuir en la sincronización del reloj biológico de los nematodos. Al igual que en *Drosophila melanogaster* (Boothroyd, et al. 2007; Glaser y Stanewsky 2007), el reloj circadiano de *C. elegans* podría integrar ambas señales (luz y temperatura) a nivel molecular, y de esa forma regular la expresión de genes reloj. Cabe aclarar que el pico de máxima actividad obtenido cuando los gusanos fueron entrenados bajo un ciclo luz/oscuridad fue diferente al obtenido cuando los nematodos fueron entrenados bajo un ciclo de temperatura, sugiriendo que diferentes mecanismos podrían ser responsables de la sincronización dependiendo de las señales ambientales.

Además, otros *zeitgebers* tales como gradientes químicos, feromonas o incluso melatonina, podrían también participar de la sincronización. Por lo tanto, se requerirán futuros experimentos, como por ejemplo competencia de *zeitgebers*, para determinar el peso relativo de cada estimulo en la sincronización del reloj biológico de *C. elegans*.

Mutantes circadianos y de fotorrecepción

Los ritmos circadianos en *C. elegans* podrían estar gobernados por oscilaciones moleculares canónicas, al igual que en *D. melanogaster* y mamíferos (Dunlap, et al. 1999). Sin embargo, aunque en *C. elegans* han sido descriptos algunos genes con diversos grados de homología a los genes reloj (Hasegawa, et al. 2005), se encontró que los mismos participan en otras funciones en los nematodos (Jeon, et al. 1999; Banerjee, et al. 2005; Tennessen, et al. 2006).

En este trabajo se registraron dos mutantes de *lin-42* (homólogo de la proteína circadiana Per) el cual se expresa durante los cambios de cutícula de los nematodos (Jeon, et al. 1999; Monsalve, et al. 2011), y se encontró un aumento significativo en el período circadiano comparado con la cepa control N2. Además, el rescate del alelo mutado para ese gen (*lin-42*(mg152), cepa VELS26) mostró un periodo circadiano normal (24,1 ± 0,3

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

hs). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el reloj molecular de *C. elegans* podría estar compuesto por algunos de los elementos claves de los relojes biológicos encontrados en otros organismos. Aunque el mecanismos molecular que sostiene los ritmos circadianos en estos animales podría tener algunas diferencias con los mecanismos moleculares encontrados en otros organismos modelos, también podría ser posible que mecanismos diferentes guíen las oscilaciones circadianas en *C. elegans*.

El capítulo 3 de este trabajo consistió además en el estudio de la sincronización del ritmo de actividad locomotora por la luz en diferentes cepas mutantes de fototransducción. Los resultados mostraron que la proteína Lite-1 (un receptor de luz ultravioleta que actúa en las neuronas de *C. elegans*) podría participar como un fotorreceptor circadiano en estos animales, ya que en el mutante *lite-1(ce314)* el 73% de la población no cumplió con los criterios establecidos de ritmicidad (en este trabajo se estableció como población rítmica a aquéllas que mostraron un periodo de 24 ± 2 h bajo condiciones de LD). Si bien el 27% de la población restante fue rítmica bajo condiciones de luz/oscuridad, estos mutantes mostraron un ritmo de actividad locomotora enmascarado por la luz (Figura 51B). Por otro lado, el mutante *tax-2(p691)* no mostró diferencias significativas en la ritmicidad en comparación con la cepa control N2 (Figura 49). Sin embargo, se observó que la fase de actividad locomotora de los mutantes no tuvo relación con el *zeitgeber*, ya que los nematodos mostraron actividad tanto durante la fase de luz como de oscuridad; además el ritmo de actividad locomotora podría también estar enmascarado por la luz. En resumen, la Figura 52 muestra un esquema de la eventual vía de sincronización en *C. elegans* en la célula fotorreceptora ASJ. Cabe aclarar que las vías de señalización están compuestas siempre por múltiples moléculas que interactúan entre si. Por lo tanto, el modelo presentado en este trabajo es sólo una simplificación del mismo. En este sentido, quizás otras células fotorreceptoras en *C. elegans* puedan emplear diferentes conjuntos de genes de señalización, o incluso adoptar diferentes mecanismos de transducción de señales.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

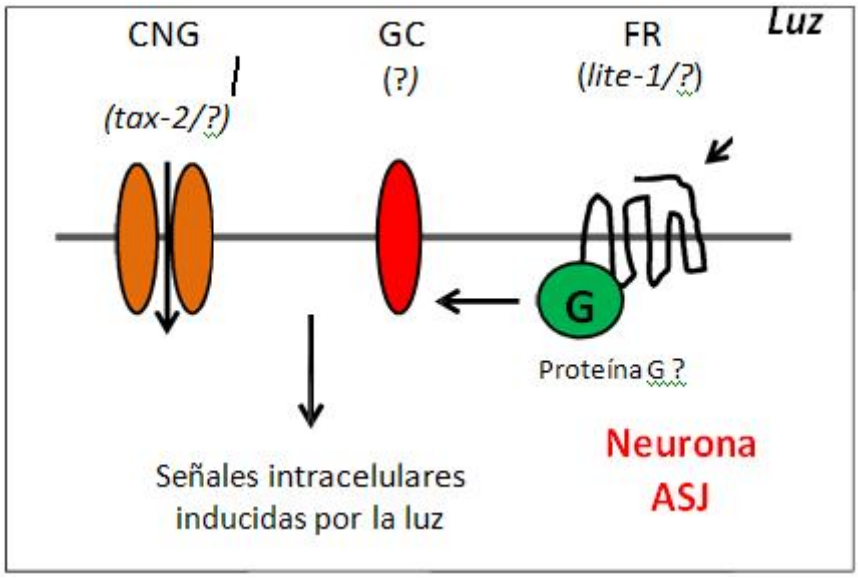


Figura 52. Esquema de la posible vía de sincronización en *C. elegans* en la célula fotorreceptora ASJ.

Conclusiones

Los ritmos circadianos se han encontrado en diversos organismos los cuales viven en condiciones extremas (Avivi, et al. 2002) por lo tanto la capacidad de poder sensar un medio ambiente cuyas señales son débiles es importante para la sobrevivencia de estos animales. *C. elegans* es un nematodo que fue aislado de diferentes habitas, tales como abono, *mushroom beds*, suelos y agua, así como asociados a otros organismos (Kiontke y Sudhaus 2006). Prácticamente no hay información en la literatura acerca de cuál señal ambiental (*zeitgeber*) es la responsable de sincronizar el reloj biológico de los nematodos, sin embargo, nuestros datos sugieren que tanto la luz como la temperatura podrían estar sincronizando los ritmos de actividad locomotora en estos animales. Trabajos de van der Linden y colaboradores (2010) demostraron ritmos transcripcionales en *C. elegans* regulados tanto por la luz como la temperatura; un grupo de esos transcriptos exhibieron una expresión circadiana (van der Linden, et al. 2010). También se demostró en ese trabajo que Tax-2 (*cyclic nucleotide-gated cannel subunit*), implicado en la transducción de señales termosensoriales y en la fototransducción (Hedgecock y Russell 1975; Ward, et al. 2008; Liu, et al. 2010), es necesario para transducir tanto la señal de la luz como de la temperatura al reloj. Por lo tanto, estos resultados indican que *C. elegans* podría tener un reloj biológico que es entrenado tanto por la luz como la temperatura (Figura 53).

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

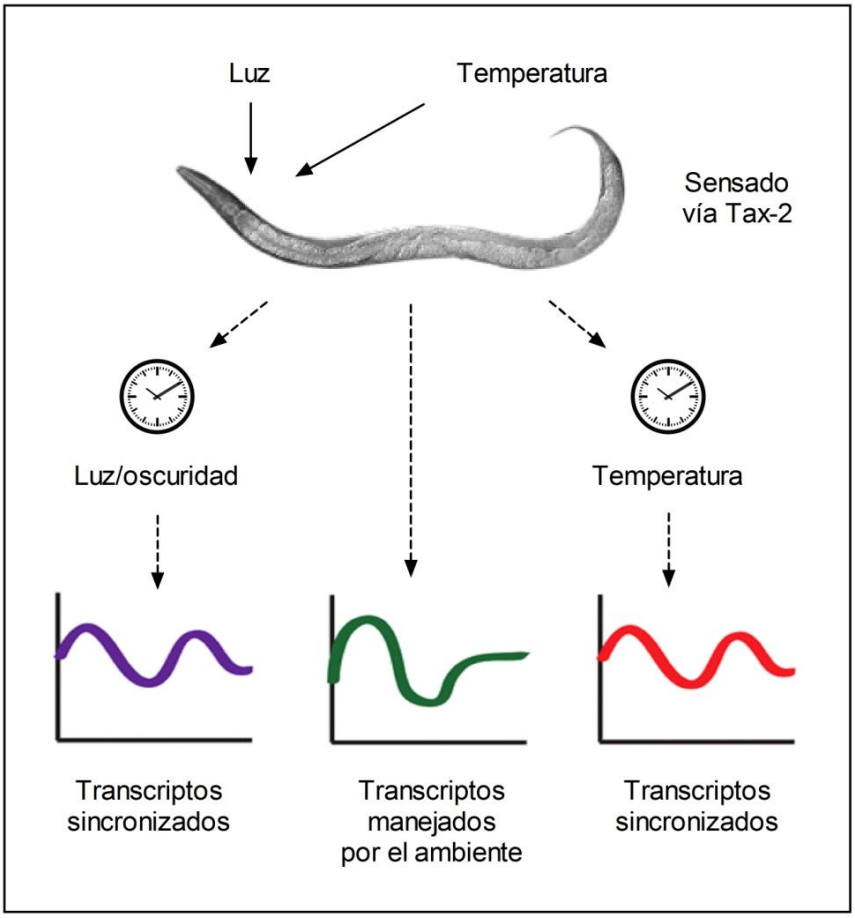


Figura 53. Expresión de genes regulados tanto por la luz como la temperatura en *C. elegans*. Modificado de Rachel Jones., 2010.

En resumen, en este capítulo se demostró que los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans* están controlados por un reloj endógeno. Asimismo, se demostró que esos ritmos se mantienen en condiciones constantes y son compensados por temperatura. Se determinó además que tanto la luz como la temperatura podrían actuar como agentes sincronizadores del reloj. Cabe aclarar que el registro de gusanos individuales mostro que el patrón de actividad de los nematodos, así como el periodo (bajo condiciones de oscuridad constante) y la acrofase, presentan una gran variabilidad. En condiciones de laboratorio, los resultados del presente trabajo sugieren que el registro de poblaciones de gusanos es más adecuado para el estudio de los ritmos circadianos en *C. elegans*, y además un buen sistema para el *screening* de mutantes circadianos; en este sentido, el descubrimiento de un fenotipo circadiano *lin-42* alienta el uso de este organismo modelo para el estudio cronobiológico.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los ritmos biológicos se encuentran en todos los niveles de organización de un organismo y ocurren en la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento, sean procariotas o eucariotas, plantas o animales. Dependiendo del periodo, los ritmos biológicos se pueden clasificar en ultradianos, infradianos y circadianos. Los ritmos circadianos, cuya periodicidad es de aproximadamente 24 horas, han sido los más extensamente estudiados. El reloj circadiano es endógeno, pero además esta sincronizado por factores ambientales tales como la luz y la temperatura, ajustando su periodo y fase al ciclo ambiental. Así, la sincronización asegura la conexión entre el reloj biológico y el ambiente. De esta manera, la presencia de un reloj endógeno permite al organismo predecir los cambios en la naturaleza y así anticiparse a una respuesta adecuada.

La importancia adaptativa de poseer un reloj biológico ha sido estudiada en diferentes organismos modelos, tales como *Drosophila melanogaster*, *Nuerospora crassa* y *Mus musculus*. Estos sistemas han permitido entender y descifrar los mecanismos moleculares mediante los cuales operan la mayoría de los relojes biológicos. El presente trabajo de tesis busca caracterizar los ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans*, así como estudiar posibles factores ambientales que puedan actuar como sincronizadores del reloj biológico en estos animales.

El Capítulo 1 del presente trabajo de tesis tuvo como objetivo general hacer una caracterización inicial de los ritmos circadianos en nuestro modelo de estudio. Como se mencionó antes, la mayoría de los procesos fisiológicos y metabólicos de los organismos están regulados por el reloj biológico. El control circadiano de estos procesos otorga a los animales una ventaja adaptativa en términos de optimizar el uso de su energía. Por consiguiente, en el Capítulo 1 se midieron diferentes variables fisiológicas en *C. elegans* a través del día. Los resultados presentados muestran la presencia de ritmos diarios y circadianos en comportamientos tales como alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de oxígeno. Por lo tanto, las diferentes variables registradas en este trabajo podrían estar coordinadas por el sistema circadiano de los nematodos. Además, se han aportado datos sobre la existencia de posibles genes metabólicos regulados por el ciclo de luz/oscuridad. Sin embargo, resta por determinarse si estos genes -u otros- mantienen su expresión rítmica en condiciones de oscuridad constante.

Como se mencionó en la Introducción general, el reloj biológico en mamíferos se comunica con el resto del organismo mediante la activación de vías simpáticas y parasimpáticas que actúan sobre los diferentes compartimentos del organismo, y mediante la producción rítmica de señales humorales, como la melatonina, cuyas concentraciones plasmáticas aumentan durante la noche en la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento. En el Capítulo 2 del presente trabajo se mostró la existencia de ritmos diarios en la síntesis de melatonina y actividad de AA-NAT en *C. elegans*. Se determinó además que tanto la luz blanca como la luz azul inhibieron

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

significativamente la actividad de la AA-NAT en comparación con el grupo control (DD). De acuerdo con estos experimentos, tanto la melatonina como la enzima AA-NAT parecen estar presentes en los nematodos, lo que puede aportar a la idea de que la melatonina podría actuar como un mediador de los cambios de fotoperíodo y de sincronizador interno del ciclo luz/oscuridad. Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha encontrado que los nematodos son más resistentes al estrés oxidativo durante la noche (Simonetta, et al. 2008). Estos resultados correlacionan con los ritmos de síntesis de melatonina encontrados en este trabajo de tesis, sugiriendo un rol de esta indolamina en los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo en *C. elegans*.

Por otra parte, en el Capítulo 3 de este trabajo de tesis se realizó una completa descripción sobre los ritmos de actividad locomotora de *C. elegans*. Se mostró que los mismos cumplen con las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos: son endógenos, el período endógeno es independiente de la temperatura, y los ritmos circadianos se sincronizan tanto por la luz como la temperatura. En condiciones de luz/oscuridad los nematodos mostraron ser más activos durante la noche. Ese patrón de actividad correlaciona con los datos de consumo de oxígeno mostrados en el Capítulo 1.

Cabe aclarar que el ritmo de actividad locomotora mostró una gran variabilidad interindividuo, probablemente debido a que la actividad motora no es una vía de salida robusta del reloj biológico en *C. elegans*. Para evitar ese probema, en este trabajo los registros se llevaron a cabo con poblaciones de animales constituídas por 7 u 8 nematodos. Por otro lado, el análisis de los resultados sugiere que la luz podría estar sincronizando los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*. Existe sin embargo la posibilidad de que el ritmo de actividad locomotora esté enmascarado por la luz, ya que en el 50% de la población analizada el ritmo en libre curso empezó en una fase diferente a la determinada por el ciclo LD.

Por otra parte, el uso de cepas mutantes de fototransducción brinda mejores herramientas para el estudio de la sincronización del ritmo de actividad locomotora por la luz. Mutantes para los genes *lite-1*, *lite-3* y *tax-2* mostraron defectos en la sincronización en comparación con la cepa control N2 (*wild type*). Sin embargo, se requerirán futuros experimentos para dilucidar completamente qué moléculas participan de la fotorrecepción circadiana en *C. elegans*.

Otras cepas mutantes estudiadas en el Capítulo 3 fueron mutantes para la proteína Lin-42 (homóloga a la proteína circadiana Per). En estos nematodos, se encontró un aumento significativo en el período circadiano comparado con la cepa control N2. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el reloj molecular de *C. elegans* podría estar compuesto por algunos de los elementos claves de los relojes biológicos encontrados en otros organismos.

Asimismo, se han aportado datos que avalan la idea de que la temperatura podría también sincronizar los ritmos de actividad locomotora en *C. elegans*. Se sabe que la temperatura es un factor medioambiental que afecta el comportamiento de los nematodos; en este sentido, tanto la temperatura como la luz podrían contribuir en la sincronización del reloj biológico de los nematodos.

En resumen, este trabajo de tesis presenta una caracterización de los ritmos circadianos en

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

C. elegans en variables fisiológicas tales como alimentación, actividad de la bomba faríngea, defecación y consumo de oxígeno. Además, se realizó una completa descripción de los ritmos de actividad locomotora y melatonina como vías de salida del reloj biológico en estos animales. En la Figura 54 se muestran las relaciones de fases entre las diferentes variables medidas en este trabajo. Como se puede observar en ese gráfico, la actividad locomotora y el consumo de oxígeno en *C. elegans* es mayor durante la noche (con un máximo a ZT18). Durante la locomoción los nematodos cambian sus necesidades energéticas y metabólicas, por lo tanto es posible pensar que el consumo de oxígeno aumente frente a un aumento en la actividad locomotora. Por otra parte, se halló un pico de melatonina a ZT18. Este resultado correlaciona con los datos de consumo de oxígeno, sugiriendo un posible rol de la melatonina en los mecanismos de protección contra el estrés oxidativo. Además, *C. elegans* podría optimizar su adaptación a los cambios del medio ambiente a través de la melatonina, regulando su actividad locomotora así como también otras actividades cíclicas del cuerpo.

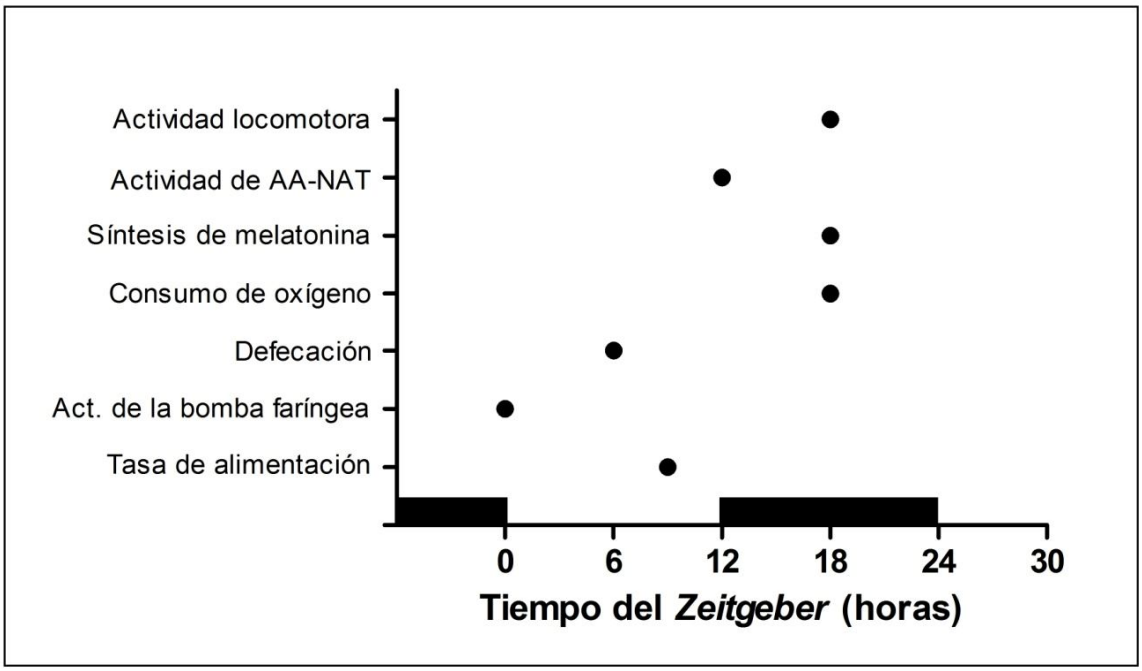


Figura 54. Relación de fases entre las diferentes variables fisiológicas medidas en *C. elegans* en condiciones de luz/oscuridad. Los puntos en la figura representan los máximos de actividad de las variables medidas.

En conclusión, se ofrece a *Caenorhabditis elegans* como un organismo modelo para su empleo en cronobiología debido a su su facilidad de manipulación genética, conocimiento celular, corta longitud de vida y económica manutención.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Los resultados de esta tesis se han publicado parcialmente en los siguientes trabajos:

1. 2011. María L. Migliori, Andrés Romanowski, Sergio H. Simonetta, and Diego A. Golombek. ***Daily variation in melatonin synthesis and AA- NAT activity in the nematode Caenorhabditis elegans*.** Journal of Pineal Research. PMID: 21995323.

2. 2011. María L. Migliori, Sergio H. Simonetta, Andrés Romanowski and Diego A. Golombek. ***Circadian rhythms in metabolic variables in Caenorhabditis elegans*.** Physiology & Behavior. PMID: 21315097.

3. 2009. Simonetta SH, Migliori ML, Romanowski A, Golombek DA. ***Timing of Locomotor Activity Circadian Rhythms in Caenorhabditis elegans*.** PloS ONE. PMID: 19859568.

BIBLIOGRAFIA

Aguzzi, J., J. B. Company, F. Sarda y P. Abello. 2003. Circadian Oxygen Consumption Patterns in Continental Slope Nephrops norvegicus (Decapoda: Nephropidae) in the Western Mediterranean. Journal of Crustacean Biology **23**:749-757.

Akhtar, R. A., A. B. Reddy, E. S. Maywood, J. D. Clayton, V. M. King, A. G. Smith, T. W. Gant, M. H. Hastings y C. P. Kyriacou. 2002. Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. Curr Biol **12**:540-550.

Albertson, D. G. y J. N. Thomson. 1976. The pharynx of Caenorhabditis elegans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **275**:299-325.

Alkema, M. y B. Horvitz. 2001. A C. elegans CREB PROTEIN MODULATES TGF-BETA SIGNALING. 2001 International Worm Meeting abstract 341.

Allada, R., N. E. White, W. V. So, J. C. Hall y M. Rosbash. 1998. A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. Cell **93**:791-804.

Amherd, R., E. Hintermann, D. Walz, M. Affolter y U. A. Meyer. 2000. Purification, cloning, and characterization of a second arylalkylamine N-acetyltransferase from Drosophila melanogaster. DNA Cell Biol **19**:697-705.

Anderson, G. L. y D. B. Dusenbery. 1977. Critical-oxygen tension of Caenorhabdiltis elegans. J Nematol **9**:253-254.

Aschoff, J. 1960. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**:11-28.

Aschoff, J. 1988. Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. In Trends in Chronobiology. Advances in the Biosciences **73**:149-161.

Aschoff, J., K. Hoffmann, H. Pohl y R. Wever. 1975. Re-entrainment of circadian rhythms after phase-shifts of the Zeitgeber. Chronobiologia **2**:23-78.

Ashmore, L. J. y A. Sehgal. 2003. A fly's eye view of circadian entrainment. J Biol Rhythms **18**:206-216.

Avery, L. 1993. Motor neuron M3 controls pharyngeal muscle relaxation timing in Caenorhabditis elegans. J Exp Biol **175**:283-297.

Avery, L. y H. R. Horvitz. 1989. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of C. elegans. Neuron **3**:473-485.

Avery, L. y H. R. Horvitz. 1990. Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in Caenorhabditis elegans. J Exp Zool **253**:263-270.

Avery, L. y J. H. Thomas. 1997. Feeding and Defecation.*en* D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer y J. R. Priess, editores. C. elegans II, Cold Spring Harbor (NY).

Avivi, A., H. Oster, A. Joel, A. Beiles, U. Albrecht y E. Nevo. 2002. Circadian genes in a blind

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

subterranean mammal II: conservation and uniqueness of the three Period homologs in the blind subterranean mole rat, Spalax ehrenbergi superspecies. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:11718-11723.

Axelrod, J. 1974. The pineal gland: a neurochemical transducer. Science **184**:1341-1348.

Axelrod, J. y H. Weissbach. 1960. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science **131**:1312.

Bae, K., X. Jin, E. S. Maywood, M. H. Hastings, S. M. Reppert y D. R. Weaver. 2001. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. Neuron **30**:525-536.

Baler, R., S. Covington y D. C. Klein. 1997. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. J Biol Chem **272**:6979-6985.

Balsalobre, A., F. Damiola y U. Schibler. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell **93**:929-937.

Balzer, I., B. Hocker y K. Holger. 2000. Occurrence and comparative physiology of melatonin in evolutionary diverse organism. In: The Redox State and Circadian Rhythms: 95–119.

Banerjee, D., A. Kwok, S. Y. Lin y F. J. Slack. 2005. Developmental timing in C. elegans is regulated by kin-20 and tim-1, homologs of core circadian clock genes. Dev Cell **8**:287-295.

Bargiello, T. A., F. R. Jackson y M. W. Young. 1984. Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila. Nature **312**:752-754.

Bargmann, C. I. y L. Avery. 1995. Laser killing of cells in Caenorhabditis elegans. Methods Cell Biol **48**:225-250.

Bargmann, C. I., E. Hartwieg y H. R. Horvitz. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in C. elegans. Cell **74**:515-527.

Bass, J. 2010. High glucose, no cry. Nat Med **16**:1074-1076.

Bass, J. 2011. Physiology: On time metabolism. Nature **480**:466-467.

Bembenek, J., H. Sehadova, N. Ichihara y M. Takeda. 2005. Day/night fluctuations in melatonin content, arylalkylamine N-acetyltransferase activity and NAT mRNA expression in the CNS, peripheral tissues and hemolymph of the cockroach, Periplaneta americana. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **140**:27-36.

Benitez-King, G., A. Rios, A. Martinez y F. Anton-Tay. 1996. In vitro inhibition of Ca2+/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. Biochim Biophys Acta **1290**:191-196.

Benito, J., H. Zheng, F. S. Ng y P. E. Hardin. 2007. Transcriptional feedback loop regulation, function, and ontogeny in Drosophila. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**:437-444.

Berson, D. M. 2007. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. Pflugers Arch **454**:849-855.

Berson, D. M., F. A. Dunn y M. Takao. 2002. Phototransduction by retinal ganglion cells that set

the circadian clock. Science **295**:1070-1073.

Boccalandro, H. E., C. V. Gonzalez, D. A. Wunderlin y M. F. Silva. 2011. Melatonin levels, determined by LC-ESI-MS/MS, fluctuate during the day/night cycle in Vitis vinifera cv Malbec: evidence of its antioxidant role in fruits. J Pineal Res **51**:226-232.

Boothroyd, C. E., H. Wijnen, F. Naef, L. Saez y M. W. Young. 2007. Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in Drosophila. PLoS Genet **3**:e54.

Borkovich, K. A., L. A. Alex, O. Yarden, M. Freitag, G. E. Turner, N. D. Read, S. Seiler, D.

Bell-Pedersen, J. Paietta, N. Plesofsky, M. Plamann, M. Goodrich-Tanrikulu, U. Schulte, G. Mannhaupt, F. E. Nargang, A. Radford, C. Selitrennikoff, J. E. Galagan, J. C. Dunlap, J. J. Loros, D. Catcheside, H. Inoue, R. Aramayo, M. Polymenis, E. U. Selker, M. S. Sachs, G. A. Marzluf, I. Paulsen, R. Davis, D. J. Ebbole, A. Zelter, E. R. Kalkman, R. O'Rourke, F. Bowring, J. Yeadon, C. Ishii, K. Suzuki, W. Sakai y R. Pratt. 2004. Lessons from the genome sequence of Neurospora crassa: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. Microbiol Mol Biol Rev **68**:1-108.

Bowen, L. C., A. V. Bicknell, M. Tabish, R. A. Clegg, H. H. Rees y M. J. Fisher. 2006. Expression of multiple isoforms of the cAMP-dependent protein kinase (PK-A) catalytic subunit in the nematode, Caenorhabditis elegans. Cell Signal **18**:2230-2237.

Braeckman, B. P., K. Houthoofd y J. R. Vanfleteren. 2009. Intermediary metabolism. WormBook: 1-24.

Brenner, S. 1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics **77**:71-94.

Brodbeck, D., R. Amherd, P. Callaerts, E. Hintermann, U. A. Meyer y M. Affolter. 1998. Molecular and biochemical characterization of the aaNAT1 (Dat) locus in Drosophila melanogaster: differential expression of two gene products. DNA Cell Biol **17**:621-633.

Brooks, C. M., R. A. Lockwood y M. L. Wiggins. 1946. A study of the effect of hypothalamic lesions on the eating habits of the albino rat. Am J Physiol **147**:735-741.

Brownstein, M. y J. Axelrod. 1974. Pineal gland: 24-hour rhythm in norepinephrine turnover. Science **184**:163-165.

Buckingham, S. D. y D. B. Sattelle. 2008. Strategies for automated analysis of C. elegans locomotion. Invert Neurosci **8**:121-131.

Bunger, M. K., L. D. Wilsbacher, S. M. Moran, C. Clendenin, L. A. Radcliffe, J. B. Hogenesch, M. C. Simon, J. S. Takahashi y C. A. Bradfield. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. Cell **103**:1009-1017.

Burkhardt, S., D. X. Tan, L. C. Manchester, R. Hardeland y R. J. Reiter. 2001. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (Prunus cerasus). J Agric Food Chem **49**:4898-4902.

Cahill, G. M. 2002. Clock mechanisms in zebrafish. Cell Tissue Res **309**:27-34.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Cassada, R. C. y R. L. Russell. 1975. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev Biol **46**:326-342.

Cassata, G., H. Kagoshima, Y. Andachi, Y. Kohara, M. B. Durrenberger, D. H. Hall y T. R. Burglin. 2000. The LIM homeobox gene ceh-14 confers thermosensory function to the AFD neurons in Caenorhabditis elegans. Neuron **25**:587-597.

Cermakian, N., L. Monaco, M. P. Pando, A. Dierich y P. Sassone-Corsi. 2001. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the Period1 gene. EMBO J **20**:3967-3974.

Champney, T. H., A. P. Holtorf, R. W. Steger y R. J. Reiter. 1984. Concurrent determination of enzymatic activities and substrate concentrations in the melatonin synthetic pathway within the same rat pineal gland. J Neurosci Res **11**:59-66.

Chan, R. C., A. Chan, M. Jeon, T. F. Wu, D. Pasqualone, A. E. Rougvie y B. J. Meyer. 2003. Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1. Nature **423**:1002-1009.

Chiba, Y., L. K. Cutkomp y F. Halberg. 1973. Circadian oxygen consumption rhythm of the flour beetle, Tribolium confusum. J Insect Physiol **19**:2163-2172.

Claridge-Chang, A., H. Wijnen, F. Naef, C. Boothroyd, N. Rajewsky y M. W. Young. 2001.

Circadian regulation of gene expression systems in the Drosophila head. Neuron **32**:657-671.

Claustrat, B., J. Brun y G. Chazot. 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev **9**:11-24.

Coburn, C. M. y C. I. Bargmann. 1996. A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in C. elegans. Neuron **17**:695-706.

Coon, S. L. y D. C. Klein. 2006. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: emergence and divergence. Mol Cell Endocrinol **252**:2-10.

Craft, C. M., W. W. Morgan y R. J. Reiter. 1984. 24-Hour changes in catecholamine synthesis in rat and hamster pineal glands. Neuroendocrinology **38**:193-198.

Crosthwaite, S. K., J. C. Dunlap y J. J. Loros. 1997. Neurospora wc-1 and wc-2: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. Science **276**:763-769.

Cui, L. N., E. Coderre y L. P. Renaud. 2001. Glutamate and GABA mediate suprachiasmatic nucleus inputs to spinal-projecting paraventricular neurons. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**:R1283-1289.

Dal Santo, P., M. A. Logan, A. D. Chisholm y E. M. Jorgensen. 1999. The inositol trisphosphate receptor regulates a 50-second behavioral rhythm in C. elegans. Cell **98**:757-767.

Darby. 2005. Interactions with microbial pathogens. Worm Book.

de Bono, M. y A. V. Maricq. 2005. Neuronal substrates of complex behaviors in C. elegans. Annu Rev Neurosci **28**:451-501.

Dibner, C., U. Schibler y U. Albrecht. 2010. The mammalian circadian timing system:

organization and coordination of central and peripheral clocks. Annu Rev Physiol **72**:517-549.

Dimitrijevic, N., S. Dzitoyeva y H. Manev. 2004. An automated assay of the behavioral effects of cocaine injections in adult Drosophila. J Neurosci Methods **137**:181-184.

Ditty, J. L., S. R. Canales, B. E. Anderson, S. B. Williams y S. S. Golden. 2005. Stability of the Synechococcus elongatus PCC 7942 circadian clock under directed anti- phase expression of the kai genes. Microbiology **151**:2605-2613.

Doyle, S. E., A. M. Castrucci, M. McCall, I. Provencio y M. Menaker. 2006. Nonvisual light responses in the Rpe65 knockout mouse: rod loss restores sensitivity to the melanopsin system. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:10432-10437.

Drijfhout, W. J., C. J. Grol y B. H. Westerink. 1996a. Parasympathetic inhibition of pineal indole metabolism by prejunctional modulation of noradrenaline release. Eur J Pharmacol **308**:117-124.

Drijfhout, W. J., A. G. van der Linde, J. B. de Vries, C. J. Grol y B. H. Westerink. 1996b.

Microdialysis reveals dynamics of coupling between noradrenaline release and melatonin secretion in conscious rats. Neurosci Lett **202**:185-188.

Drijfhout, W. J., A. G. van der Linde, S. E. Kooi, C. J. Grol y B. H. Westerink. 1996c. Norepinephrine release in the rat pineal gland: the input from the biological clock measured by in vivo microdialysis. J Neurochem **66**:748-755.

Dunlap, J. C. 1999. Molecular bases for circadian clocks. Cell **96**:271-290.

Dunlap, J. C., J. J. Loros y P. P. Decoursey. 2003. Chronobiology: Biological Timekeeping. Sunderland: Sinauer Associates.

Dunlap, J. C., J. J. Loros, Y. Liu y S. K. Crosthwaite. 1999. Eukaryotic circadian systems: cycles in common. Genes Cells **4**:1-10.

Ebling, F. J. 1996. The role of glutamate in the photic regulation of the suprachiasmatic nucleus. Prog Neurobiol **50**:109-132.

Edwards, S. L., N. K. Charlie, M. C. Milfort, B. S. Brown, C. N. Gravlin, J. E. Knecht y K. G. Miller. 2008. A novel molecular solution for ultraviolet light detection in Caenorhabditis elegans. PLoS Biol **6**:e198.

Elhai, J. y C. P. Wolk. 1988. Conjugal transfer of DNA to cyanobacteria. Methods Enzymol **167**:747-754.

Fabian, T. J. y T. E. Johnson. 1994. Production of age-synchronous mass cultures of Caenorhabditis elegans. J Gerontol **49**:B145-156.

Faillace, M. P., M. I. Sarmiento, L. N. Siri y R. E. Rosenstein. 1994. Diurnal variations in cyclic AMP and melatonin content of golden hamster retina. J Neurochem **62**:1995-2000.

Feldman, J. F. y M. N. Hoyle. 1973. Isolation of circadian clock mutants of Neurospora crassa. Genetics **75**:605-613.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Fleissner, G. 1982. Isolation of an Insect Circadian Clock. J Comp Physiol **149**.

Fu, Y. y K. W. Yau. 2007. Phototransduction in mouse rods and cones. Pflugers Arch **454**:805-819.

Fukuto, H. S., D. M. Ferkey, A. J. Apicella, H. Lans, T. Sharmeen, W. Chen, R. J.

Lefkowitz, G. Jansen, W. R. Schafer y A. C. Hart. 2004. G protein-coupled receptor kinase function is essential for chemosensation in C. elegans. Neuron **42**:581-593.

Gachon, F., E. Nagoshi, S. A. Brown, J. Ripperger y U. Schibler. 2004. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. Chromosoma **113**:103-112.

Gachon, F., F. F. Olela, O. Schaad, P. Descombes y U. Schibler. 2006. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. Cell Metab **4**:25-36.

Ganguly, S., S. L. Coon y D. C. Klein. 2002. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. Cell Tissue Res **309**:127-137.

Ganguly, S., J. A. Gastel, J. L. Weller, C. Schwartz, H. Jaffe, M. A. Namboodiri, S. L. Coon, A. B. Hickman, M. Rollag, T. Obsil, P. Beauverger, G. Ferry, J. A. Boutin y D. C. Klein. 2001a. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N- acetyltransferase/14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:8083-8088.

Ganguly, S., P. Mummaneni, P. J. Steinbach, D. C. Klein y S. L. Coon. 2001b. Characterization of the Saccharomyces cerevisiae homolog of the melatonin rhythm enzyme arylalkylamine N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87). J Biol Chem **276**:47239-47247.

Ganguly, S., J. L. Weller, A. Ho, P. Chemineau, B. Malpaux y D. C. Klein. 2005. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N- acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. Proc Natl Acad Sci U S A **102**:1222-1227.

Giebultowicz, J. M. 2000. Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. Annu Rev Entomol **45**:769-793.

Giebultowicz, J. M. 2001. Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **356**:1791-1799.

Glaser, F. T. y R. Stanewsky. 2005. Temperature synchronization of the Drosophila circadian clock. Curr Biol **15**:1352-1363.

Glaser, F. T. y R. Stanewsky. 2007. Synchronization of the Drosophila circadian clock by temperature cycles. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**:233-242.

Golden, S. S., M. Ishiura, C. H. Johnson y T. Kondo. 1997. Cyanobacterial Circadian Rhythms. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **48**:327-354.

Golden, S. S. y L. A. Sherman. 1983. A hybrid plasmid is a stable cloning vector for the cyanobacterium Anacystis nidulans R2. J Bacteriol **155**:966-972.

Golden, S. S. y L. A. Sherman. 1984. Optimal conditions for genetic transformation of the

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

cyanobacterium Anacystis nidulans R2. J Bacteriol **158**:36-42.

Gonze, D. y A. Goldbeter. 2006. Circadian rhythms and molecular noise. Chaos **16**:026110.

Gonze, D., J. Halloy y A. Goldbeter. 2002. Robustness of circadian rhythms with respect to molecular noise. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:673-678.

Govitrapong, P., P. Phansuwan-Pujito y M. Ebadi. 1989. Studies on the properties of muscarinic cholinergic receptor sites in bovine pineal gland. Comp Biochem Physiol C **94**:159-164.

Gray, J. M., D. S. Karow, H. Lu, A. J. Chang, J. S. Chang, R. E. Ellis, M. A. Marletta y C. I. Bargmann. 2004. Oxygen sensation and social feeding mediated by a C. elegans guanylate cyclase homologue. Nature **430**:317-322.

Green, C. B., J. S. Takahashi y J. Bass. 2008. The meter of metabolism. Cell **134**:728-742.

Hall, J. C. y M. Rosbash. 1987. Genetic and molecular analysis of biological rhythms. J Biol Rhythms **2**:153-178.

Hardeland, R. y B. Poeggeler. 2003. Non-vertebrate melatonin. J Pineal Res **34**:233-241.

Hardeland, R., R. J. Reiter, B. Poeggeler y D. X. Tan. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. Neurosci Biobehav Rev **17**:347-357.

Hardie, J. y N. Gao. 1997. Melatonin and the pea aphid, Acyrthosiphon pisum. J Insect Physiol **43**:615-620.

Hasegawa, K., T. Saigusa y Y. Tamai. 2005. Caenorhabditis elegans opens up new insights into circadian clock mechanisms. Chronobiol Int **22**:1-19.

Hattar, S., R. J. Lucas, N. Mrosovsky, S. Thompson, R. H. Douglas, M. W. Hankins, J.

Lem, M. Biel, F. Hofmann, R. G. Foster y K. W. Yau. 2003. Melanopsin and rod- cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. Nature **424**:76-81.

Hatzold, J. y B. Conradt. 2008. Control of apoptosis by asymmetric cell division. PLoS Biol **6**:e84.

Hedgecock, E. M. y R. L. Russell. 1975. Normal and mutant thermotaxis in the nematode Caenorhabditis elegans. Proc Natl Acad Sci U S A **72**:4061-4065.

Heintzen, C. y Y. Liu. 2007. The Neurospora crassa circadian clock. Adv Genet **58**:25-66.

Helfrich-Forster, C. 2004. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol **190**:601-613.

Helfrich-Forster, C. 2005. Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. Genes Brain Behav **4**:65-76.

Helfrich-Forster, C., M. Stengl y U. Homberg. 1998. Organization of the circadian system in insects. Chronobiol Int **15**:567-594.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Hintermann, E., N. C. Grieder, R. Amherd, D. Brodbeck y U. A. Meyer. 1996. Cloning of an arylalkylamine N-acetyltransferase (aaNAT1) from Drosophila melanogaster expressed in the nervous system and the gut. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:12315-12320.

Hintermann, E., P. Jeno y U. A. Meyer. 1995. Isolation and characterization of an arylalkylamine N-acetyltransferase from Drosophila melanogaster. FEBS Lett **375**:148-150.

Hobert, O. 2003. Behavioral plasticity in C. elegans: paradigms, circuits, genes. J Neurobiol **54**:203-223.

Hobert, O., I. Mori, Y. Yamashita, H. Honda, Y. Ohshima, Y. Liu y G. Ruvkun. 1997. Regulation of interneuron function in the C. elegans thermoregulatory pathway by the ttx-3 LIM homeobox gene. Neuron **19**:345-357.

Homberg, U., T. Reischig y M. Stengl. 2003. Neural organization of the circadian system of the cockroach Leucophaea maderae. Chronobiol Int **20**:577-591.

Horvitz, H. R., M. Chalfie, C. Trent, J. E. Sulston y P. D. Evans. 1982. Serotonin and octopamine in the nematode Caenorhabditis elegans. Science **216**:1012-1014.

Huang, X., J. A. Powell-Coffman y Y. Jin. 2004. The AHR-1 aryl hydrocarbon receptor and its co-factor the AHA-1 aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator specify GABAergic neuron cell fate in C. elegans. Development **131**:819-828.

Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, E. De Castro, P. S. Langendijk-Genevaux, M. Pagni y C. J. Sigrist. 2006. The PROSITE database. Nucleic Acids Res **34**:D227-230.

Illnerova, H., M. Backstrom, J. Saaf, L. Wetterberg y B. Vangbo. 1978. Melatonin in rat pineal gland and serum; rapid parallel decline after light exposure at night. Neurosci Lett **9**:189-193.

Inada, H., H. Ito, J. Satterlee, P. Sengupta, K. Matsumoto y I. Mori. 2006. Identification of guanylyl cyclases that function in thermosensory neurons of Caenorhabditis elegans. Genetics **172**:2239-2252.

Ishiura, M., S. Kutsuna, S. Aoki, H. Iwasaki, C. R. Andersson, A. Tanabe, S. S. Golden, C. H. Johnson y T. Kondo. 1998. Expression of a gene cluster kaiABC as a circadian feedback process in cyanobacteria. Science **281**:1519-1523.

Itoh, M. T., A. Hattori, Y. Sumi y T. Suzuki. 1995. Day-night changes in melatonin levels in different organs of the cricket (Gryllus bimaculatus). J Pineal Res **18**:165-169.

Itoh, M. T., T. Shinozawa y Y. Sumi. 1999. Circadian rhythms of melatonin-synthesizing enzyme activities and melatonin levels in planarians. Brain Res **830**:165-173.

Iyer, L. M., L. Aravind, S. L. Coon, D. C. Klein y E. V. Koonin. 2004. Evolution of cell-cell signaling in animals: did late horizontal gene transfer from bacteria have a role? Trends Genet **20**:292-299.

Janssen, T., S. J. Husson, M. Lindemans, I. Mertens, S. Rademakers, K. Ver Donck, J.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Geysen, G. Jansen y L. Schoofs. 2008. Functional characterization of three G protein-coupled receptors for pigment dispersing factors in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem **283**:15241-15249.

Janssen, T., S. J. Husson, E. Meelkop, L. Temmerman, M. Lindemans, K. Verstraelen, S. Rademakers, I. Mertens, M. Nitabach, G. Jansen y L. Schoofs. 2009. Discovery and characterization of a conserved pigment dispersing factor-like neuropeptide pathway in Caenorhabditis elegans. J Neurochem **111**:228-241.

Jeon, M., H. F. Gardner, E. A. Miller, J. Deshler y A. E. Rougvie. 1999. Similarity of the C. elegans developmental timing protein LIN-42 to circadian rhythm proteins. Science **286**:1141-1146.

Kaneko, M., N. Hernandez-Borsetti y G. M. Cahill. 2006. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. Proc Natl Acad Sci U S A **103**:14614-14619.

Kang, K., K. Lee, S. Park, Y. S. Kim y K. Back. 2010. Enhanced production of melatonin by ectopic overexpression of human serotonin N-acetyltransferase plays a role in cold resistance in transgenic rice seedlings. J Pineal Res **49**:176-182.

Karolczak, M., H. W. Korf y J. H. Stehle. 2005. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. Endocrine **27**:89-100.

Kim, S. K., J. Lund, M. Kiraly, K. Duke, M. Jiang, J. M. Stuart, A. Eizinger, B. N. Wylie y G. S. Davidson. 2001. A gene expression map for Caenorhabditis elegans. Science **293**:2087-2092.

Kimura, K. D., A. Miyawaki, K. Matsumoto y I. Mori. 2004. The C. elegans thermosensory neuron AFD responds to warming. Curr Biol **14**:1291-1295.

Kimura, Y., E. E. Corcoran, K. Eto, K. Gengyo-Ando, M. A. Muramatsu, R. Kobayashi, J. H. Freedman, S. Mitani, M. Hagiwara, A. R. Means y H. Tokumitsu. 2002. A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of Caenorhabditis elegans. EMBO Rep **3**:962-966.

Kiontke, K. y W. Sudhaus. 2006. Ecology of Caenorhabditis species. WormBook: 1-14. Kiontke K, S. W. 2006. Ecology of Caenorhabditis species. Worm Book.

Kippert, F., D. S. Saunders y M. L. Blaxter. 2002. Caenorhabditis elegans has a circadian clock. Curr Biol **12**:R47-49.

Kita, Y., M. Shiozawa, W. Jin, R. R. Majewski, J. C. Besharse, A. S. Greene y H. J. Jacob. 2002. Implications of circadian gene expression in kidney, liver and the effects of fasting on pharmacogenomic studies. Pharmacogenetics **12**:55-65.

Klein, D. C., S. L. Coon, P. H. Roseboom, J. L. Weller, M. Bernard, J. A. Gastel, M. Zatz, P. M. Iuvone, I. R. Rodriguez, V. Begay, J. Falcon, G. M. Cahill, V. M. Cassone y R. Baler. 1997. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. Recent Prog Horm Res **52**:307-357; discussion 357-

308.

Klein, D. C. y J. L. Weller. 1970. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. Science **169**:1093-1095.

Kohsaka, A. y J. Bass. 2007. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. Trends Endocrinol Metab **18**:4-11.

Kolar, J. y I. Machackova. 2005. Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. J Pineal Res **39**:333-341.

Komatsu, H., Y. H. Jin, N. L'Etoile, I. Mori, C. I. Bargmann, N. Akaike y Y. Ohshima. 1999. Functional reconstitution of a heteromeric cyclic nucleotide-gated channel of Caenorhabditis elegans in cultured cells. Brain Res **821**:160-168.

Komatsu, H., I. Mori, J. S. Rhee, N. Akaike y Y. Ohshima. 1996. Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in C. elegans. Neuron **17**:707-718.

Komuniecki, R. W., R. J. Hobson, E. B. Rex, V. M. Hapiak y P. R. Komuniecki. 2004. Biogenic amine receptors in parasitic nematodes: what can be learned from Caenorhabditis elegans? Mol Biochem Parasitol **137**:1-11.

Konopka, R. J. y S. Benzer. 1971. Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A **68**:2112-2116.

Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Brief Bioinform **5**:150-163.

Lamia, K. A., S. J. Papp, R. T. Yu, G. D. Barish, N. H. Uhlenhaut, J. W. Jonker, M. Downes y R. M. Evans. 2011. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. Nature **480**:552-556.

Lamia, K. A., K. F. Storch y C. J. Weitz. 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. Proc Natl Acad Sci U S A **105**:15172-15177.

Le Martelot, G., T. Claudel, D. Gatfield, O. Schaad, B. Kornmann, G. L. Sasso, A. Moschetta y U. Schibler. 2009. REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. PLoS Biol **7**:e1000181.

Levine, J. D. 2004. Sharing time on the fly. Curr Opin Cell Biol **16**:210-216.

Levine, J. D., P. Funes, H. B. Dowse y J. C. Hall. 2002a. Advanced analysis of a cryptochrome mutation's effects on the robustness and phase of molecular cycles in isolated peripheral tissues of Drosophila. BMC Neurosci **3**:5.

Levine, J. D., P. Funes, H. B. Dowse y J. C. Hall. 2002b. Signal analysis of behavioral and molecular cycles. BMC Neurosci **3**:1.

Lewis, J. A. y J. T. Fleming. 1995. Basic culture methods. Methods Cell Biol **48**:3-29.

Lewis, J. A., C. H. Wu, J. H. Levine y H. Berg. 1980. Levamisole-resistant mutants of the nematode Caenorhabditis elegans appear to lack pharmacological acetylcholine receptors.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Neuroscience **5**:967-989.

Lipton, G. R. y D. J. Sutherland. 1970. Feedingrhythms in the Americancockroach, Periplanetaamericana J Insect Physiol **16**:1757–1767.

Liu, B., A. Sutton y R. Sternglanz. 2005. A yeast polyamine acetyltransferase. J Biol Chem **280**:16659-16664.

Liu, D. W. y J. H. Thomas. 1994. Regulation of a periodic motor program in C. elegans. J Neurosci **14**:1953-1962.

Liu, J., A. Ward, J. Gao, Y. Dong, N. Nishio, H. Inada, L. Kang, Y. Yu, D. Ma, T. Xu, I. Mori, Z. Xie y X. Z. Xu. 2010. C. elegans phototransduction requires a G protein- dependent cGMP pathway and a taste receptor homolog. Nat Neurosci **13**:715-722.

Liu, Q. A. y M. O. Hengartner. 1999. The molecular mechanism of programmed cell death in C. elegans. Ann N Y Acad Sci **887**:92-104.

Liu, X., L. Lorenz, Q. N. Yu, J. C. Hall y M. Rosbash. 1988. Spatial and temporal expression of the period gene in Drosophila melanogaster. Genes Dev **2**:228-238.

Liu, Y. 2003. Molecular mechanisms of entrainment in the Neurospora circadian clock. J Biol Rhythms **18**:195-205.

Lone, S. R. y V. K. Sharma. 2011. Social synchronization of circadian locomotor activity rhythm in the fruit fly Drosophila melanogaster. J Exp Biol **214**:3742-3750.

Loros, J. J. y J. C. Dunlap. 2001. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in Neurospora. Annu Rev Physiol **63**:757-794.

Maciel, F. E., M. A. Geihs, M. A. Vargas, B. P. Cruz, B. P. Ramos, O. Vakkuri, V. B. Meyer-Rochow, L. E. Maia Nery y S. Allodi. 2008. Daily variation of melatonin content in the optic lobes of the crab Neohelice granulata. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **149**:162-166.

Madrid, J. A. y A. Rol de Lama. 2006a. Contaminación lumínica: Supresión del ritmo circadiano de melatonina y sus consecuencias para la salud. Cronobiología básica y clínica: 269-289.

Madrid, J. A. y A. Rol de Lama. 2006b. Enmascaramiento o "masking". Cronobiología básica y clínica: 182-184.

Martinek, S., S. Inonog, A. S. Manoukian y M. W. Young. 2001. A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the Drosophila circadian clock. Cell **105**:769-779.

Mathes, A. M., B. Wolf y H. Rensing. 2008. Melatonin receptor antagonist luzindole is a powerful radical scavenger in vitro. J Pineal Res **45**:337-338.

Matsui, T., T. Matsumoto, N. Ichihara, T. Sakai, H. Satake, Y. Watari y M. Takeda. 2009. The pars intercerebralis as a modulator of locomotor rhythms and feeding in the American cockroach, Periplaneta americana. Physiol Behav **96**:548-556.

McCarthy, J. J., J. L. Andrews, E. L. McDearmon, K. S. Campbell, B. K. Barber, B. H.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Miller, J. R. Walker, J. B. Hogenesch, J. S. Takahashi y K. A. Esser. 2007. Identification of the circadian transcriptome in adult mouse skeletal muscle. Physiol Genomics **31**:86-95.

McClung, C. R., B. A. Fox y J. C. Dunlap. 1989. The Neurospora clock gene frequency shares a sequence element with the Drosophila clock gene period. Nature **339**:558-562.

McIntire, S. L., E. Jorgensen y H. R. Horvitz. 1993a. Genes required for GABA function in Caenorhabditis elegans. Nature **364**:334-337.

McIntire, S. L., E. Jorgensen, J. Kaplan y H. R. Horvitz. 1993b. The GABAergic nervous system of Caenorhabditis elegans. Nature **364**:337-341.

Meelkop, E., L. Temmerman, L. Schoofs y T. Janssen. 2011. Signalling through pigment dispersing hormone-like peptides in invertebrates. Prog Neurobiol **93**:125-147.

Migliori, M. L., A. Romanowski, S. H. Simonetta, D. Valdez, M. Guido y D. A. Golombek. 2011a. Daily variation in melatonin synthesis and arylalkylamine N- acetyltransferase activity in the nematode Caenorhabditis elegans. J Pineal Res.

Migliori, M. L., S. H. Simonetta, A. Romanowski y D. A. Golombek. 2011b. Circadian rhythms in metabolic variables in Caenorhabditis elegans. Physiol Behav **103**:315-320.

Mitchell, D. H., J. W. Stiles, J. Santelli y D. R. Sanadi. 1979. Synchronous growth and aging of Caenorhabditis elegans in the presence of fluorodeoxyuridine. J Gerontol **34**:28-36.

Moller, M. y F. M. Baeres. 2002. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. Cell Tissue Res **309**:139-150.

Monsalve, G. C., C. Van Buskirk y A. R. Frand. 2011. LIN-42/PERIOD controls cyclical and developmental progression of C. elegans molts. Curr Biol **21**:2033-2045.

Moore, R. Y. 1983. Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. Fed Proc **42**:2783-2789.

Moore, R. Y. 1996. Neural control of the pineal gland. Behav Brain Res **73**:125-130. Moore, R. Y. y J. P. Card. 1985. Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. Ann N Y Acad Sci **453**:123-133.

Moore, R. Y. y J. C. Speh. 1993. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. Neurosci Lett **150**:112-116.

Mori, I. y Y. Ohshima. 1995. Neural regulation of thermotaxis in Caenorhabditis elegans. Nature **376**:344-348.

Morin, L. P. y C. N. Allen. 2006. The circadian visual system, 2005. Brain Res Rev **51**:1-60.

Mrosovsky, N. 1999. Masking: history, definitions, and measurement. Chronobiol Int **16**:415-429.

Munoz, E., M. Brewer y R. Baler. 2002. Circadian Transcription. Thinking outside the E- Box. J Biol Chem **277**:36009-36017.

Murch, S. J., B. A. Hall, C. H. Le y P. K. Saxena. 2010. Changes in the levels of indoleamine phytochemicals during veraison and ripening of wine grapes. J Pineal Res **49**:95-100.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Narbonne, P. y R. D. Roy. 2008. Hypodermal LKB1/AMPK signalling is critical to dauer longevity. European Worm Meeting.

Nayak, S. K., T. Jegla y S. Panda. 2007. Role of a novel photopigment, melanopsin, in behavioral adaptation to light. Cell Mol Life Sci **64**:144-154.

Nguyen, M., A. Alfonso, C. D. Johnson y J. B. Rand. 1995. Caenorhabditis elegans mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. Genetics **140**:527-535.

Nosjean, O., M. Ferro, F. Coge, P. Beauverger, J. M. Henlin, F. Lefoulon, J. L. Fauchere, P. Delagrange, E. Canet y J. A. Boutin. 2000. Identification of the melatonin- binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem **275**:31311-31317.

Obsil, T., R. Ghirlando, D. C. Klein, S. Ganguly y F. Dyda. 2001. Crystal structure of the 14-3-3zeta: serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. Cell **105**:257-267.

Okamura, H., S. Yamaguchi y K. Yagita. 2002. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. Cell Tissue Res **309**:47-56.

Panda, S., M. P. Antoch, B. H. Miller, A. I. Su, A. B. Schook, M. Straume, P. G. Schultz, S. A. Kay, J. S. Takahashi y J. B. Hogenesch. 2002a. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. Cell **109**:307-320.

Panda, S., J. B. Hogenesch y S. A. Kay. 2002b. Circadian rhythms from flies to human. Nature **417**:329-335.

Panda, S., I. Provencio, D. C. Tu, S. S. Pires, M. D. Rollag, A. M. Castrucci, M. T.

Pletcher, T. K. Sato, T. Wiltshire, M. Andahazy, S. A. Kay, R. N. Van Gelder y J. B. Hogenesch. 2003. Melanopsin is required for non-image-forming photic responses in blind mice. Science **301**:525-527.

Park, Y. J., J. G. Park, H. B. Jeong, Y. Takeuchi, S. J. Kim, Y. D. Lee y A. Takemura. 2007. Expression of the melatonin receptor Mel(1c) in neural tissues of the reef fish Siganus guttatus. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **147**:103-111.

Peng, Y., D. Stoleru, J. D. Levine, J. C. Hall y M. Rosbash. 2003. Drosophila free-running rhythms require intercellular communication. PLoS Biol **1**:E13.

Pierce-Shimomura, J. T., B. L. Chen, J. J. Mun, R. Ho, R. Sarkis y S. L. McIntire. 2008. Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in C. elegans. Proc Natl Acad Sci U S A **105**:20982-20987.

Pittendrigh, C. S. 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**:159-184.

Pittendrigh, C. S. 1981. Circadian systems: Entrainment. In: Aschoff J, ed. Handbook of Behavioral Neurobiology, Biological Rhythms.:95-124.

Plautz, J. D., M. Kaneko, J. C. Hall y S. A. Kay. 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout Drosophila. Science **278**:1632-1635.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht y U. Schibler. 2002. The orphan nuclear receptor REV-ERBalpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. Cell **110**:251-260.

Price, J. L., J. Blau, A. Rothenfluh, M. Abodeely, B. Kloss y M. W. Young. 1998. double- time is a novel Drosophila clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. Cell **94**:83-95.

Priestley, J. B. 1966. El Hombre y el Tiempo. Aguilar / España.

Ralph, M. R. y M. N. Lehman. 1991. Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker. Trends Neurosci **14**:362-366.

Ramot, D., B. E. Johnson, T. L. Berry, Jr., L. Carnell y M. B. Goodman. 2008. The Parallel Worm Tracker: a platform for measuring average speed and drug-induced paralysis in nematodes. PLoS One **3**:e2208.

Rankin, C. H. 2002. From gene to identified neuron to behaviour in Caenorhabditis elegans. Nat Rev Genet **3**:622-630.

Reddy, A. B., N. A. Karp, E. S. Maywood, E. A. Sage, M. Deery, J. S. O'Neill, G. K. Wong, J. Chesham, M. Odell, K. S. Lilley, C. P. Kyriacou y M. H. Hastings. 2006. Circadian orchestration of the hepatic proteome. Curr Biol **16**:1107-1115.

Reiter, R. J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr Rev **12**:151-180.

Reiter, R. J., D. X. Tan, S. Burkhardt y L. C. Manchester. 2001. Melatonin in plants. Nutr Rev **59**:286-290.

Renn, S. C., J. H. Park, M. Rosbash, J. C. Hall y P. H. Taghert. 1999. A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in Drosophila. Cell **99**:791-802.

Reppert, S. M., C. Godson, C. D. Mahle, D. R. Weaver, S. A. Slaugenhaupt y J. F. Gusella. 1995a. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A **92**:8734-8738.

Reppert, S. M., D. R. Weaver, V. M. Cassone, C. Godson y L. F. Kolakowski, Jr. 1995b. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. Neuron **15**:1003-1015.

Reppert, S. M., D. R. Weaver y T. Ebisawa. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron **13**:1177-1185.

Riddle, D. L. 1988. The nematode C. elegans. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Rodriguez, C., J. C. Mayo, R. M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martin y R. J. Reiter. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res **36**:1-9.

Romanowski, A., M. L. Migliori, C. Valverde y D. A. Golombek. 2011. Circadian variation in Pseudomonas fluorescens (CHA0)-mediated paralysis of Caenorhabditis elegans. Microb

Pathog **50**:23-30.

Rosato, E. y C. P. Kyriacou. 2006. Analysis of locomotor activity rhythms in Drosophila. Nat Protoc **1**:559-568.

Roseboom, P. H. y D. C. Klein. 1995. Norepinephrine stimulation of pineal cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation: primary role of a beta- adrenergic receptor/cyclic AMP mechanism. Mol Pharmacol **47**:439-449.

Rosenstein, R. E., H. E. Chuluyan y D. P. Cardinali. 1990. Presynaptic effects of gamma-aminobutyric acid on norepinephrine release and uptake in rat pineal gland. J Neural Transm Gen Sect **82**:131-140.

Rosenwasser, A. M., Z. Boulos y M. Terman. 1981. Circadian organization of food intake and meal patterns in the rat. Physiol Behav **27**:33-39.

Rosenwasser, A. M., Z. Boulos y M. Terman. 1983. Circadian feeding and drinking rhythms in the rat under complete and skeleton photoperiods. Physiol Behav **30**:353-359.

Rudic, R. D., P. McNamara, A. M. Curtis, R. C. Boston, S. Panda, J. B. Hogenesch y G. A. Fitzgerald. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. PLoS Biol **2**:e377.

Rutila, J. E., V. Suri, M. Le, W. V. So, M. Rosbash y J. C. Hall. 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of Drosophila period and timeless. Cell **93**:805-814.

Saigusa, T., S. Ishizaki, S. Watabiki, N. Ishii, A. Tanakadate, Y. Tamai y K. Hasegawa. 2002. Circadian behavioural rhythm in Caenorhabditis elegans. Curr Biol **12**:R46-47.

Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol **4**:406-425.

Sand, A., T. M. Schmidt y P. Kofuji. 2012. Diverse types of ganglion cell photoreceptors in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res.

Satterlee, J. S., H. Sasakura, A. Kuhara, M. Berkeley, I. Mori y P. Sengupta. 2001.

Specification of thermosensory neuron fate in C. elegans requires ttx-1, a homolog of otd/Otx. Neuron **31**:943-956.

Schneider, N. L. y M. Stengl. 2005. Pigment-dispersing factor and GABA synchronize cells of the isolated circadian clock of the cockroach Leucophaea maderae. J Neurosci **25**:5138-5147.

Schomerus, C. y H. W. Korf. 2005. Mechanisms regulating melatonin synthesis in the mammalian pineal organ. Ann N Y Acad Sci **1057**:372-383.

Schuckel, J., K. K. Siwicki y M. Stengl. 2007. Putative circadian pacemaker cells in the antenna of the hawkmoth Manduca sexta. Cell Tissue Res **330**:271-278.

Sehgal, A., J. L. Price, B. Man y M. W. Young. 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the Drosophila mutant timeless. Science **263**:1603-1606.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Sehgal, A., A. Rothenfluh-Hilfiker, M. Hunter-Ensor, Y. Chen, M. P. Myers y M. W. Young. 1995. Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. Science **270**:808-810.

Shearman, L. P., X. Jin, C. Lee, S. M. Reppert y D. R. Weaver. 2000. Targeted disruption of the mPer3 gene: subtle effects on circadian clock function. Mol Cell Biol **20**:6269-6275.

Shibata, S. 2004. Neural regulation of the hepatic circadian rhythm. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**:901-909.

Simonetta, S. H. y D. A. Golombek. 2007. An automated tracking system for Caenorhabditis elegans locomotor behavior and circadian studies application. J Neurosci Methods **161**:273-280.

Simonetta, S. H., M. L. Migliori, A. Romanowski y D. A. Golombek. 2009. Timing of locomotor activity circadian rhythms in Caenorhabditis elegans. PLoS One **4**:e7571.

Simonetta, S. H., A. Romanowski, A. N. Minniti, N. C. Inestrosa y D. A. Golombek. 2008. Circadian stress tolerance in adult Caenorhabditis elegans. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol **194**:821-828.

Simonneaux, V., A. Ouichou, C. Craft y P. Pevet. 1994. Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. J Neurochem **62**:2464-2471. Simonneaux, V. y C. Ribelayga. 2003. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev **55**:325-395.

Smith, T. J. 1990. Phylogenetic distribution and function of arylalkylamine N- acetyltransferase. Bioessays **12**:30-33.

Stanewsky, R., M. Kaneko, P. Emery, B. Beretta, K. Wager-Smith, S. A. Kay, M. Rosbash y J. C. Hall. 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila. Cell **95**:681-692.

Stehle, J. H., N. S. Foulkes, C. A. Molina, V. Simonneaux, P. Pevet y P. Sassone-Corsi. 1993. Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. Nature **365**:314-320.

Storch, K. F., O. Lipan, I. Leykin, N. Viswanathan, F. C. Davis, W. H. Wong y C. J. Weitz. 2002. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. Nature **417**:78-83.

Strecker, G. J., J. P. Wuarin y F. E. Dudek. 1997. GABAA-mediated local synaptic pathways connect neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. J Neurophysiol **78**:2217-2220.

Sugden, D. y D. C. Klein. 1988. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. J Neurochem **50**:149-155.

Sulston, J., M. Dew y S. Brenner. 1975. Dopaminergic neurons in the nematode

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Caenorhabditis elegans. J Comp Neurol **163**:215-226.

Sulston, J. E. y H. R. Horvitz. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. Dev Biol **56**:110-156.

Sulston, J. E., E. Schierenberg, J. G. White y J. N. Thomson. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. Dev Biol **100**:64-119.

Sulston, J. E. y J. G. White. 1980. Regulation and cell autonomy during postembryonic development of Caenorhabditis elegans. Dev Biol **78**:577-597.

Takahashi, J. S., H. K. Hong, C. H. Ko y E. L. McDearmon. 2008. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. Nat Rev Genet **9**:764-775.

Takahashi, J. S., L. H. Pinto y M. H. Vitaterna. 1994. Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. Science **264**:1724-1733.

Tan, M. W., L. G. Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tompkins y F. M. Ausubel. 1999. Pseudomonas aeruginosa killing of Caenorhabditis elegans used to identify P. aeruginosa virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A **96**:2408-2413.

Tanaka, D., K. Furusawa, K. Kameyama, H. Okamoto y M. Doi. 2007. Melatonin signaling regulates locomotion behavior and homeostatic states through distinct receptor pathways in Caenorhabditis elegans. Neuropharmacology **53**:157-168.

Temmerman, L., E. Meelkop, T. Janssen, A. Bogaerts, M. Lindemans, S. J. Husson, I. Beets y L. Schoofs. 2011. C. elegans homologs of insect clock proteins: a tale of many stories. Ann N Y Acad Sci **1220**:137-148.

Tennessen, J. M., H. F. Gardner, M. L. Volk y A. E. Rougvie. 2006. Novel heterochronic functions of the Caenorhabditis elegans period-related protein LIN-42. Dev Biol **289**:30-43.

Thomas, J. H. 1990. Genetic analysis of defecation in Caenorhabditis elegans. Genetics **124**:855-872.

Thresher, R. J., M. H. Vitaterna, Y. Miyamoto, A. Kazantsev, D. S. Hsu, C. Petit, C. P. Selby, L. Dawut, O. Smithies, J. S. Takahashi y A. Sancar. 1998. Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. Science **282**:1490-1494.

Timpano, A. 2009. Identification of the circadian gene homologs sur-6/PP2A, gsp-1/PP1, gsp-2/PP1, kin-2/CKIIa and kin-10/CKIIb as developmental timing regulators of cell fate during C. elegans postembryonic development. International Worm Meeting 714 **Los Angeles, CA.**

Tsalik, E. L. y O. Hobert. 2003. Functional mapping of neurons that control locomotory behavior in Caenorhabditis elegans. J Neurobiol **56**:178-197.

Turek, F. W., C. Joshu, A. Kohsaka, E. Lin, G. Ivanova, E. McDearmon, A. Laposky, S. Losee-Olson, A. Easton, D. R. Jensen, R. H. Eckel, J. S. Takahashi y J. Bass. 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. Science **308**:1043-1045.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Ueda, H. R., W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi y S. Hashimoto. 2002. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. Nature **418**:534-539.

van der Horst, G. T., M. Muijtjens, K. Kobayashi, R. Takano, S. Kanno, M. Takao, J. de Wit, A. Verkerk, A. P. Eker, D. van Leenen, R. Buijs, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers y A. Yasui. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. Nature **398**:627-630.

van der Linden, A. M., M. Beverly, S. Kadener, J. Rodriguez, S. Wasserman, M. Rosbash y P. Sengupta. 2010. Genome-wide analysis of light- and temperature-entrained circadian transcripts in Caenorhabditis elegans. PLoS Biol **8**:e1000503.

Van Voorhies, W. A. y S. Ward. 2000. Broad oxygen tolerance in the nematode Caenorhabditis elegans. J Exp Biol **203**:2467-2478.

Vetting, M. W., S. d. C. LP, M. Yu, S. S. Hegde, S. Magnet, S. L. Roderick y J. S. Blanchard. 2005. Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. Arch Biochem Biophys **433**:212-226.

Vitaterna, M. H., D. P. King, A. M. Chang, J. M. Kornhauser, P. L. Lowrey, J. D. McDonald, W. F. Dove, L. H. Pinto, F. W. Turek y J. S. Takahashi. 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. Science **264**:719-725.

Vosko, A. M., A. Schroeder, D. H. Loh y C. S. Colwell. 2007. Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. Gen Comp Endocrinol **152**:165-175.

Wang, T. y C. Montell. 2007. Phototransduction and retinal degeneration in Drosophila. Pflugers Arch **454**:821-847.

Ward, A., J. Liu, Z. Feng y X. Z. Xu. 2008. Light-sensitive neurons and channels mediate phototaxis in C. elegans. Nat Neurosci **11**:916-922.

Ward, S., N. Thomson, J. G. White y S. Brenner. 1975. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode Caenorhabditis elegans.?2UU. J Comp Neurol **160**:313-337.

Welsh, D. K., J. S. Takahashi y S. A. Kay. 2010. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. Annu Rev Physiol **72**:551-577.

White JG, S. E., Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. **314**.

White, J. G., E. Southgate, J. N. Thomson y S. Brenner. 1976. The structure of the ventral nerve cord of Caenorhabditis elegans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **275**:327-348.

Wijnen, H. y M. W. Young. 2006. Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Annu Rev Genet **40**:409-448.

Wittkopp, P. J., S. B. Carroll y A. Kopp. 2003. Evolution in black and white: genetic control of pigment patterns in Drosophila. Trends Genet **19**:495-504.

Woelfle, M. A., Y. Ouyang, K. Phanvijhitsiri y C. H. Johnson. 2004. The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria. Curr Biol **14**:1481-1486.

Woodring, J. P. y C. W. Clifford. 1986. Development and relationships of locomotor, feeding, and oxygen consumption rhythms in house crickets. Physiological Entomology **11**.

Wright, S. 1997. The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing. San Diego: California Technical Publishing:626 p.

Wulbeck, C., E. Grieshaber y C. Helfrich-Forster. 2008. Pigment-dispersing factor (PDF) has different effects on Drosophila's circadian clocks in the accessory medulla and in the dorsal brain. J Biol Rhythms **23**:409-424.

Xu, K., X. Zheng y A. Sehgal. 2008. Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in Drosophila. Cell Metab **8**:289-300.

Yagita, K., F. Tamanini, G. T. van Der Horst y H. Okamura. 2001. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. Science **292**:278-281.

Yamamoto, T., Y. Nakahata, H. Soma, M. Akashi, T. Mamine y T. Takumi. 2004. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. BMC Mol Biol **5**:18.

Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker y H. Tei. 2000. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science **288**:682-685.

Yang, X., M. Downes, R. T. Yu, A. L. Bookout, W. He, M. Straume, D. J. Mangelsdorf y R. M. Evans. 2006. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism. Cell **126**:801-810.

Zehring, W. A., D. A. Wheeler, P. Reddy, R. J. Konopka, C. P. Kyriacou, M. Rosbash y J. C. Hall. 1984. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic Drosophila melanogaster. Cell **39**:369-376.

Zhang, E. E., Y. Liu, R. Dentin, P. Y. Pongsawakul, A. C. Liu, T. Hirota, D. A. Nusinow, X. Sun, S. Landais, Y. Kodama, D. A. Brenner, M. Montminy y S. A. Kay. 2010. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. Nat Med **16**:1152-1156.

Zheng, B., U. Albrecht, K. Kaasik, M. Sage, W. Lu, S. Vaishnav, Q. Li, Z. S. Sun, G. Eichele, A. Bradley y C. C. Lee. 2001. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. Cell **105**:683-694.

Zimmer, M., J. M. Gray, N. Pokala, A. J. Chang, D. S. Karow, M. A. Marletta, M. L.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

Hudson, D. B. Morton, N. Chronis y C. I. Bargmann. 2009. Neurons detect increases and decreases in oxygen levels using distinct guanylate cyclases. Neuron **61**:865-879.

Zimmerman, W. F., C. S. Pittendrigh y T. Pavlidis. 1968. Temperature compensation of the circadian oscillation in drosophila pseudoobscura and its entrainment by temperature cycles. J Insect Physiol **14**:669-684.

Zuryn, S., J. Kuang y P. Ebert. 2008. Mitochondrial modulation of phosphine toxicity and resistance in Caenorhabditis elegans. Toxicol Sci **102**:179-186.

Zvonic, S., A. A. Ptitsyn, S. A. Conrad, L. K. Scott, Z. E. Floyd, G. Kilroy, X. Wu, B. C. Goh, R. L. Mynatt y J. M. Gimble. 2006. Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. Diabetes **55**:962-970.

Zylka, M. J., L. P. Shearman, J. D. Levine, X. Jin, D. R. Weaver y S. M. Reppert. 1998. Molecular analysis of mammalian timeless. Neuron **21**:1115-1122.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

APÉNDICE

EXPERIMENTO DE *MICROARRAY*

Métodos generales

Se utilizaron animales de la especie *Caenorhabditis elegans*, cepa TJ1060 [spe9(hc488); fer15(b26)]; la misma fue provista por el *Caenorhabditis Genetics Center, University of Minesotta, MN, USA*. La cepa TJ1060 posee una mutación sensible a la temperatura que evita la autoreproducción de los nematodos a 25ºC, pero permite la reproducción de los mismos a 18,5ºC (Fabian y Johnson 1994).

Los nematodos se mantuvieron en placas de *petri* con medio NGM (Nematode Growth Medium) (NaCl 0,3%, Peptona 0,25%, Colesterol 5 µg/ml, CaCl2 1 mmol/l, MgSO4 1 mmol/l, Agar 1.7% en *buffer* fosfato de potasio 25 mmol/l a pH 6,0), sembradas con una monocapa de *Escherichia coli* cepa OP50; bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (llamado LD, por *light-dark* 12:12), con el encendido de las luces a las 9:00 AM (definido como *zeitgeber time* 0 o ZT0). Las condiciones de temperatura fueron constantes (16°C).

Para la realización del experimento, poblaciones de gusanos fueron sincronizadas al mismo estadio de desarrollo utilizando el método de cloro (Lewis y Fleming 1995). Los huevos obtenidos de la sincronización fueron cultivados durante toda la noche en 3,5 ml de *buffer* M9 (Na2HPO4 42 mM, KH2PO4 22 mM, NaCl 85,5 mM, MgSO4 1 mM) + antibiótico antimicótico 1x (Gibco, USA); en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y a 18,5°C, bajo un fotoperiodo de LD 12:12. Al día siguiente (en el momento en que se prenden las luces, convencionalmente llamado *Zeitgeber time* 0 o ZT0) las larvas L1 fueron transferidas a medio S completo [por litro de *buffer* S (ClNa 5,85 g/l, KH2PO4 6 gr/l, K2HPO4 1gr/l, colesterol 5 mg/ml) se adicionan 10 ml de citrato de potasio 1 M, pH = 6; 10 ml de trazas de metales; 3 ml de CaCl2 1M; 3 ml de MgSO4 1M] conteniendo *E. coli* OP50 1010/ml + Antibiótico anti micotico 1x; en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm) y en una concentración final de 30 gusanos/20 µl. Luego, las larvas L1 se mantuvieron bajo un ciclo LD 12:12 h y a temperatura constante de 25°C hasta alcanzar el estadío larval L4. Una vez alcanzado el estadío L4, los nematodos fueron transferidos a medio S completo nuevo conteniendo *E. coli* OP50 1010/ml + Antibiótico anti micotico 1x; en erlenmeyer de 50 ml, en agitación (110 rpm). Los mismos se mantuvieron bajo un ciclo LD 12:12 h y a temperatura constante de 25°C. La toma de muestra comenzó con los animales en el primer día de estadío adulto a ZT 18, 30 y 42. Los nematodos se lavaron 3 veces con *buffer* S. Los lavados se centrifugaron por 1 minuto a 1.800 rpm y el *pellet* de gusanos se resuspendió en 300 µl de trisol (Invitrogen), y posteriormente se conservó a -80°C en Mr. Frosty. El experimento se realizo con 3, 5 y 2 réplica biológica a ZT 18, 30 y 42 respectivamente.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

En los casos en los que hubo que trabajar con los animales en oscuridad, se utilizó una fuente de luz roja de intensidad menor a 1 lux. Este tipo de luz no posee efectos sobre la sincronización de *C. elegans* (Simonetta, et al. 2009).

Todas las drogas utilizadas se compraron en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Extracción de ARN total

Se congeló en nitrógeno líquido el pellet de gusanos resuspendido en 300 µl de Trizol, y se descongeló a 37ºC. Luego se homogeneizó mediante jeringa de tuberculina (27G) 10 veces. Las muestras se incubaron por 8 minutos a temperatura ambiente. Se agregó a cada tubo 54 µl de solución cloroformo: isamilico (49:1), y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos a 4ºC. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se agregó 150 µl de isopropanol. Las muestras se dejaron toda la noche a -80 ºC. Al otro día, se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos a 4ºC. Se descartó el sobrenadante y se agregó 300ul de etanol 75%. Se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos a 4ºC. Por último, se secó el pellet al aire durante 5 a 10 minutos y finalmente se resuspendió en 12 µl de H2O-DEPC 12ul.

Hibridación del *microarray* y análisis de los datos

Se utilizaron *microarrays* (Affimetrix) conteniendo 22.500 transcriptos de *C. elegans*, los cuales representan más de los 19.000 genes predichos en estos animales. La hibridación de los *microarrays* y el análisis de los datos se realizó mediante un servicio de La Fundación Instituto Leloir (Gentron). Los *microarrays* fueron analizados utilizando el programa Spotfinder y Array Assit. Los valores absolutos fueron normalizados a los genes de referencia: gpi-1, arx-1, cyc-1, eif-3.C, top-1, mdh-1, cnx-1, gpd-3, ben-1, ubc-3, chs-1 y plc-2.

Para citar este documento

María Laura Migliori. (2015). Ritmos circadianos en *Caenorhabditis elegans* (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: http://ridaa.demo.unq.edu.ar